

Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las raíces de *Cissampelos pareira* Linn

Immunomodulatory activity of methanol extract of roots of Cissampelos pareira Linn

BAFNA AR* Y MISHRA SH

Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering, The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002, Gujarat, India *e-mail: anandbafna65@rediffmail.com

RESUMEN

Se analizó la actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las raíces de *C. pareira* en ratones en cinco niveles de dosificación distintos. Se observó actividad estimuladora en la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en una dosis de 200-800 mg/kg ($p < 0,001$). El índice fagocítico también aumentó de forma significativa en comparación con los animales del grupo de control ($p < 0,001$). El extracto de metanol no alteró la respuesta humoral frente a los eritrocitos de cordero de forma significativa, lo que resultó indicativo de ausencia de actividad en la inmunidad humoral. Dosis más elevadas del extracto también mostraron protección frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida al aumentar el recuento de leucocitos totales de forma significativa ($p < 0,001$). Por tanto, en el presente estudio queda demostrada la actividad inmunomoduladora de *C. pareira*.

PALABRAS CLAVE: Título de anticuerpos de la hemaglutinación. Respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Índice fagocítico. Mielosupresión.

ABSTRACT

Methanol extract of roots of C.pareira was screened for its immunomodulatory activity in mice at five different dose levels. Stimulatory activity on DTH response was found at 200-800 mg/kg dose ($p < 0.001$). Phagocytic index was also increased significantly compared to control animals ($p < 0.001$). Methanol extract has not altered the humoral response to SRBCs significantly indicating no activity on humoral immunity. Higher doses of extract also offered protection against cyclophosphamide induced myelosuppression by increasing total WBC count significantly ($p < 0.001$). Thus present study demonstrated the immunomodulatory activity of C.pareira.

KEY WORDS: haemagglutination antibody titre. DTH response. Phagocytic index. Myelosuppression.

1. INTRODUCCIÓN

La modulación de la respuesta inmune como paliativo de enfermedades ha suscitado interés durante muchos años. El concepto de 'Rasayana' en Ayurveda se basa en principios relacionados con este tema¹. Además de ser expresamente estimuladores o supresores, determinados agentes han demostrado poseer actividad para normalizar o modular procesos

1. INTRODUCTION

Modulation of immune responses to alleviate the diseases has been of interest for many years and the concept of 'Rasayana' in Ayurveda is based on related principles¹. Apart from being specifically stimulatory or suppressive, certain agents have been shown to possess activity to normalize or modulate pathophysiological processes and are hence called

patofisiológicos; de ahí que también se denominen agentes inmunomoduladores². Las áreas más importantes en las que no ha sido posible la obtención de grandes avances han sido el desarrollo de adyuvantes para su uso en programas de vacunación o de inmunosupresores para su uso sin peligro en casos de trasplantes de órganos. Estas áreas básicas de los inmunomoduladores reciben actualmente una atención inadecuada. Se ha investigado un gran número de productos vegetales en relación con la actividad modificadora de la respuesta inmune³.

El uso de plantas en la medicina moderna como fuente de agentes inmunomoduladores se encuentra aún en una etapa inicial. Entre las plantas con una reconocida actividad inmunomoduladora se encuentran *Viscum album*, *Panax ginseng*, *Tinospora cordifolia*, *Asparagus racemosus*, etc. Algunos componentes como los polisacáridos, las lectinas, las proteínas y los péptidos presentes en las plantas han demostrado poder estimular el sistema inmunológico^{4,5}.

Cissampelos pareira Linn. (familia Menispermaceae) es una planta herbácea trepadora que se puede encontrar en zonas cálidas de Asia, África Oriental y América. Las raíces han demostrado su utilidad diurética, febrífuga, como remedio para problemas cardíacos y frente a la disentería y las úlceras⁶. Las raíces de *C. pareira* se utilizan para evitar amenazas de aborto y la hierba también se utiliza para detener hemorragias uterinas⁷. *C. pareira* demostró actividad antileucémica y se obtuvo un novedoso alcaloide derivado de la isoquinolina denominado parirubrina A⁸. Pradhan et al.⁹ realizaron estudios clínicos y farmacológicos acerca de las propiedades como relajante muscular del metilioduro de hayatin extraído de *C. pareira*. Basu et al.¹⁰ demostraron la actividad curariforme del metilcloruro de hayatin extraído de *C. pareira*. La cisamperina y otros cuatro alcaloides de bisbenzilisoquinolina aislados de *C. Pareira* demostraron poseer una actividad inhibitoria reproducible y significativa frente al carcinoma humano nasofaríngeo obtenido mediante cultivo celular (KB)¹¹.

Los datos disponibles sobre la actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de *C. pareira* en animales normales son esca-

immunomodulatory agents². The most important areas in which it has not been possible to have any breakthrough is development of adjuvants to be used in vaccination programs or immunosuppressants which can be safely used in organ transplant cases. These basic areas of immunomodulators are currently receiving inadequate attention. A large number of plant products are being investigated for immune response modifying activity³.

Use of plants as a source of immunomodulators is still in its infancy in modern medicine. Some of the plants with known immunomodulatory activity are *Viscum album*, *Panax ginseng*, *Tinospora cordifolia*, *Asparagus racemosus* etc. Components such as polysaccharides, lectins, proteins and peptides present in plants have been shown to stimulate the immune system^{4,5}.

Cissampelos pareira Linn.(Menispermaceae) is a climbing shrub distributed throughout warm parts of Asia, East Africa, and America. The roots are reported to have found use as a diuretic, febrifuge, remedy for heart trouble, and against dysentery and soares⁶. The roots of *C.pareira* are used to prevent a threatened miscarriage, and the herb is also used to stop uterine haemorrhage⁷. The *C.pareira* showed antileukemic activity, and a novel tropoloisoquinoline alkaloid named pareirubrine A, was reported⁸. Pradhan et al.⁹, carried out pharmacological and clinical studies on hayatin methiodide from *C.pareira* for its muscle relaxant properties. Basu et al.¹⁰ reported curariform activity of hyatinin methochloride from *C.pareira*. Cissamperine and other four bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *C.Pareira* were found to show significant and reproducible inhibitory activity against human carcinoma of the nasopharynx carried in cell culture (KB)¹¹.

There is paucity of data available on immunomodulatory activity of methanol extract of *C. pareira* in normal animals. Therefore present work aims at studying effect of methanol extract of *C. pareira* on immune system.

sos. Por tanto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto del extracto de metanol de *C. pareira* sobre el sistema inmunológico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales

Se utilizaron ratones albinos suizos de ambos sexos, con un peso de entre 20 y 25 g., mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad y luz. Fueron alimentados con una dieta de roedores estándar y agua *ad libitum*.

2.2 Material de la planta y preparación del extracto

Se recogieron raíces de *C. pareira* Linn. de los jardines de la ciudad de Baroda, Gujarat, India, y se autenticaron en el Departamento de Botánica de la Universidad M.S. University de Baroda, India. La maceración de las raíces disecadas y reducidas a polvo de *C. pareira* permitió obtener un 7,75% de extracto de metanol (p/p). A continuación, el extracto de metanol obtenido se utilizó para realizar un análisis biológico. El análisis fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, fenoles y taninos, saponinas y esteroides en el extracto de metanol.

2.3 Fármacos

Las cantidades pesadas del extracto de prueba se suspendieron en un 1% de carboximetilcelulosa de sodio para preparar las formas de dosificación adecuadas. A los animales del grupo de control se les administró un volumen equivalente de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo. La ciclofosfamida se utilizó como inmunosupresor estándar.

Suspensión de tinta de carbón: Se diluyó tinta Pelican AG, Alemania, ocho veces con solución salina y se utilizó para la prueba de depuración del carbón en una dosis de 10 µl/gm de peso corporal de los ratones.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

Swiss albino mice of either sex, weighing 20-25 gms, household in standard conditions of temperature, humidity and light were used. They were fed with standard rodent diet and water *ad libitum*.

2.2 Plant material and extract preparation

Roots of *C. pareira* Linn. were collected from outfield of Baroda city, Gujarat and authenticated in Botany Department of M.S. University, Baroda. Maceration of dried, powdered roots of *C. pareira* afforded methanol extract in 7.75 % (w/w) yield. Methanol extract so obtained was then used for biological screening. Methanol extract showed presence of alkaloids, phenolics and tannins, saponins, steroids on phytochemical screening.

2.3 Drugs

Weighed quantities of test extract were suspended in 1% sodium carboxy methylcellulose to prepare suitable dosage form. The control animals were given an equivalent volume of sodium carboxy methylcellulose vehicle. Cyclophosphamide was used as a standard immunosuppressant.

Carbon ink suspension: Pelican AG, Germany, ink was diluted eight times with saline and used for carbon clearance test in a dose of 10µl/gm body weight of mice.

Antigen: Fresh blood was collected from sheep sacrificed in local slaughterhouse. Sheep red blood cells (SRBC) were washed with three times in normal saline and adjusted to a concentration 20% for immunization and 1% for challenge.

2.4 Humoral antibody (HA) response

Method described by Puri et al.¹² was adopted. Animals were divided into 6 groups of six animals each. Control group (I) received vehicle only. Animals in treatment groups (II

Antígeno: Se extrajo sangre fresca de corderos sacrificados en un matadero local. Los eritrocitos de cordero se lavaron tres veces en solución salina normal y se ajustaron a una concentración del 20% para la inmunización y del 1% para la prueba.

2.4 Respuesta de anticuerpos humorales

Se adoptó el método descrito por Puri et al.¹². Los animales se dividieron en 6 grupos de seis animales cada uno. Al grupo de control (I) sólo se le administró vehículo. A los animales de los grupos de tratamiento (II a VI) se les administró extracto de prueba (50-800 mg/kg, por vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 7 días. El día 0 los animales fueron inmunizados mediante la inyección intraperitoneal de 0,1 ml de suspensión fresca de eritrocitos de cordero al 20%. El día 7 se extrajeron muestras de sangre en tubos microcentrífugos de cada animal de forma individual del plexo retroorbital. Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención de suero. Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante la técnica de hemaglutinación. Se tomó como título de anticuerpos la muestra recíproca de la dilución más alta de los sueros de prueba que resultó positiva en aglutinación.

2.5 Respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

Se adoptó el método descrito por Puri et al.¹². Los animales se dividieron en 6 grupos de seis animales cada uno. Al grupo de control (I) sólo se le administró vehículo. A los animales de los grupos de tratamiento (II a VI) se les administró extracto de prueba (50-800 mg/kg, por vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 7 días. El día 0 los animales fueron inmunizados mediante la inyección intraperitoneal de 0,1 ml de suspensión fresca de eritrocitos de cordero al 20%. El día 7 se midió el grosor de la pata trasera derecha mediante el calibrador digital Vernier. A continuación, se les inyectaron a los ratones 20 μ l de eritrocitos de cordero al 1% en la pata trasera derecha. Se

to VI) were given the test extract (50-800 mg/kg.p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 7 days. The animals were immunized by injecting 0.1 ml of 20% of fresh sheep red blood cells suspension intraperitoneally on 0 day. Blood samples were collected in micro centrifuge tubes from individual animal by retro-orbital plexus on 7th day. Blood samples were centrifuged to obtain serum. Antibody levels were determined by haemagglutination technique. The reciprocal of the highest dilution of the test serum giving agglutination was taken as the antibody titre.

2.5 Delayed type hypersensitivity (DTH) response

Method described by Puri et al.¹² was adopted. Animals were divided into 6 groups of six animals each. Control group (I) received vehicle only. Animals in treatment groups (II to VI) were given the test extract (50-800 mg/kg.p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 7 days. The animals were immunized by injecting 0.1 ml of 20% of fresh sheep red blood cells suspension intraperitoneally on 0 day. On day 7, the thickness of the right hind foot pad was measured using digital vernier caliper. The mice were then challenged by injection of 20 μ l of 1% SRBCs in right hind foot pad. Foot thickness was again measured 24 hrs after this challenge. The difference between the pre and post challenge foot thickness express in mm was taken as a measure of DTH.

2.6 Phagocytic activity

Phagocytic index was determined as per the method reported by Gonda et al.¹³. Mice were divided into 6 groups, of six animals each. The control group (I) received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle; while animals of the treatment groups (II to VI) were given test extracts (50-800 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 5 days. Carbon ink suspension was injected via tail vein to each mouse after 48 hours of 5 days treatment. Blood samples were drawn from orbital vein at 0

midió de nuevo el grosor de la pata pasadas 24 horas. La diferencia entre el grosor de la pata antes y después de la inyección expresada en mm se tomó como medida de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).

2.6 Actividad fagocítica

El índice fagocítico se determinó de acuerdo con el método establecido por Gonda et al.¹³. Los ratones se dividieron en 6 grupos de seis animales cada uno. El grupo de control (I) sólo recibió un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento (II a VI) se les administraron los extractos de prueba (50-800 mg/kg, por vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 5 días. A cada ratón se le inyectó la suspensión de tinta de carbón a través de la vena de la cola 48 horas después del tratamiento de 5 días. Se extrajeron muestras de sangre de la vena orbital a los 0 y a los 15 minutos. La sangre (25- μ l) se mezcló con un 0,1% de carbonato sódico (2 ml) y se sometió a la determinación de densidades ópticas a 660 nm.

El índice fagocítico (K) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$$

donde OD_1 y OD_2 son las densidades ópticas en los momentos t_1 y t_2 , respectivamente.

2.7 Mielosupresión inducida por ciclofosfamida

La mielosupresión inducida por ciclofosfamida se estudió de acuerdo con el método descrito por Manjarekar et al.¹⁴. Los animales se dividieron en 7 grupos de seis animales cada uno. A los animales de los grupos de tratamiento (III a VII) se les administraron los extractos de prueba (50-800 mg/kg, por vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 13 días. Al grupo de control (I) y al grupo de la ciclofosfamida (CPM) (II) se les administró sólo un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo. En los días 11, 12 y 13, a todos los animales, excepto a los del grupo de control, se les inyectó ciclofosfamida (30 mg/kg, in-

and 15min. Blood (25- μ l) was mixed with 0.1 % sodium carbonate (2 ml) and subjected for determination optical densities at 660 nm.

The phagocytic index K, was calculated by using following equation:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$$

where OD_1 and OD_2 are the optical densities at times t_1 and t_2 , respectively.

2.7 Cyclophosphamide induced myelosuppression

Myelosuppression induced by cyclophosphamide was studied according to the method described by Manjarekar et al.¹⁴. Animals were divided into 7 groups of six animals each. Animals in treatment groups (III to VII) were given the test extracts (50-800 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methylcellulose daily for 13 days. The control group (I) and cyclophosphamide (CPM) group (II) received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle. On days 11, 12, 13 all the animals except in the control group were injected with cyclophosphamide (30mg/kg, i.p.) 1 hour after the administration of extract. Blood samples were collected on day 14 and total white blood cell (WBC) count was determined by using a haemocytometer.

2.8 Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M. and difference between the groups was statistically determined by analysis of variance followed by Tukey-Kramer Multiple Comparisons test, with the level of significance set at $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION:

Immunomodulatory activity of *C.pareira* was explored, by evaluating its effect on antibody titre, DTH response, phagocytic function and cyclophosphamide induced myelosuppression in mice. Administration of methanol extract showed immunostimulating activity.

The antibody production to T-dependent antigen SRBCs requires the co-operation of T

traperitoneal) 1 hora después de la administración del extracto. Las muestras de sangre se extrajeron el día 14 y se determinó el recuento de leucocitos totales mediante un hemocitómetro.

2.8 Análisis estadístico

Los valores se expresaron como la media \pm E.S.M. y la diferencia entre los grupos se determinó estadísticamente mediante un análisis de varianza seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, con un nivel de significación establecido en $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Se estudió la actividad inmunomoduladora de *C. pareira* mediante la evaluación de su efecto en el título de anticuerpos, la respuesta DTH, la función fagocítica y la mielosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones. La administración del extracto de metanol mostró actividad inmunoestimuladora.

La producción de anticuerpos frente a los eritrocitos de cordero (SRBC, antígeno T-dependiente) requiere la cooperación de los macrófagos y los linfocitos B y T¹⁵. Los resultados obtenidos durante la presente investigación no mostraron un efecto significativo sobre la producción de anticuerpos en respuesta a los eritrocitos de cordero con las dosis analizadas; sin embargo, con dosis inferiores se consiguió descenso del título de anticuerpos humorales. Los resultados indicaron que el fármaco no tenía ningún efecto sobre el «brazo humoral» del sistema inmunitario.

El extracto de metanol administrado de forma oral mostró un aumento lineal dosis-dependiente de la respuesta DTH hasta la dosis de 400 mg/kg; no obstante, se pudo obtener un aumento estadísticamente significativo en las dosis de 200 y 400 mg/kg ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente). En las dosis de 800 mg/kg, la respuesta DTH se redujo ligeramente (Fig. 1c).

La respuesta DTH es específica del antígeno y causa eritema e inducción en el lugar de la inyección del antígeno en animales inmunizados. La histología de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) puede variar según

and B-lymphocytes and macrophages¹⁵. Results obtained during present investigation showed no significant effect on antibody production in response to SRBCs at doses tested rather lower doses decreased HA titre. Results indicates drug do not have any effect on humoral arm of immunity.

Methanol extract when administered orally showed a linear dose dependent increase in DTH response up to 400 mg/kg, however statistically significant increase could obtained at 200 and 400 mg/kg doses ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively). At 800 mg/kg DTH response was slightly reduced (Fig 1c).

DTH is antigen specific and causes erythema and induction at the site of antigen infection in immunized animals. The histology of DTH can be different for different species, but the general characteristics are an influx of immune cells at the site of injection, macrophages and basophils in mice and induction becomes apparent within 24-72 hours. T-cells are required to initiate the reaction¹⁶.

Increase in the DTH response indicates that drug has a stimulatory effect on lymphocytes and necessary cell types required for the expression reaction¹⁷. DTH response, which is direct co-relate of cell-mediated immunity, was significantly increased as compared to untreated control.

C.pareira mainly contains bisbenzoylisoquinoline alkaloids. In more recent research, the bisbenzylisoquinoline alkaloids have been found to be anti-inflammatory constituents of *C.pareira*. In clinical experiments, the alkaloids suppressed the production of nitric oxide, a critical mediator in inflammation, which explain some aspects of the anti-inflammatory mechanisms present in the alkaloids of *C.pareira*¹⁸. Results obtained here showed increased paw edema when challenged with SRBCs, indicating different compounds may be responsible for this action.

Methanol extract enhanced the clearance rate of carbon particles from the circulation in normal animals. Increase in phagocytic index was linear up to 200 mg/kg. Increase in phagocytic index at lower doses (50 and 100 mg/kg) was non significant, at higher doses increase was significant ($p < 0.001$) (Fig 1a). Minimum effective dose was 200 mg/kg. The increase in carbon clearance index reflects the

la especie, pero las características generales son la llegada de células del sistema inmunológico al lugar donde se realizó la inyección, macrófagos y basófilos en el caso de los ratones, y una inducción evidente a las 24-72 horas. Las células T son necesarias para iniciar la reacción¹⁶.

El aumento de la respuesta DTH muestra el efecto estimulador del fármaco sobre los linfocitos y los tipos de células necesarios para la reacción de expresión¹⁷. La respuesta DTH, que es el correlato directo de la inmunidad celular, aumentó significativamente en comparación con el grupo de control no tratado.

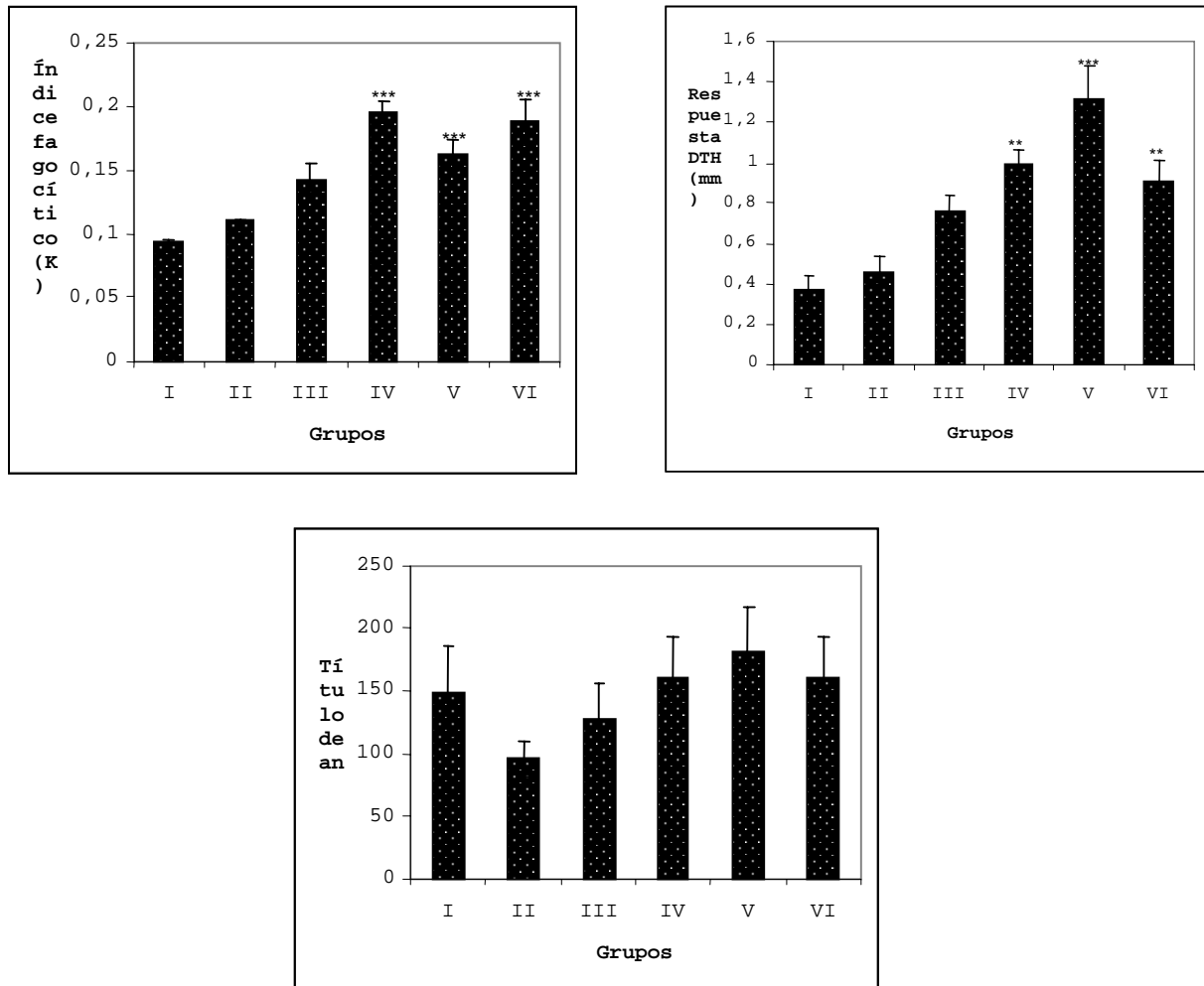
C. pareira contiene principalmente alcaloides de bisbenzilisquinolina. En investigaciones más recientes, se ha detectado que los alcaloides de bisbenzilisquinolina son constituyentes antiinflamatorios de *C. pareira*. En los experimentos clínicos, los alcaloides suprimieron la producción de óxido nítrico, un mediador de gran importancia en los procesos inflamatorios, lo que explica algunos aspectos de los mecanismos antiinflamatorios presentes en los alcaloides de *C. pareira*¹⁸. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un aumento del edema de la pata cuando se administraron los eritrocitos de cordero, lo que resultó indicativo de que los responsables de esta acción pueden ser componentes distintos.

El extracto de metanol mejoró la velocidad de depuración de las partículas de carbón de la circulación en los animales normales. El aumento del índice fagocítico fue lineal hasta las dosis de 200 mg/kg. El aumento del índice fagocítico en dosis inferiores (50 y 100 mg/kg) no fue significativo, mientras que en dosis más elevadas el aumento sí fue significativo ($p < 0,001$) (Fig. 1a). La dosis de 200 mg/kg fue la dosis mínima eficaz. El aumento en el índice de depuración del carbón reflejó la mejora de la función fagocítica de la inmunidad no específica y de los macrófagos mononucleares. La fagocitosis por macrófagos es importante frente a los microorganismos patógenos y su efectividad se ve notablemente mejorada gracias a la opsonización de los parásitos mediante los anticuerpos y el complemento C3b, lo que hace que se eliminen parásitos de la sangre más rápidamente^{19,20}.

enhancement of phagocytic function of mononuclear macrophage and non-specific immunity. Phagocytosis by macrophages is important against pathogenic microorganisms and its effectiveness is markedly enhanced by opsonisation of parasite with antibodies and complement C3b leading to more rapid clearance of parasite from blood^{19, 20}.

FIGURA 1. Efecto del extracto de metanol de *C. pareira* sobre el índice fagocítico (1a), la respuesta DTH (1b) y el título de anticuerpos humorales (1c).

FIGURE 1. Effect of methanol extract of *C.pareira* on phagocytic index (1a), DTH response (1b) and HA titre (1c).



Los valores se expresan como la media \pm ESM. (n = 6)

El grupo de control (I) se comparó con los grupos tratados (II-VI).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001;

Values are expressed as mean \pm SEM. (n = 6)

Control group (I) was compared with treated groups (II-VI).

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001;

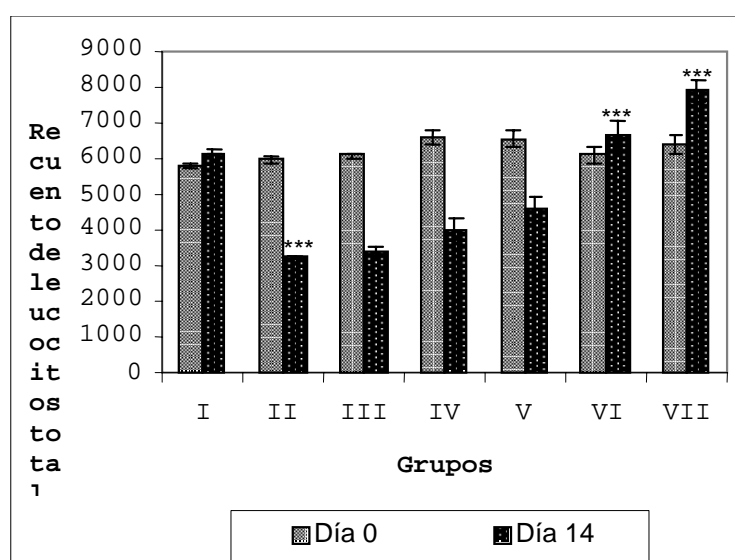
Se observó una disminución significativa en el recuento de leucocitos en los animales tratados con ciclofosfamida ($p<0,001$) (Fig. 2). La mielosupresión inducida por ciclofosfamida se contrarrestó con el extracto de metanol de *C. pareira* de una forma dosis-dependiente y se observó un aumento de los niveles de leucocitos en comparación con el grupo de la ciclofosfamida. Dosis más elevadas, es decir, de 400 y 800 mg/kg, pudieron normalizar los

Significant reduction in white blood cell counts was observed in animals treated with cyclophosphamide ($p<0.001$) (Fig 2). Cyclophosphamide induced myelosuppression was counteracted by methanol extract of *C.pareira* in dose dependent manner with increase in levels of WBC compared to cyclophosphamide group. Higher doses i.e. 400 and 800 mg/kg could bring the levels of WBC to normal ($p<0.001$ and 0.01 respectively).

niveles de leucocitos ($p < 0,001$ y $0,01$ respectivamente).

FIGURA 2. Efecto del extracto de metanol de *C. pareira* sobre la mielosupresión inducida por ciclofosfamida (recuento de leucocitos total).

FIGURE 2. Effect of methanol extract of *C.pareira* on cyclophosphamide induced myelosuppression (Total WBC).



Los valores se expresan como la media \pm ESM. ($n = 6$)

El grupo de control (I) se comparó con el grupo de la ciclofosfamida (II).

El grupo de la ciclofosfamida (II) se comparó con los grupos (III – VII), que recibieron distintas dosis del extracto.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$;

Values are expressed as mean \pm SEM. ($n = 6$)

Control group (I) was compared with CPM (II) group.

CPM group (II) was compared with groups (III – VII) receiving different doses of extracts.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$;

La médula ósea es un lugar de continua proliferación y renovación de células sanguíneas y es una fuente de células involucradas en la reactividad inmunológica. Un elevado grado de proliferación celular convierte a la médula ósea en un destino especialmente sensible a los fármacos citotóxicos. De hecho, la médula ósea es el órgano más afectado durante cualquier terapia de inmunosupresión con esta clase de fármacos. La pérdida de células madre y la incapacidad de regeneración de nuevas células sanguíneas de la médula ósea se traducirán en trombocitopenia y leucopenia²¹. Este resultado indica una modulación de la actividad de la médula ósea, una estimulación para contrarrestar la mielosupresión por ciclofosfamida.

Bone marrow is a site of continued proliferation and turnover of blood cells and is a source of cells involved in immune reactivity. A high degree of cell proliferation renders bone marrow a sensitive target particularly to cytotoxic drugs. In fact bone marrow is the organ most affected during any immunosuppression therapy with this class of drug. Loss of stem cells and inability of bone marrow to regenerate new blood cells will result in thrombocytopenia and leucopenia²¹. This result indicates modulation of bone marrow activity, stimulation to counteract cyclophosphamide myelosuppression.

In conclusion, *C.pareira* has stimulatory effect on cellular immunity, no effect on humoral immunity, stimulated phagocytosis and also

Como conclusión, *C. pareira* mostró un efecto estimulador sobre la inmunidad celular y ningún efecto sobre la inmunidad humoral, estimuló la fagocitosis y también ofreció protección frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida. En la actualidad es difícil establecer una correlación entre esta actividad inmunomoduladora y sus constituyentes. Ya se ha realizado el aislamiento de estos constituyentes y este tema continuará apareciendo en nuestras comunicaciones futuras.

AGRADECIMIENTOS

A.R.Bafna desea dar las gracias a CSIR, Nueva Delhi, India, por su ayuda financiera (SRF) para el desarrollo de este trabajo.

offered protection against cyclophosphamide induced myelosuppression. At present it is difficult to co-relate this immunomodulatory activity with its constituents, isolation of constituents already taken up and shall follow in future communications.

ACKNOWLEDGEMENTS

A.R.Bafna wishes to thank to The CSIR, New Delhi, India for providing financial assistance (SRF) for carrying out this work.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Patwardhan, B., Kalbagh, D., Patki, P.S., Nagsampagi, B.A., 1990. Search of immunomodulatory agents: a review. *Indian Drugs* 28(2), 56-63
2. Wagner H. Proceedings of Alfred Benzon Symposium 1983; Vol. 20, pp. 559.
3. Upadhyay SN. Proceedings of the International Ayurveda Conference- 97. 1997; Sanjay Gandhi Post Graduate Institute of Medical Sciences, Lucknow. pp.10.
4. Haijto T, Hostanska K, Gabius HJ. *J.Cancer Research* 1989; 49: 4803-4808.
5. Kuttan G, Kuttan R. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract. *Immunol.Invest* 1992; 21: 285-296.
6. Chopra RN. *Indigenous Drugs of India*. , Calcutta: V.N.Dhur and Sons, 2nd edition, 1958.
7. Lewis WH. *Medical Botany*. Inc. New York: John Wiley and Sons, 1977:324.
8. Morita, H., Matsumoto, K., Takeya, K., Itokawa, H., Iitaka, Y., 1993. A novel antileukemic tropolisoquinoline alkaloid, pareirubrine, from *Cissampelos pareira*. *Chemistry Letters* 339- 342.
9. Pradhan SN, De NN. *Br.J.Pharmac.Chemother* 1953; 36: 399.
10. Basu DK. Studies on curariform activity of hayatinin methochloride, an alkaloid of *Cissampelos pareira*. *Jpn J Pharmacol*, 1970; 20: 246-252.
11. Kupachan SM, Patel AC, Fujita E. Tumor inhibitors. VI. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J Pharm Sci*, 1965; 54[4]: 580-583
12. Puri A, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. Immunostimulant activity of *Nyctanthes arbortristis* L. *J. Ethnopharmacol*. 1994; 42: 31-37.
13. Gonda R, Tomoda M, Shimizu N, Kanari M. Characterization of an acidic polysaccharide from the seeds of *Malva verticillata* stimulating the phagocytic activity of cells of the RES. *Planta Medica*. 1990; 56: 73-76.
14. Manjarekar PN, Jolly CI, Narayanan S. Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*. *Fitoterapia*. 2000; 71: 254-257.
15. Benacerraf B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and Borrower lymphocytes. *J. Immunol*. 1978; 120: 1809-1832.
16. Poulter LW, Seymour GJ, Duke O, Janossy G and Panayi G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol*. 1982; 74:358-69.
17. Mitra SK, Gupta M, Sarma DNK. Immunomodulatory effect of IM-133 *Phytother. Res.* 1999; 13:341-343.
18. Kondo Y, Takano F, Hojo H. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1887-1892.
19. Kende M. Role of macrophages in the expression of immune responses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982; 181, 1037 - 1042.
20. Tiwari U, Rastogi B, Singh P, Saraf DK, Vyas SP. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol* 2004; 92: 113-119.
21. Agarwal R, Diwanay S, Patki P, Patwardhan B. Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. *J. Ethnopharmacol*. 1999; 67: 27-35.