

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**"MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES
BALB/c CON LINFOMA MURINO L5178Y TRATADOS CON
ACIBAR DE *Aloe vera*.**

TRABAJO QUE CON CARÁCTER DE
TESIS DOCTORAL
P R E S E N T A
ARTURO OROZCO BAROCIO
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
AREA INMUNOBIOLOGIA
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. MAYO DE 1998

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOBIOLOGIA DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CENTRO
UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

BAJO LA DIRECCION DEL Dr. VITALY ARION
Y EL ASESORAMIENTO DE LA Dra. GALINA ZAITSEVA PETROVNA.

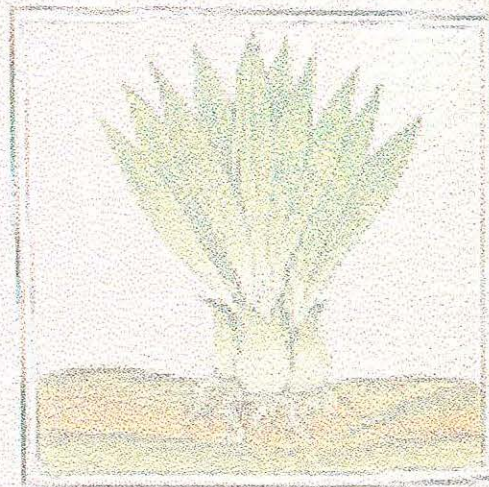
LIBRO

INDICE



MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE DE
RATONES BALB/c CON LINFOMA MURINO L5178Y

TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera*



Para Mercedes, Arturo, Iván Alejandro y Ricardo

Con Amor . . .

Ana María Puebla Pérez,

Irma Verónica Arceta González,

Azucena Chavez Anaya.

Gracias . . .

Dr. Vitaly Arion,

especialmente a la

Dra. Galina Zaitseva . . .

Muchas Gracias.

A mis sinodales . . .

Tambien gracias.

INDICE.

RESUMEN	01
INTRODUCCION	02
ANTECEDENTES	05
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
METODOLOGIA	15
RESULTADOS	25
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	41
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	42
BIBLIOGRAFIA.	43

TABLA DE ABREVIATURAS

DL ₅₀	Dosis letal 50
DNFB	Dinitrofluorobenceno
DS	Desviación estándar
EC	Eritrocitos de carnero
ID	Indice digestivo
IF	Indice fagocítico
Ip	Intraperitoneal
IL-3, 4 y 6	Interleucinas 3, 4 y 6.
IFN- γ , α	Interferón gamma (γ), alfa (α).
M-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
MA	Macrófagos alveolares
MP	Macrófagos alveolares
MP	Macrófagos peritoneales
NK	Linfocitos asesinos naturales
ON	Oxido nítrico
Og	orogastrica
P/v	presión / volumen
RIC	Respuesta inmune celular
RIH	Respuesta inmune humoral

SBH	Solución balanceada de Hanks
Ss	Solución salina
T _{DTH}	Linfocitos de hipersensibilidad retardada
TLC	cromatografía en placa fina
v.	vía de introducción de alguna sustancia

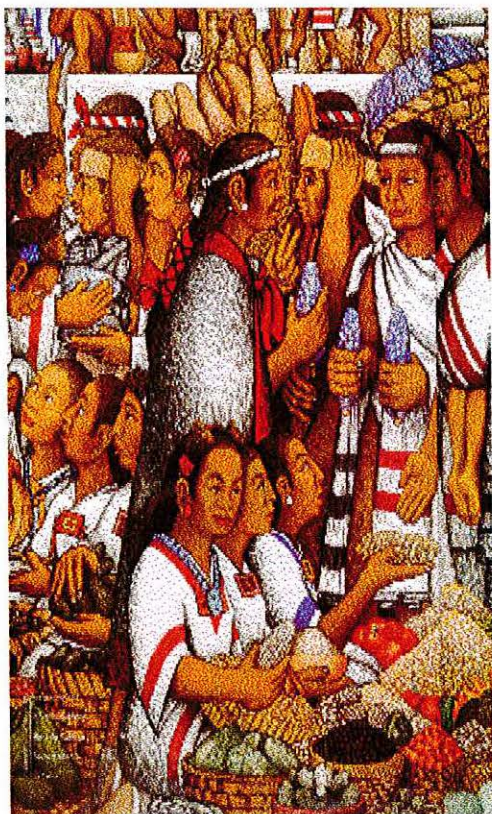
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES BALB/c CON LINFOMA MURINO L5178Y TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera*.

RESUMEN

La tradición cultural y la gran variedad de plantas en México han permitido su utilización con fines medicinales, estableciéndose como práctica que se viene realizando desde la época precolombina hasta nuestros días constituyendo una opción más para tratar enfermedades. Sus resultados siguen siendo importantes para el restablecimiento y mantenimiento de la salud humana y animal. Muchos de los vegetales de la flora mexicana tienen aparente efecto modulador de la respuesta inmune en los mamíferos que se manifiesta por la recuperación de enfermedades que están implicadas con procesos inmunológicos como: asma, artritis, infecciones virales, micóticas y bacterianas, inflamaciones y cáncer, entre otras. En este proyecto se realizaron estudios sobre la respuesta inmune específica e inespecífica de ratones BALB/c, sanos e inmunosuprimidos con linfoma murino L5178Y y ciclofosfamida tratados con acíbar de *Aloe vera*, se observó que los animales inmunosuprimidos tratados con el extracto crudo de acíbar lograron una restitución igual a los parámetros obtenidos en los ratones sanos, en la respuesta inmune celular y en la fagocitosis, en cambio, la inmunidad humoral no se vio restablecida, al igual que los tratados con ciclofosfamida. Así mismo, en los roedores sanos tratados con el extracto se observó una estimulación en su respuesta inmune, específica e inespecífica, los resultados fueron diferentes significativamente con los obtenidos en los ratones no tratados.

INTRODUCCION

El conocimiento y utilización de las plantas por las sociedades humanas tiene una larga e interesante historia, reconociéndose que desde siempre los vegetales satisfacen diversas necesidades y una de ellas es la recuperación y el mantenimiento de la salud.



Por otra parte, la medicina prehispánica estuvo íntimamente vinculada a la religión y la magia, de manera que los pueblos mesoamericanos asociaron e identificaron cualidades y poderes de plantas, animales y elementos de la naturaleza a los de sus divinidades. En la actualidad existen amplios sectores sociales interesados en las plantas medicinales, entre ellos se cuenta desde quienes tienen un interés meramente pragmático hasta los estudiosos e investigadores con un alto nivel de especialización en los distintos ámbitos de conocimiento, donde se puede acercar a este objeto de estudio. Uno de estos es la etnobotánica, ciencia que aborda las relaciones

históricas entre las sociedades humanas y el entorno vegetal bajo un enfoque de investigación multidisciplinaria (Rodríguez-Chávez, 1996).

Hoy en los países industrializados, la cuarta parte de los fármacos empleados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales. Por cuestiones de salud pública y sobre todo del tratamiento médico en forma precisa y el bajo costo de las medicinas

de patente (por la producción en masa y síntesis química controlada), se provocó el distanciamiento a utilizar los extractos de plantas (Lozoya, X., 1997).



En los años setenta la Organización Mundial de la Salud (OMS) impulsó la investigación de las plantas medicinales cuando prestó atención a los éxitos alcanzados por China, en la solución a sus problemas de salud pública. La reducción de sus índices de mortalidad infantil que era de 200 por

cada 1000 infantes, en 1949 a 12 por cada 1000 en 1970; la tasa de mortalidad que en 1949 era de 25 por cada 1000 habitantes, en 1970 bajó a 6.2 por 1000. En el esquema empleado por China, el uso de las plantas medicinales tenía una importancia determinante. El resultado de la combinación pragmática de remedios herbolarios (tisanas, infusiones, maceraciones, tés, etc.) y la medicina occidental (rayos X, antibióticos, etc) resultó altamente eficaz (Lozoya, X., 1997), aunado, también, al desarrollo tecnológico aplicado a la ingeniería ambiental y a la salud pública.

Aloe vera (sábila) es una planta que ha sido utilizada para el tratamiento de múltiples padecimientos desde los antiguos egipcios (333 antes de Cristo), (Haller, J.S., 1990); en México fue introducida por los españoles en la conquista, (S. XVI), y la población la utilizaban para tratar fracturas, erisipelas, llagas, asma y parásitos intestinales (Rodríguez-Chávez y Gómez-Campos, 1996). En nuestros días, también es empleada en afecciones degenerativas en las que se involucra el sistema inmune (Stuart, R. W., et al, 1997; López-Coronado, 1994; Vázquez, B., et al, 1996; Hutter, J. A., et al, 1996; Linares, y Bye, 1990; Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, T.III, 1994; Granados-Sánchez, 1988).

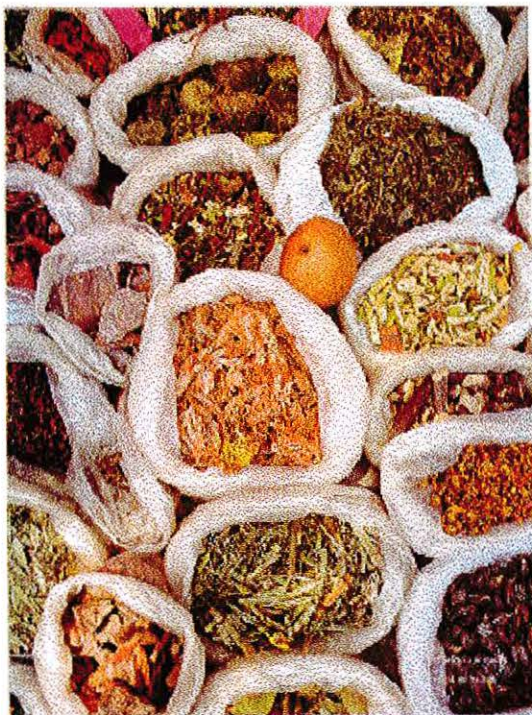
En la actualidad la investigación inmunológica esta orientada hacia el estudio de los procesos de inmunorregulación en los seres vivos, a partir de productos biológicos de origen animal, esto se debe, en parte, al descubrimiento de la función inmunorreguladora del timo por Osoba y Miller en 1963. En los años setentas, todos los países desarrollados iniciaron los trabajos de investigación con sustancias inmunotrópicas procedentes de extractos del timo, de las cuales actualmente se conocen cerca de quince, nombradas como hormonas tímicas (Levey, 1964). Es hasta los inicios de la década de los noventas, que también se utilizan sustancias de origen vegetal con la intención de conocer sus efectos inmunomoduladores (Wagner, 1995).

El interés hacia estas sustancias existe no únicamente por razones de uso clínico, sino también por su utilización en los estudios básicos que ayudan en la comprensión de los mecanismos moleculares de la inmunorregulación (Arion, 1985).

El estudio científico de esta especie, con uso etnobotánico como medicamento de enfermedades degenerativas, es el inicio de una línea de investigación que nos permita desarrollar una industria médica alternativa de fitofármacos (Lozoya, 1997) con el uso sustentable de las especies que se utilicen; una vez que se hayan determinado sus usos y propiedades, evitando así, la explotación desmedida de estas.

ANTECEDENTES

Hoy en día la humanidad se enfrenta con una de la más graves crisis de su historia, debido a la creciente demanda de los recursos renovables y no renovables, por el crecimiento poblacional, tanto por la necesidad de nuevos alimentos y nuevos medicamentos como de otras materias primas de gran importancia para la industria en



general. Como una consecuencia de esto, el futuro de la humanidad dependerá de una manera cada vez menos estrecha del uso de los recursos naturales, especialmente los renovables (Lefft, 1995). México no es ajeno al problema. Teóricamente tenemos numerosas alternativas para resolverlo, ya que contamos con una gran diversidad biológica que es uno de los patrimonios más importantes del país. Somos poseedores de un número notable de especies silvestres, de grupos de plantas tan importantes como los pinos, cactaceas, agaves, encinos, y

dioscoreas. Sin embargo la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos, medicinas y otras materias primas requiere de conocimientos más precisos de los recursos biológicos existentes y la necesidad de programas de investigación que permitan lograr y alcanzar las metas de un racional aprovechamiento de nuestros recursos naturales renovables (Gómez Pompa, 1976).

De Las plantas para la explotación de principios activos, en primer lugar destacan las que producen los cardiotónicos: digitoxina, digoxina y ouabaína, los cuales se importan con un alto valor comercial, 24.50 dólares/g, 61.90 dólares/g, y 54.50 dólares/g (Catalogo Sigma 1996), respectivamente, los cuales son obtenidos de plantas de Africa o Cuba.

Por ejemplo la emetina es utilizada para las grandes endemias del país, como lo son la amibiasis y el paludismo. Este medicamento se produce principalmente en Brasil, Colombia y Centroamérica. En nuestro país existen plantas que se recomiendan para estos usos, para la amibiasis, amargos de Simarubáceas (Chaparro Amargoso, Quasia, etc.), para el paludismo copalchis de Rubiáceas (Coutarea, Exostema, etc.) (Lewis,1977; Giral Glez,1976)), de las que no se ha realizado una investigación a fondo.

Por otra parte, las enfermedades crónico-degenerativas como: autoinmunidad, cáncer, alergia, infecciones virales, entre otras, no han sido tratadas con mucho éxito con la medicina alopática. Existen evidencias de estudios etnobotánicos donde se han reportado tratamientos de dichas enfermedades con plantas medicinales con resultados muy favorables (Borchers, A.T., 1997; Wagner, H.K.M., 1995; Wagner, y Farnsworth, 1994).

En los últimos años se reportan estudios sobre plantas con propiedades inmunomoduladoras, principalmente en Japón (Mori,1995; Hashimoto, 1994; Kondo, 1994;Lee, 1995), China (Borchers, A.T., 1997), India (Suresh,1994; De,1994; Garg,1994; Kumar,1994), Alemania (Wagner,1994; Gabius.1994; Sevdson,1994), Estados Unidos de Norteamérica (Han-dong Sun, 1996 ; Jinping L. McCormick, 1996), Arabia Saudita (Essam Abdel Sattar, 1996), Francia (D. Lesuisse, 1996) e Iberoamérica: España (Slowing, 1994), Argentina (Courreges,1994; Pomillo,1994) . En México se han publicado estudios sobre plantas con otros efectos fisiológicos, Bah y col. investigan la presencia de alcaloides pirrólicos hepatotóxicos en plantas para uso medicinal (Bah, M.,1994). Específicamente, en Jalisco, se ha trabajado sobre plantas anticonvulsiantes (Navarro-Ruíz,1994). Pero la información sobre inmunomoduladores de origen vegetal en México es escasa, y en particular, en Jalisco es completamente ausente; es lamentable, considerando, que la mayoría de las enfermedades crónico-degenerativas, arriba mencionadas, son acompañadas de estados de inmunodeficiencia.

En los últimos años el interés por la inmunorregulación ha crecido tanto que se han acuñado términos como "inmunoestimulantes" y "Adaptógenos" que describen drogas capaces de aumentar la resistencia del organismo contra agentes estresantes de diferente origen (Wagner, H.K.M., 1995). Wagner establece que un inmuoestimulante es activado por mecanismos no específicos, e influye sobre la respuesta inmune celular y humoral, estimulándola generalmente de manera no dependiente de antígeno. Los inmunomoduladores son eficientes tanto como profilácticos como terapéuticos y sus resultados son óptimos cuando se aplican a dosis bajas (Arnason et al, 1995). Estas características no se conocen o no son observadas en la mayoría de los medicamentos de patente, por lo que es importante estudiarlas en los principios activos obtenidos de las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional (Wagner en *Phytochemistry of medicinal plants*, Arnason, J.T., et al, 1995).

Sell define la inmunomodulación como una modificación inducida de la inmunidad por sustancias naturales, químicos sintéticos o radiaciones; así mismo, por antígenos específicos, anticuerpos, por acción de linfocinas, citocinas y por neuropéptidos (Sell, 1996).

La respuesta inmune puede ser afectada en varios niveles por diferentes agentes. La modulación de la inmunidad puede afectar la inducción, la expresión, la amplificación o la inhibición de las fases aferente, central y eferente.

La **FASE AFERENTE** incluye: el reconocimiento y procesamiento del antígeno, y la interacción de las células linfoides. La **FASE CENTRAL** comprende la función de las células cooperadoras y supresoras; la proliferación de las poblaciones de células respondedoras; la diferenciación de células efectoras, y la síntesis de productos inmunes, tales como linfocinas y anticuerpos; y La **FASE EFERENTE** que establece las reacciones mediadas por células T; reacciones antígeno-anticuerpo, y el sistema complementario efector [macrófagos, células cebadas (mastocitos) y actividad del complemento] (Sell, S., 1996).

La inmunomodulación puede ser específica, limitada a un antígeno dado, o inespecífica, con un efecto general sobre la respuesta inmune. Se han hecho muchos intentos por aumentar o inhibir dicha respuesta en humanos y animales de experimentación. La estimulación terapéutica es deseable en algunos casos, tales como en pacientes que sufren de inmunodeficiencias; mientras que la supresión inmunológica es dirigida a pacientes receptores de transplantes o con enfermedades autoinmunes (lupus, esclerosis múltiple, etc.) (Sell, S.,1996; Roit, I., 1991). La inmunomodulación específica puede ser estimulada activamente por la introducción de vehículos inmunógenos, como los adyuvantes, que pueden incrementar o modificar la respuesta a un antígeno dado. Así mismo, la inmunoestimulación específica puede ser producida pasivamente por la transferencia de productos inmunes (células o anticuerpos) o por factores que afectan específicamente la respuesta (factor de transferencia, antisueros). Por otro lado, la modulación de la respuesta inmune puede ser suprimida, en forma específica, por la administración de antígenos, en una forma o por una vía que suprima la inducción de la inmunidad (tolerancia), o por cambios de la actividad de una forma a otra (desviación inmune) (Sell, S.,1996).

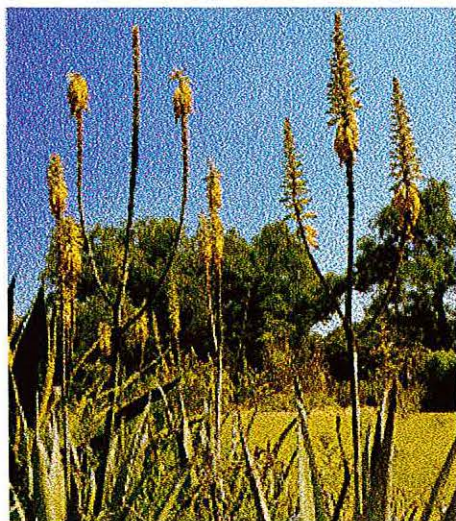
La inmunoestimulación puede ser alcanzada, en forma inespecífica, por la administración de agentes, como el interferón, interleucinas o citocinas que incrementan algunos componentes de la respuesta inmune no envueltos en el reconocimiento específico de antígenos. Tales agentes, generalmente actúan sobre algún tipo de células complementarias, como el macrófago o las células asesinas naturales (NK). La supresión no específica de la respuesta inmune puede ser activada por agentes que interfieren con la inducción o expresión de ella. Estos agentes incluyen radiación, drogas (esteroides, antimetabolitos, ciclosporinas) y agentes inmunes como los sueros antilinfocitos o antimacrófagos, o anticuerpos monoclonales (Sell, S.,1996; Roit, I., 1991).



Aloe vera (Sábila) (fig. 1) pertenece a la familia Liliaceae, es una planta nativa de Africa ampliamente cultivada en México y en nuestra región se ha aclimatado ampliamente. Es una hierba perenne, acaulescente, con aspecto de Maguey; su HOJA es simple alterna, dispuesta en espiral, verde glauca, delgada-lancelada, de 30 a 70 cm de largo, lisa succulenta, ápice largamente acuminado con espina terminal, dentada sésil; su INFLORESCENCIA es en racimo de 60 a 80 cm de largo con más de 50 flores; la FLOR es bisexual, perianto de 6 sépalos, connato, aproximadamente de 2 cm de largo, amarillo verdoso, con estambres, ovario súpero, 3 locular, estigma trifurcado. *Aloe vera* y *Aloe barbadensis* son sinonimias, siendo el primero el nombre correcto de dicha especie de *Aloe* (Linares, Bye, 1990; Lotschert, 1983; Granados-Sánchez, 1988).

Fig. 1. *Aloe vera* con inflorescencia

Aloe vera (L) se ha utilizado para el tratamiento de artritis, quemaduras, diabetes, acné, cicatrización de heridas, bronquitis crónica y otros padecimientos (Linares, Bye,

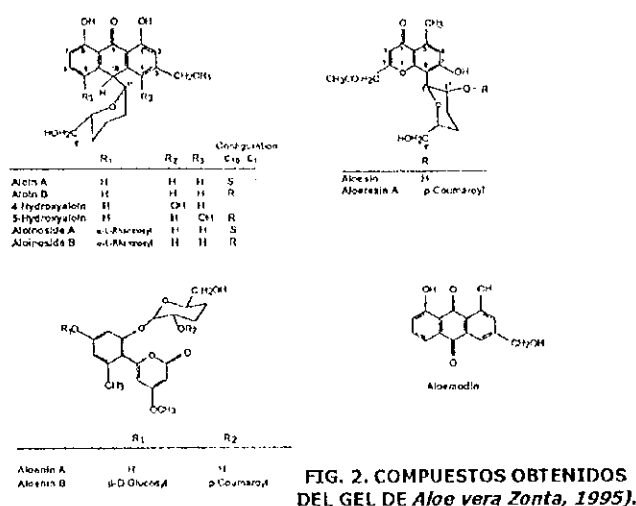


1990; Lotschert, 1983; Granados-Sánchez, 1988; Rodríguez-Chávez, 1996; Haller, J. S., 1990). El gel fresco, obtenido del tejido parenquimatoso de las hojas se ha caracterizado como un compuesto emoliente de unidades "manurónicas" y "glucurónicas". Dicho gel ha demostrado ser antibiótico, astringente, coagulante, inhibidor del dolor, bactericida y antiviral (Granados-Sánchez, 1988; Peng, S. Y., et al, 1991; Vázquez, B., et al, 1996; Syed, T. A., et al, 1996). Los extractos

acuosos, clorofórmicos y etanólicos del gel de *A. vera*, han mostrado efectos antiinflamatorios (Vázquez, B., et al, 1996; Hutter, J. A., et al, 1996); de igual forma, en modelos experimentales de inflamación de la cápsula sinovial por la administración de carragenina, animales tratados con el gel de *A. vera* han mejorado hasta en un 50% del proceso inflamatorio y se ha visto un aumento de la proliferación de fibroblastos, los que producen una reparación del daño sinovial (Davis, R. H. Et al, 1992). Se ha encontrado una glicoproteína que inhibe marcadamente la artritis (Granados-Sánchez, 1988; Womble et al, 1988) y que promueve la proliferación, *in vitro*, de células dérmicas humanas y de riñón de hámster (Yagi, A., et al, 1997); así mismo, los centrifugados de extractos de *A. vera* han inhibido el crecimiento de células tumorales (Peng, S.Y., et al, 1991); sin embargo promovieron el crecimiento de células normales (Granados-Sánchez, 1988). Además, ciertos carbohidratos tales como acemmanan, extraído de la pulpa de *A. vera*, actúan estimulando, tanto macrófagos, como linfocitos T (Womble et al, 1988); también se ha visto que, este polisacárido de manosas, estimula la actividad fagocítica y digestiva, *in vitro*, de los macrófagos peritoneales de ratón contra *Cándida albicans* (Stuart, R. W., et al, 1997) así como la producción de óxido nítrico, por parte de los macrófagos de pollo (Karaca, K., et al, 1995); este mismo polisacárido ha sido utilizado para prevenir y tratar las quemaduras producidas por los rayos X en pacientes tratados con radioterapia (Roberts, D., B., 1995); además que, tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibe la replicación de VIH (Kahlon, J.P., et al, 1991) y de retrovirus causantes de leucemias felinas (Sheets, M.A., et al, 1991).

La mayoría de los estudios realizados con *A. vera*, son a partir del gel obtenido del tejido parenquimatoso de sus hojas, pero los estudios etnobotánicos nos muestran que muchos de los tratamientos son realizados a base de la savia de las hojas, llamado "Acíbar", el cual es utilizado en muchas formas, que va de tomado con jugo de piña hasta en forma tópica para la curación de heridas y quemaduras (Granados-Sánchez, 1988; Rodríguez-Chávez, 1996; Linares, Bye, 1990; Haller, J. S., 1990; Roberts, D., B., 1995).

Aloe vera es una especie silvestre con notable importancia en el uso herbolario cuyos estudios sobre sus características físico-químicas son muy escasos, Yamaguchi reporta que *A. vera* pertenece al grupo de vegetales ricos en calcio por el alto contenido en el gel del tejido parenquimatoso de las hojas. Además, mediante una extracción del gel liofilizado, con solventes orgánicos (n-exano y acetona) se obtuvieron 3 fracciones aceitosas que fueron analizadas en cromatografía de ionización, obteniendo una gran variedad de compuestos como ácidos grasos, ácidos orgánicos, hidrocarburos lineales y aromáticos (Yamaguchi, et al, 1993).



De igual forma, Zonta y col., caracterizan algunos de los compuestos que constituyen al gel de *A. vera* como Aloin, que es una mezcla de 2 diastereoisómeros: aloin A y aloin B; otros compuestos, también importantes, son el aloeresin A y B; aloemodin; el 4-hidroxyaloin, 5-hidroxyaloin,

aloenin A y B, entre otros (Fig. 2). De los cuales no se ha determinado, aún cuál actividad curativa de *Aloe vera* corresponde a cuál compuesto (Zonta, y col., 1995).

Además, los mecanismos biológicos de su acción no son claros y existen pocas investigaciones en el ámbito celular y de bioensayos sobre su actividad inmunotrópica que darían soporte científico para su aceptación por la medicina oficial. De igual forma faltan estudio científicos para ser aprobada por la comunidad médica, como una alternativa en el tratamiento de enfermedades degenerativas proporcionando una presentación farmacéutica adecuada y de menor costo que la medicina de patente importada.

Una de las más importantes propiedades de las sustancias inmunotrópicas naturales de origen vegetal son los pocos efectos secundarios, que siempre presentan los inmunomoduladores sintéticos. El uso comercial de las sustancias obtenidas de esta y otras plantas medicinales (fitofármacos; Lozoya, 1997) establecerá la vinculación entre la investigación y la producción permitiendo que este enlace se vea precedido por el objetivo de la sustentabilidad, y no solo por las presiones que actualmente dominan, en el sentido de mercantilizar la ciencia y la tecnología surgida en las Universidades.

El presente trabajo tuvo como propósito estudiar la respuesta inmune específica e inespecífica de ratones BALB/c, sanos e inmunosuprimidos con linfoma murino L5178Y y ciclofosfamida tratados con acíbar de *Aloe vera*. La acción inmunomoduladora del acíbar fue valorada por las reacciones de hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno y por la prueba de hemaglutinación de eritrocitos de carnero. Además se evaluó la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares.

CUCBA



BOGOTÁ, COLOMBIA



BIBLIOTECA CENTRAL

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aloe vera se ha utilizado desde tiempos inmemoriales como una planta medicinal en múltiples afecciones donde el sistema inmune se ve comprometido; en la actualidad se conoce que el gel de sábila, obtenido de las hojas, contiene varios compuestos, que han mostrado tener actividades de antibióticos, antivirales, antiinflamatorios, promover la proliferación de células dérmicas *in vitro*, la inhibición de células tumorales y la estimulación de macrófagos, entre otras; pero se desconoce si el acíbar (savia) de *Aloe vera* tiene efecto inmunomodulador en ratones BALB/c inmunosuprimidos por el linfoma murino L5178Y y por ciclofosfamida.

HIPOTESIS

El acíbar de *Aloe vera*, es capaz de modular la respuesta inmune específica (celular y humoral) e inespecífica (fagocitosis) en ratones BALB/c, sanos e inmunosuprimidos con el linfoma murino L5178Y.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto del acíbar de *Aloe vera* sobre la respuesta inmune específica (celular y humoral) e inespecífica (fagocitosis) en ratones inmunosuprimidos por el linfoma murino L5178Y o por la ciclofosfamida.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Establecer la Dosis Letal 50 (DL₅₀) de *Aloe vera* en ratones BALB/c sanos, con la finalidad de poder determinar la dosis terapéutica.
- b) Estudiar la inmunosupresión producida por el linfoma murino L5178Y, en ratones BALB/c.
- c) Evaluar la respuesta inmune inespecífica en ratones sanos e inmunosuprimidos con linfoma L5178Y, tratados con acíbar de *A. vera*, *in vivo*, mediante la prueba de fagocitosis de levaduras de *Cándida albicans* por macrófagos alveolares (MA).
- d) Definir la actividad inmunomoduladora del acíbar de *A. vera*, *in vivo*, en la respuesta inmune humoral, en ratones inmunosuprimidos con linfoma L5178Y, con la prueba de hemaglutinación (producción de inmunoglobulinas anti-eritrocitos de carnero) a eritrocitos de carnero (EC).
- e) Investigar la actividad inmunomoduladora del acíbar de *A. vera* en la respuesta inmune celular, *in vivo*, con la prueba de hipersensibilidad retardada al Dinitrofluorobenceno (DNFB) en ratones inmunosuprimidos con linfoma L5178Y y con ciclofosfamida.
- f) Realizar análisis del acíbar de *A. vera* por cromatografía en capa fina para distinguir su grado de complejidad.

METODOLOGIA

OBTENCION DEL ACÍBAR.

El acíbar se colectó a partir del estilado de las hojas, cortadas en forma transversal cerca del tallo, y fue depositado en un vaso de precipitado. Para su conservación y utilización posterior, se desecó en una liofilizadora marca LABCONCO mod. FREEZONE 4.5. Fig. 3. La cantidad de acíbar colectado de 500 gr de hojas de sábila fue de 15 ml el cual nos dio un rendimiento de 1.1819 g de liofilizado. La colecta del acíbar debe ser entre las 9:00 y 10:30 hrs, de la mañana, ya que al mediodía o por la noche se colecta

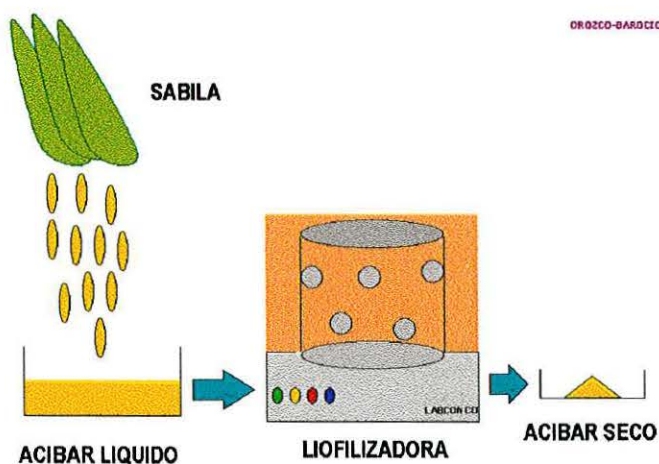


FIG. 3. PROCESO DE OBTENCION Y LIOFILIZACION DE ACIBAR

nada (Esto lo determinamos por las observaciones hechas en la colecta). Este fenómeno se debe al proceso fisiológico de la planta, en estos tiempos el requerimiento de nutrientes por ella es mayor. Esta es una característica de las plantas suculentas, las cuales como mecanismo de adaptación al medio pobre en agua han

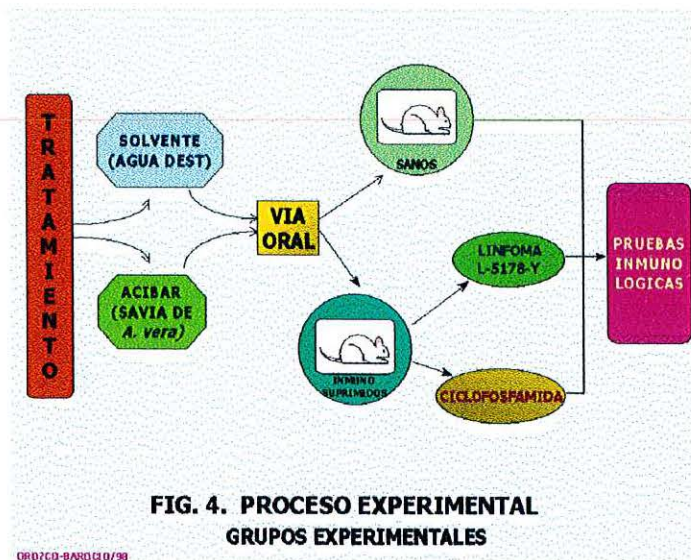
desarrollado vías bioquímicas alternas a las plantas C3 y C4 para fijar el CO₂. Debido a que los primeros estudios bioquímicos del metabolismo de estas plantas fueron realizados en vegetales de la familia crassulaceae, se le conoce como metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (Salisbury, F. B., 1992). El acíbar liofilizado fue utilizado en forma completa, como extracto crudo.

ANIMALES DE ESTUDIO

Se utilizaron grupos de 5 ratones machos BALB/c de 20 a 25 g de peso y de 6 a 8 semanas de edad, mantenidos a temperatura de cuarto, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad con alimento y agua *ad libitum*.

PROCESO EXPERIMENTAL.

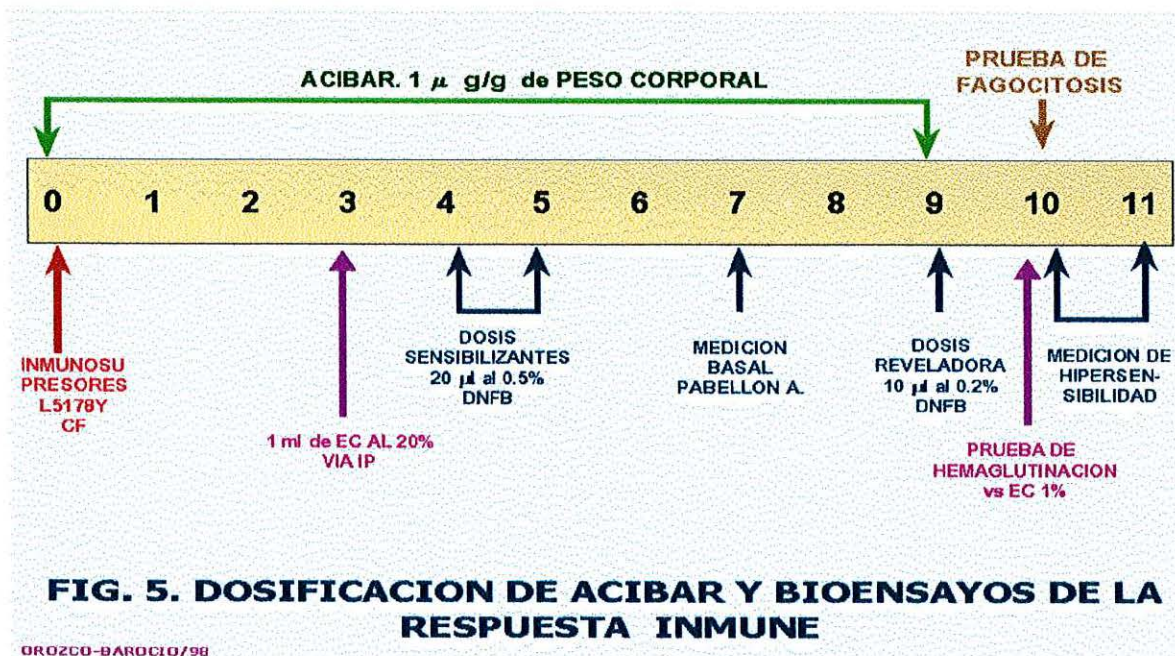
Los grupos de trabajo tuvieron los siguientes tratamientos:



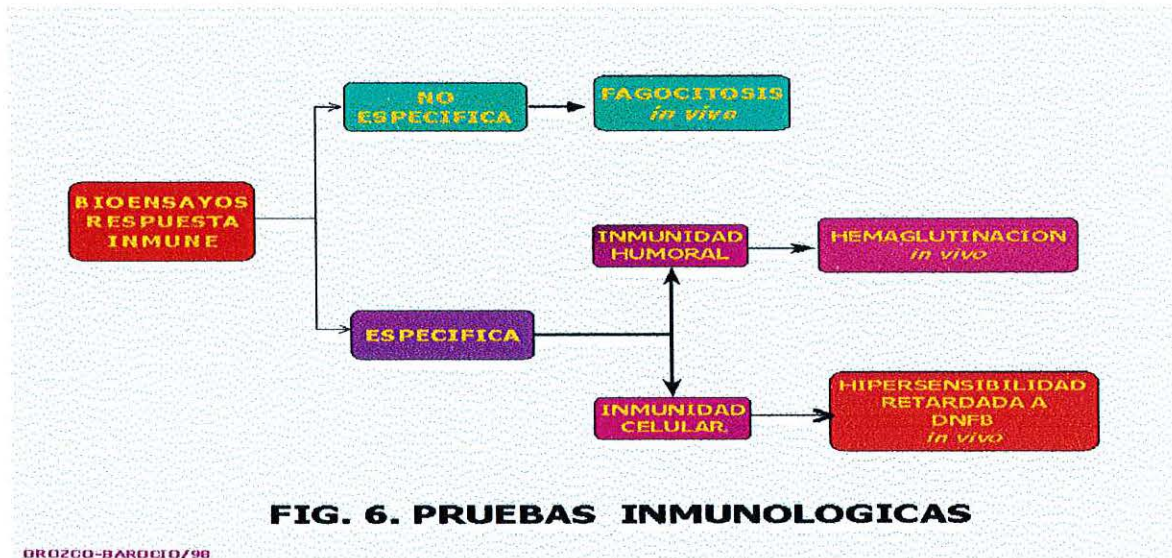
a) **Grupo 0**, ratones sanos tratados con acíbar de *A. vera* para determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀).

b) **Grupo I**, (Control de manejo) ratones sanos tratados con agua estéril inyectable (vehículo para acíbar) 0.1ml vía orogástrica (og) por día durante 10 días.

c) **Grupo II**, ratones sanos tratados con 1 μ g/g/día de extracto crudo (acíbar) por vía orogástrica (og) disuelto en 0.1 ml de agua estéril inyectable, durante 10 días.



- d) **Grupo III**, ratones inmunosuprimidos con 1×10^7 células de linfoma murino L5178Y tratados con agua estéril inyectable (vehículo) 0.1ml/día vía orogástrica (og) durante 10 días.
- e) **Grupo IV**, ratones inmunosuprimidos con 1×10^7 células de linfoma murino L5178Y, tratados con 1 mg/Kg/día de extracto crudo esterilizado de acíbar por vía orogástrica (og) disuelto en 0.1 ml de agua estéril inyectable, durante 10 días.
- f) **Grupo V**, ratones inmunosuprimidos con 200 mg/Kg (dosis única) de ciclofosfamida, vía intraperitoneal (ip).
- g) **Grupo VI**, ratones inmunosuprimidos con 200 mg/Kg (dosis única) de ciclofosfamida vía intraperitoneal (ip), tratados con 1 mg/Kg/día de extracto crudo (acíbar) por vía orogástrica (og) disuelto en 0.1 ml de solución estéril inyectable, durante 10 días.



A cada uno de los grupos anteriores (con excepción del grupo 0) se les hicieron las pruebas inmunobiológicas abajo mencionadas. Figuras 4, 5 y 6.

DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) Y DOSIS SUBLETAL.

El establecimiento de la DL₅₀ del acíbar de sábila se determinó en tres grupos de 5 ratones cada uno, con dosis únicas de 3, 2 y 1 g/Kg de peso corporal por vía orogástrica, diluidas en 0.1 ml de agua estéril inyectable. Después de la administración se mantuvieron en observación, atendiendo a las manifestaciones clínicas vitales, como deceso, cambios en su conducta: alteración de la actividad locomotora, irritabilidad ocular, lagrimeo, alteraciones de la respiración, movimientos abdominales alterados, pelo erizado, etc., como se establece en los estudios de toxicidad aguda, este estudio consiste en administrar el compuesto a los animales en una ocasión, para determinar la sintomatología consiguiente a la administración del compuesto en cuestión y su grado de letalidad (Loomis, 1982).

CINETICA DE INMUNOSUPRESION DE RATONES BALB/C CON LINFOMA MURINO L5178Y.

Es bien conocido que los huéspedes con tumor presentan una supresión de la respuesta inmune por muchos factores, los cuales, frecuentemente, pueden ser atribuidos a la existencia de factores supresores en los fluidos biológicos del huésped con tumor o en los sobrenadantes del cultivo de células tumorales. La lista de estos factores incluye citocinas derivadas del huésped o del tumor, tales como la interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), interferón γ (IFN- γ) y prostaglandina E₂, la cual inhibe las funciones de las células T, la respuesta humoral y la actividad de las células asesinas naturales (NK) (Weinberg, 1996; Daneri-Navarro, A., 1995; Sell, S. 1996; Roit, I., 1991; Alberts, 1994).

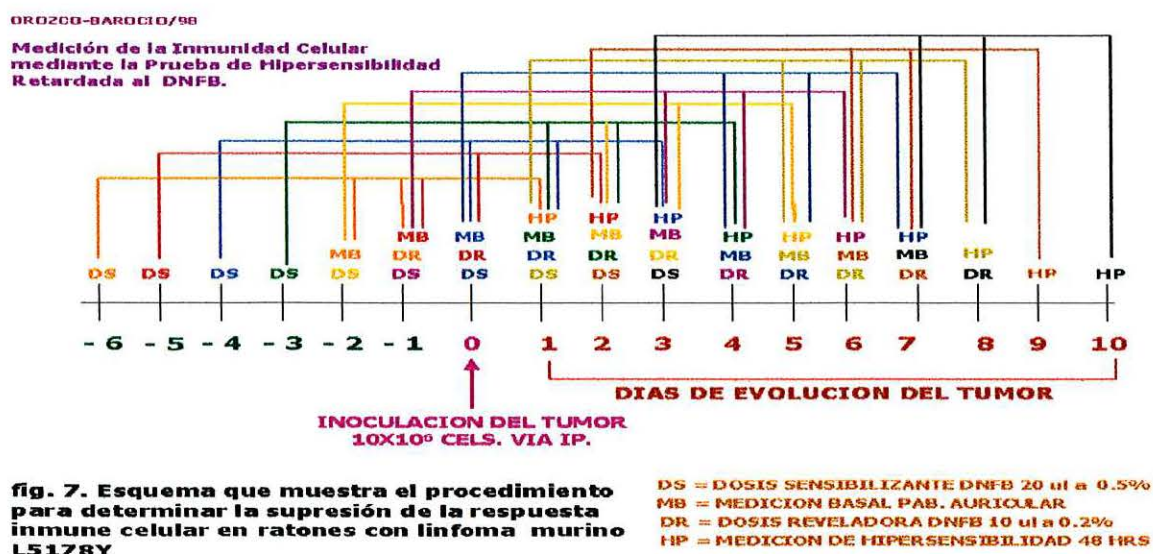
Daneri-Navarro y colaboradores demostraron que el linfoma murino L5178Y provoca la supresión de la respuesta inmune celular al DNFB en ratones con linfoma y lo

atribuyen a la probable presencia de un factor supresor en el líquido de ascitis y en el suero de los animales con tumor (Daneri-Navarro, A., 1995).

El linfoma murino L5178Y (H-2d) es de origen tímico y fue mantenido por inoculaciones intraperitoneales semanales de 1×10^7 células, en forma ascítica, en ratones BALB/c singénicos (H-2d). Para los experimentos, los ratones fueron inoculados con la misma cantidad de células diluidas en 0.2 ml de solución salina.

Utilizando al linfoma murino L5178Y como modelo de inmunosupresión fue necesario establecer en qué momento de su evolución, los ratones, inoculados con 1×10^7 células del tumor, presentaban una supresión de la respuesta inmune celular, considerando que con esta cantidad de células tumorales los ratones mueren a los 13 ± 2 días.

El establecimiento del estado de inmunosupresión con el linfoma murino L5178Y, fue determinado mediante la valoración de las reacciones de hipersensibilidad retardada al DNFB, en grupos, de 5 ratones, con uno a diez días de evolución del tumor. Considerando que la duración de la prueba es de 5 días para valorar la hipersensibilidad retardada, se estableció el siguiente esquema de inoculación y medición de la prueba. Fig. 7.

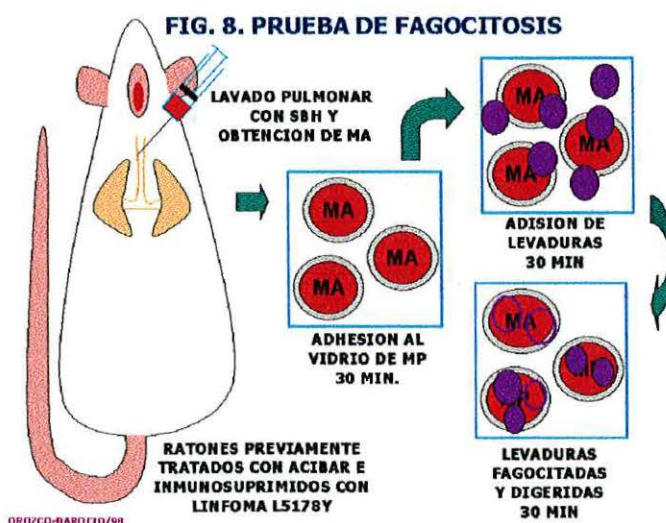


PRUEBAS INMUNOBIOLOGICAS:

a) INMUNIDAD NO ESPECIFICA. FAGOCITOSIS.

BIBLIOTECA CENTRAL

Obtención de células fagocíticas. Macrófagos Alveolares (MA). En la fig. 8 se presenta un diagrama del procedimiento de la valoración de la actividad fagocítica. A los ratones, previamente tratados durante 10 días con el acíbar e inmunosuprimidos con linfoma L5178Y, se sacrificaron por dislocación cervical y se les abrió la caja torácica, para dejar expuesto los pulmones y la traquea. Se hizo lavado pulmonar con 0.5 ml de solución balanceada de Hanks (SBH). Se dio un masaje suave en los pulmones, se recuperó la SBH que contenía la suspensión de Macrófagos Alveolares (MA) y fueron colocados directamente en los cubreobjetos para realizar la prueba de fagocitosis.



Prueba de Fagocitosis en MA. Se empleó el método de adherencia al vidrio (Cunningham, 1979; Agarwal, et al, 1994; Courreges, et al, 1994; Ingolfssdottir, et al, 1994), el cual consistió en colocar 0.1 ml de la suspensión de MA sobre una cuarta parte de cubreobjetos de 22 x 22 mm,

previamente desengrasados y adheridos a tapones de hule. A continuación se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 30 minutos para permitir su adherencia al vidrio. Transcurrido este tiempo se lavaron suavemente los cubreobjetos con SBH a 37° C para la eliminación de las células que no se adhirieron al vidrio. Inmediatamente después y sin dejar secar los cubreobjetos, las células

CUCE



adheridas se cubrieron con 0.5 ml de la suspensión de *Candida albicans* que contenía 1×10^6 levaduras por ml de SBH adicionada del 20% de plasma autólogo. Posteriormente se incubaron durante 30 minutos en cámara húmeda a 37° C. Al término de la incubación se lavaron suavemente con SBH para retirar las levaduras de *C. Albicans* no fagocitadas. De forma similar y sin dejar secar los cubreobjetos, se cubrieron con SBH y se dejaron incubar de la misma forma anterior, por 30 minutos para que los MA digirieran a las levaduras fagocitadas. Los cubreobjetos se dejaron secar al aire y se tiñeron con colorante de Wright. Luego se montaron invertidos sobre portaobjetos previamente identificados.

La valoración de la fagocitosis se hizo por observación de las preparaciones en microscopio de luz con el objetivo de 100 X. Se contaron 300 MA en cada cubreobjetos, se incluyeron en este número de células las que fagocitaron o no.

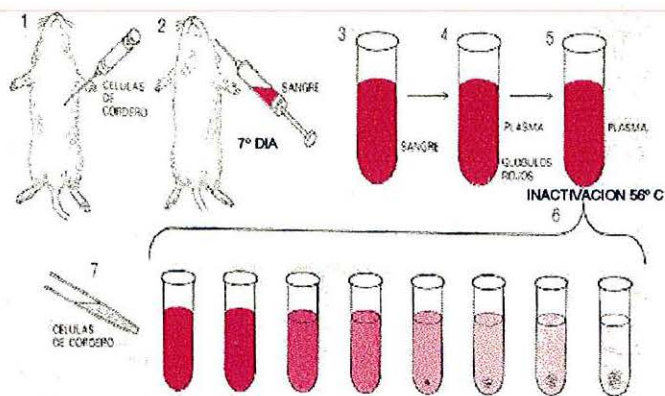
Las levaduras fagocitadas se observaron como cuerpos intracitoplásmicos, de color azul intenso (levaduras no digeridas) dentro de sus respectivos fagosomas, así como vacuolas ópticamente vacías (levaduras digeridas). Este fenómeno Cunningham lo describe como fantasmas (Cunningham, 1979). Así mismo se observaron fagosomas que contenían residuos de levaduras. De esta forma en el primer caso se diferenciaron las levaduras no digeridas y en los dos últimos las digeridas. Después se valoró el Índice Fagocítico (IF) que representa el total de levaduras ingeridas (digeridas y no digeridas) y el Índice de Digestión (ID).

El IF se determinó por la suma del número de levaduras ingeridas por los 300 fagocitos y este valor se dividió entre 300 que fueron las células contadas, el cociente resultante fue el IF. El ID se determinó por la cuenta del número de levaduras digeridas por los 300 MA y este valor se dividió entre 300, el ID fue el cociente de la división. Las pruebas se hicieron por duplicado y se obtuvo el promedio para cada animal.

IMNUNIDAD HUMORAL (TITULO DE HEMAGLUTINACION).

Al tercer día de iniciar el tratamiento con acíbar y de inoculado el linfoma, los ratones,

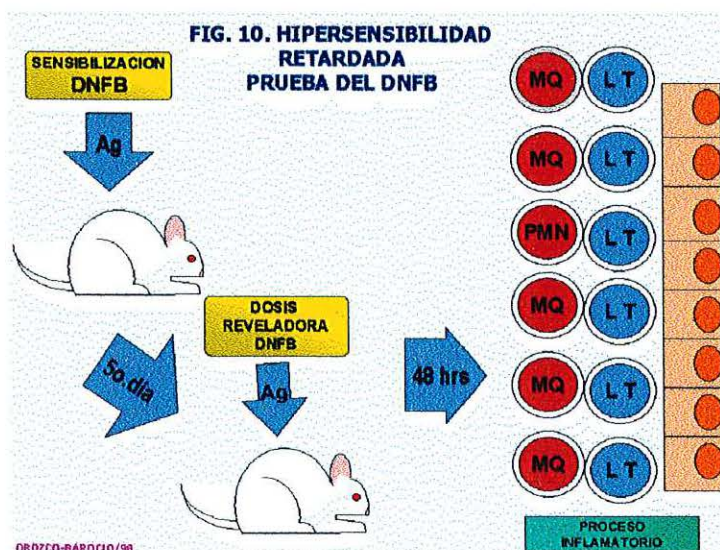
FIG.9. MEDICIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL PRUEBA DE HEMAGLUTINACION.



fueron inmunizados intraperitonealmente con 1 ml de eritrocitos de carnero (EC) al 20%. Siete días más tarde fueron desangrados por punción cardiaca y el suero obtenido fue inactivado por calor a 56° C por 30 minutos. Enseguida se hicieron diluciones seriadas de 1: 2 en 0.05 ml de solución

salina, y 0.05 ml de EC al 1%. Después de 4 hrs de incubación a temperatura ambiente, el recíproco de la dilución más alta de la prueba que mostró aglutinación visible fue expresado como el título de hemaglutinación (Ivanovska, K., 1996; Agarwal, 1994) Fig. 9.

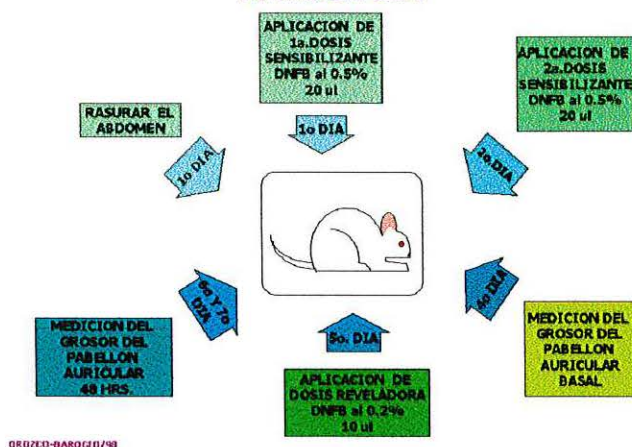
IMNUNIDAD CELULAR. Prueba de Hipersensibilidad Retardada al Dinitrofluorobenceno (DNFB).



Para medir la respuesta inmune celular en los ratones tratados con acíbar y suprimidos con el linfoma L5178Y y ciclofosfamida se les realizó la prueba de Hipersensibilidad Retardada al Dinitrofluorobenceno (Mori. et al 1995; Gad, 1994; Streilein et al, 1980). Al quinto día de

haberse iniciado el tratamiento con acíbar y de evolución del linfoma, se les rasuró el abdomen, en un área de 2 X 2 cm, donde se les aplicó 20 microlitros de una solución al 0.5 % (p/v) de DNFB disuelto en una mezcla de acetona y aceite de oliva en proporción 4 : 1 . A las 24 horas se aplicó una segunda dosis sensibilizante igual que la primera. Al quinto día de iniciada la sensibilización se aplicó en la cara externa de la oreja derecha, de cada ratón, la dosis reveladora de 10 microlitros de DNFB al 0.2% (p/v) en el mismo vehículo. Antes de aplicar la dosis reveladora y 48 hrs después se

FIG. 10 a. PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A DNFB



ORDOZ-GARCIA/20/99

midió el grosor del pabellón auricular con un micrómetro de muelle (Starrett Company. Athol, Mass. USA). (Figuras 10 y 10a).

En seguida se hicieron biopsias de las orejas sensibilizadas, para evaluar la intensidad de la reacción de hipersensibilidad celular. Estos cortes se hicieron inmediatamente después de la medición y fueron fijadas en formol al 10%. Posteriormente se procesaron los cortes histopatológicos que fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA DEL ACIBAR DE *Aloe vera*.

Como se mencionó arriba, no existe una correlación de los compuestos encontrados en el gel y su función biológica. Por otro lado, los componentes del acíbar (savia de *A. vera*) se desconocen, no existen referencias de estudios cromatográficos de él. Por lo que se realizó una cromatografía en placa fina (TLC) de 10 x 7 cm y 0.2 mm de espesor de gel de sílice (MERCK), con un sistema de elución para glucósidos a base de butanol, ácido acético, agua 4 : 1 : 1 (v/v/v) (Dominguez, X. 1973).

PRUEBAS ESTADISTICAS

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por la prueba paramétrica de "t" de Student, que nos permite comparar grupos experimentales; las pruebas no paramétricas de H de Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, y el Análisis de Varianza mediante las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y la prueba de análisis de varianza de una vía. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

CUCBA



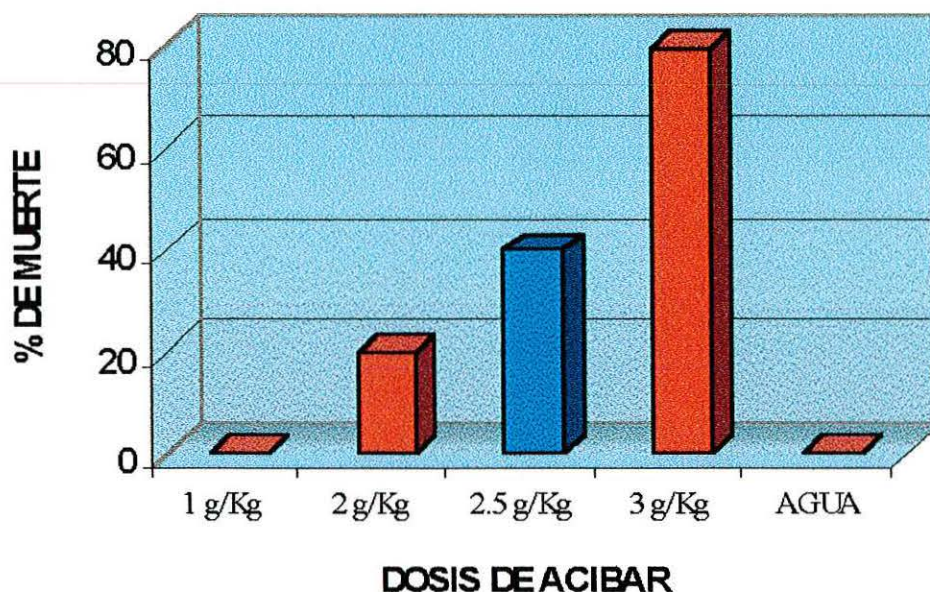
RESULTADOS

DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) Y DOSIS SUBLETAL.

Las manifestaciones que presentaron los animales fueron consideradas para evaluar el efecto del acíbar porque son referidos en los estudios de toxicidad aguda, en animales tratados con sustancias de interés biológico (Loomis, 1982).

De los ratones que se les administró 3 g/Kg de peso corporal diluido en 0.1 ml por vía og, murieron el 80% en 4 días, solo uno de ellos se restableció al 3er. día de la toma única de acíbar que recibió; el ratón se mantuvo vivo y recuperado hasta el sacrificio normal por vejez (12 semanas). Los animales del grupo 2, que se les administró 2 g/Kg, solo murieron el 20%, es decir, solo un ratón; tres de los restantes (60%) se recuperaron de la sintomatología a las 72 horas después de la aplicación del acíbar de *A. vera* ; el último de los roedores (20%), se recuperó, de los padecimientos clínicos hasta el sexto día posterior al tratamiento. En tanto el grupo 3, que recibió 1 g/Kg, el 100% de los ratones se mantuvo con vida, estos se recuperaron de los síntomas clínicos a las 48 hrs. Las manifestaciones clínicas que presentaron todos los ratones, de los 3 grupos fueron: disminución de la actividad locomotora, irritación de los ojos, lagrimeo, respiración irregular y acelerada, se les erizó el pelo y los movimientos abdominales eran irregulares y acelerados, manifestaron un estado de intranquilidad y exacerbación. En forma general los ratones soportaron grandes dosis de acíbar, y en la razón de que a la dosis de 1 g/Kg de peso corporal no hubo ningún daño y que la recuperación fue rápida, se determinó usar una dosis terapéutica 1000 veces menor, tomando en cuenta el principio de Wagner de que un inmunoestimulador debe ser administrado a dosis muy baja para tener efectos de la modulación de la respuesta inmune (Wagner, H.K.M., 1995). Así mismo, pudimos determinar, aproximadamente, la DL₅₀ en 2.5 g/Kg. (Gráfica 1).

Gráfica 1. Determinación de la DL_{50} de acíbar de *Aloe vera*



CINETICA DE SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR (RIC) POR EL LINFOMA MURINO L5178Y.

El motivo de conocer en qué momento del desarrollo del linfoma L5178Y, los ratones alcanzan la supresión inmunológica, surgió con la necesidad de tener un modelo natural de inmunosupresión, con el objeto de probar si el acíbar de *Aloe vera* restablece dicho estado. Para determinar en qué día de evolución del tumor existe la supresión inmunológica fue necesario realizar una cinética de inmunosupresión del tumor midiendo la respuesta inmune celular por la prueba de hipersensibilidad retardada al DNFB durante 10 días, siguiendo el esquema de inmunización de la fig. 7. Los resultados de la inmunosupresión se muestran en la gráfica 2 y Tabla 1.

**TABLA 1. CINETICA DE SUPRESION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR
POR LINFOMA L5178Y (1X10⁷ CELULAS, v ip)**

DIAS*	BASAL		INDICE**DE INCREMENT	
	PROMEDIO	DS	PROMEDIO	ERROR ST
1	0,024	4,47E-04	74,13	4,42
2	0,023	1,30E-03	72,84	0,40
3	0,023	1,10E-03	69,44	6,84
4	0,023	7,07E-04	87,99	5,11
5	0,023	5,48E-04	57,19	4,06
6	0,025	2,51E-03	56,90	7,82
7	0,021	1,10E-03	37,64	3,13
8	0,021	1,14E-03	31,10	3,42
9	0,021	2,19E-03	35,18	5,16
10	0,026	1,30E-03	11,13	0,34

* DIAS DE DESARROLLO DEL LINFOMA

** INDICE DE INCREMENTO (%) = (INCREMENTO DE PA/BASAL DE PA) X 100

LAS DIFERENCIAS EN LA MEDICION BASAL NO FUERON SIGNIFICATIVAS.

COMPARACION DE LOS INDICES DE INCREMENTO POR t DE STUDENT:

NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2-4, 6; 5 vs 6; 7 vs 8-10

SIGNIFICATIVOS: 1 vs 5, 7-10; 5 y 6 vs 7-10. (P < 0.05)

COMPARACION DE LOS INDICES (%), POR LA PRUEBA DE COMPARACIONES

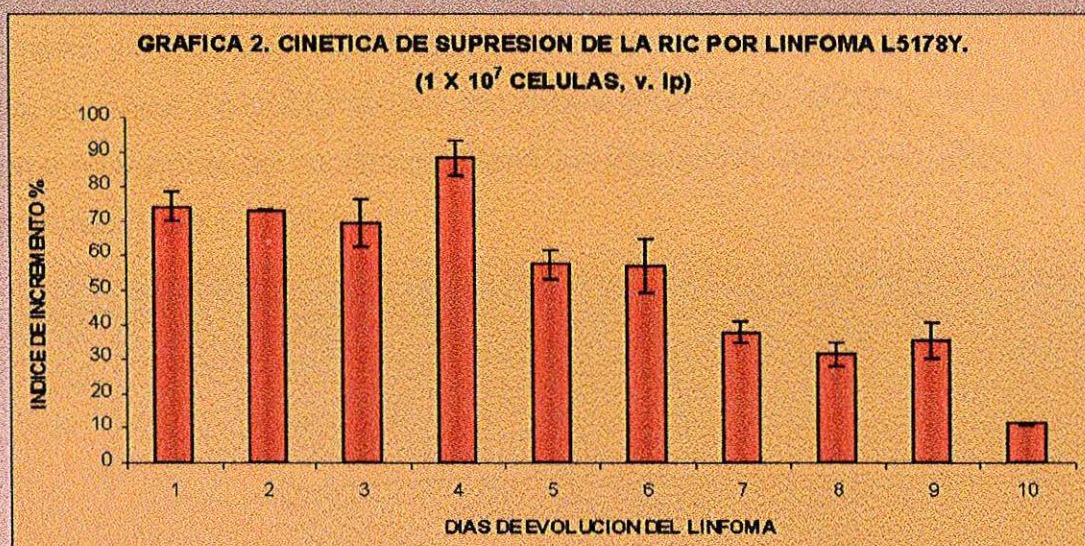
MULTIPLES DE TUKEY

NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2-6; 5 vs 6, 7, 9; 7 vs 8-10

SIGNIFICATIVOS: 1 vs 7-10; 5 y 6 vs 8-10. (P < 0.05)

UROZCO-BAROCIO/98

En esta gráfica consideramos el porcentaje (%) del índice de incremento (que es el cociente entre el incremento de grosor del pabellón auricular entre su espesor basal multiplicado X 100 para referirlo en porcentaje) del espesor en el pabellón auricular por efecto del proceso inflamatorio causado por el reto al DNFB. En los primeros 4 días de evolución no se observa una diferencia estadística; pero al 5º y 6º día se aprecia una disminución considerable en el grosor del pabellón auricular, (P < 0.05); a partir de estos días, la respuesta de inflamación es cada vez más débil, y se ve que del día 7º al 10º no hay una diferencia estadística entre ellos. Se observa que la inmunodeficiencia inicia su establecimiento en los días 5 y 6 de desarrollo del linfoma y queda bien establecida a partir del 7º día. Gráfica 2.



POR T DE STUDENT:

NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2-4, 6; 5 vs 6; 7 vs 8-10

SIGNIFICATIVOS: 1 vs 5, 7-10; 5 y 6 vs 7-10. (P < 0.05)

LA PRUEBA DE COMPARACIONES MULTIPLES DE TUKEY

NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2-6; 5 vs 6,7,9; 7 vs 8-10

SIGNIFICATIVOS: 1 vs 7-10; 5 y 6 vs 8-10. (P < 0.05)

ORDZCO-BAROCIO/98

VALORACION DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA.

a) INMUNIDAD INESPECIFICA. FAGOCITOSIS.

**TABLA 2. FAGOCITOSIS Y ACTIVIDAD FAGOCITICA Y DIGESTIVA DE
MACROFAGOS ALVEOLARES DE RATONES BALB/c CON LINFOMA L5178Y
TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera* (1 mg/Kg/10 días)**

GRUPO	N	TRATAMIENTO	FAGOCITOSIS		IND. FAGOCIT		IND. DIGESTIVO	
			%	DS	%	DS	%	DS
1	5	SANO/AGUA. INYECT	42,25	15,54	1,17	0,79	0,67	0,48
2	5	SANOS/ACIBAR	81,33	2,08	2,22	0,37	0,59	0,26
3	5	LINFOMA/AGUA INYECT	30,67	4,62	0,65	0,10	0,44	0,06
4	5	LINFOMA/ACIBAR	86,67	8,50	3,08	1,32	0,83	0,71

COMPARACION DE GRUPOS POR t DE STUDENT:

NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 3 y 2 vs 4. (FAGOCITOSIS)

SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2, 4 y 3 vs 2, 4. (FAGOCITOSIS)

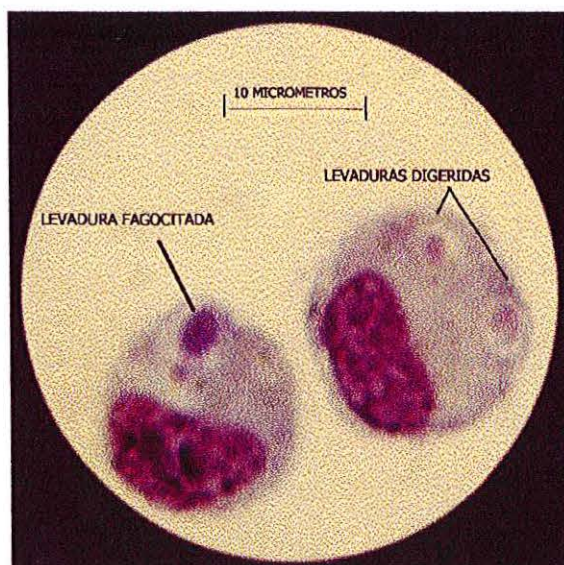
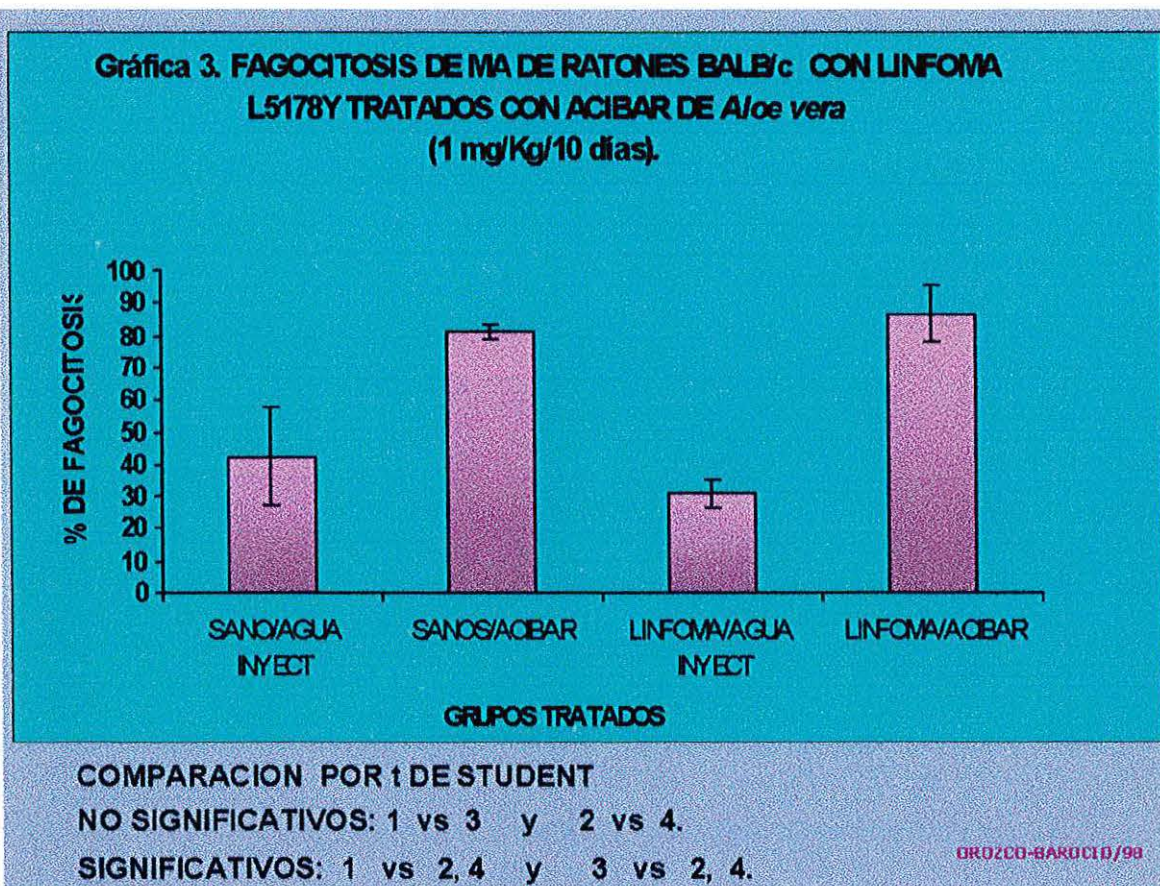
NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2, 3, 4. (IND. FAGOCITICO).

SIGNIFICATIVOS: 3 vs 2, 4. (IND. FAGOCITICO).

EL IND. DIGESTIVO NO TUVO DIFERENCIAS.

ORDZCO-BAROCIO/98

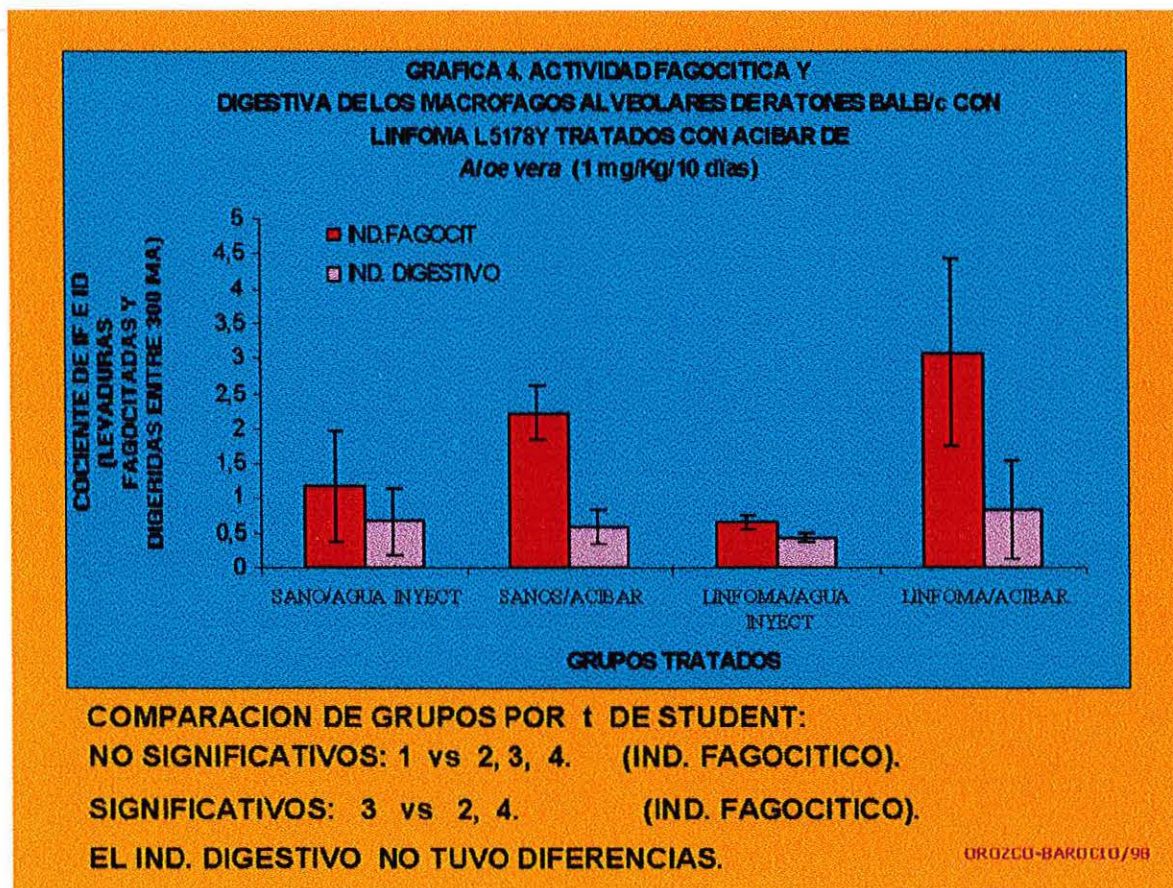
Prueba de Fagocitosis. La actividad fagocítica de los MA de los ratones de los grupos sanos y con linfoma, tratados con agua inyectable estéril (grupos 1 y 3) no fue alterada, en cambio los grupos sanos y con linfoma tratados con acíbar (grupos 2 y 4) sí tuvieron un aumento del número de células que fagocitaron, que no fue diferente en ambos grupos. Tabla 2. Gráfica 3.



Indice fagocítico e índice digestivo.

Por otro lado, la capacidad fagocítica (IF), es decir, la cantidad de levaduras fagocitadas por célula (MA), no tuvo diferencias entre los ratones sanos, tratados con agua inyectable y ninguno de los otros grupos, en cambio el grupo de

ratones con linfoma, tratados con solución inyectable sí presento diferencias cuando se comparó con los grupos tratados con acíbar, tanto sanos y con linfoma (Tabla 2). Por lo contrario, el índice digestivo (ID), la capacidad de digestión de los MA, no presentó ninguna modificación entre los grupos tratados o no con acíbar e inmunosuprimidos o no con el linfoma. (Gráfica 4).



b) INMUNIDAD HUMORAL.

Prueba de hemaglutinación. En la Tabla 3 se observan los recíprocos de las últimas diluciones de aglutinación que presentaron los grupos de ratones tratados con acíbar e inmunosuprimidos con linfoma murino, así como sus grupos controles. Se puede observar que no hay diferencia entre los ratones inmunosuprimidos independientemente del tratamiento que recibieron, en cambio, en los grupos no suprimidos sí hay una diferencia significativa entre los tratados con acíbar y no. La

prueba estadística que se utilizó fue el análisis de varianza de Kruskal-Wallis, con una $P < 0.05$ (Gráfica 5).

TABLA 3. RESPUESTA INMUNE HUMORAL* (RIH) DE RATONES BALB/c INMUNOSUPRIMIDOS CON LINFOMA L5178Y TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera* (1 mg/kg/10 días)

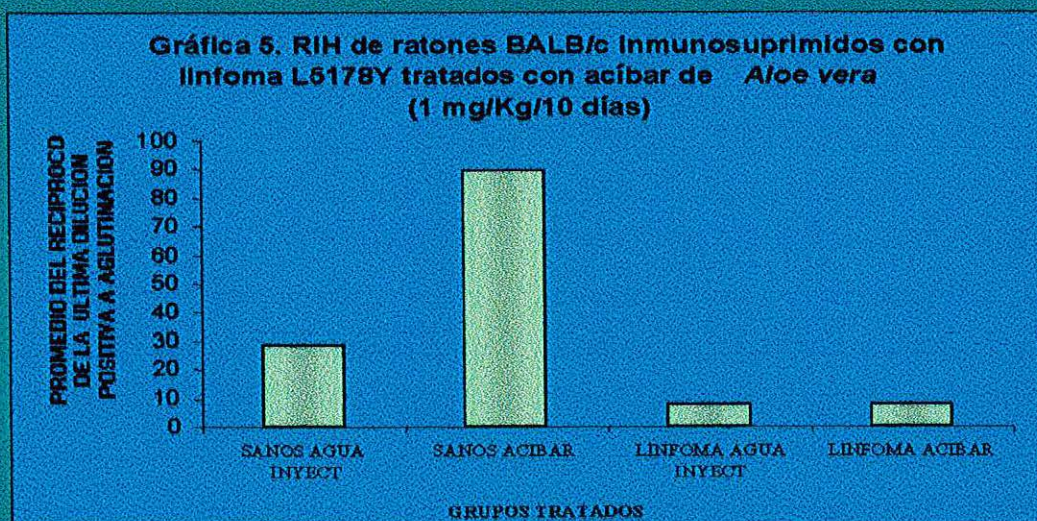
RECÍPROCO DE LA ÚLTIMA DILUCIÓN DE AGLUTINACIÓN				
TRATAMIENTO RATON	SANOS AGUA INYECT	SANOS ACIBAR	LINFOMA AGUA INYECT	LINFOMA ACIBAR
1	16	64	8	8
2	32	128	8	8
3	32	64	8	8
4	32	128	8	8
5	32	64	8	8
PROMEDIO	28,8	89,6	8	8

*LA RIH SE VALORO CON LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION A EC

Prueba Estadística: Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis.

Hubo Diferencia entre todos los grupos con $P < 0.05$.

OROZCO-BAROCIO/98



Prueba Estadística: Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis.

Hubo Diferencia entre todos los grupos con $P < 0.05$.

OROZCO-BAROCIO/98

c) INMUNIDAD CELULAR.

Prueba de hipersensibilidad retardada al DNFB. En la Tabla 4 se muestra la valoración de la prueba reveladora de la sensibilización a DNFB, por la medición de la inflamación que presentó el pabellón auricular en el que se aplicó dicha prueba. La hipersensibilidad retardada fue positiva en los ratones de todos los grupos, estuvieran inmunosuprimidos o no, con tratamiento de acíbar o sin él. La intensidad de las reacciones al DNFB, fue medida considerando el porcentaje de incremento (como el índice entre el incremento obtenido del grosor de la oreja y su medida basal), estableciendo una variable intensiva, que nos permite valorar el incremento del pabellón auricular eliminando las variables propias de cada individuo.

TABLA 4. RIC* DE RATONES BALB/c INMUNOSUPRIMIDOS CON LINFOMA L5178Y y CICLOFOSFAMIDA TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera* (1 mg/Kg/10días)

GRUPO	TRATAMIENTO	% DE INCREMENTO	ERROR ST	INFILT. CELULAR
1	Sanos/agua inyectable	29,05	3,23	+++
2	Sanos/Acibar	56,00	2,45	++++
3	Linfoma/agua inyectable	14,67	2,66	+
4	Linfoma/Acibar	57,78	20,96	+++
5**	Ciclo/agua inyectable	1,82	1,82	----
6**	Ciclo/Acibar	1,82	1,82	----

COMPARACION DE GRUPOS POR t DE STUDENT

NO SIGNIFICATIVOS: 1 vs 4; 2 vs 4; 5 vs 6.

SIGNIFICATIVOS: 1 vs 2,3,5 y 6; 2 vs 3,5 y 6; 3 vs 4 - 6 (P < 0.05)

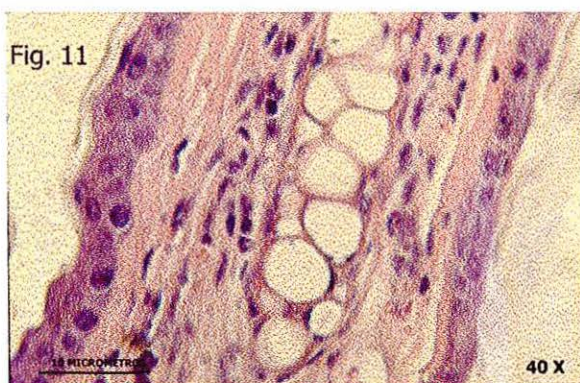
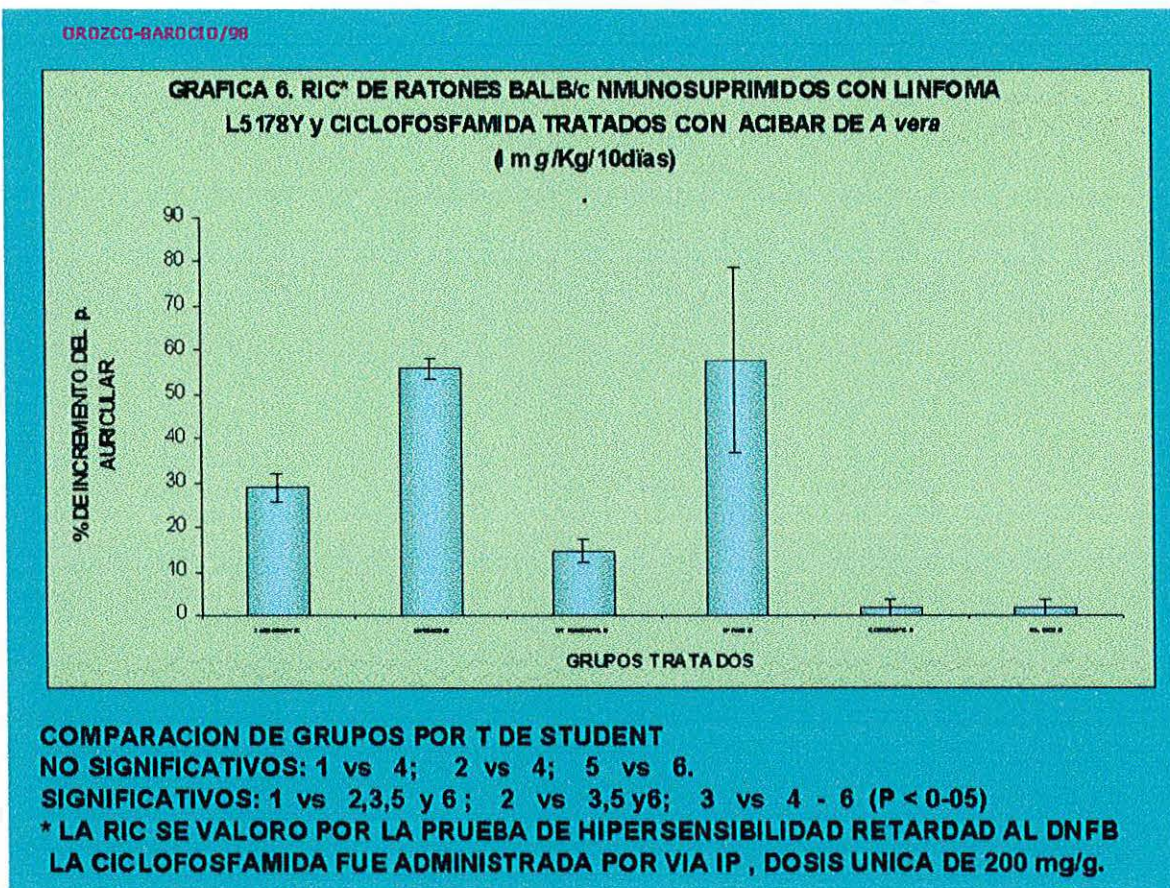
* LA RIC SE VALORO POR LA PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA AL DNFB

** LA CICLOFOSFAMIDA FUE ADMINISTRADA POR VIA IP , DOSIS UNICA DE 200 mg/g.

OROZCO-BARUCIO/99

Cuando se comparó el grupo 1 (sanos con vehículo) contra los grupos 2, 3, 5 y 6; el grupo 2 (sanos con acíbar) versus 3,5 y 6; y el grupo 3 (linfoma con vehículo) contra el 4, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del proceso

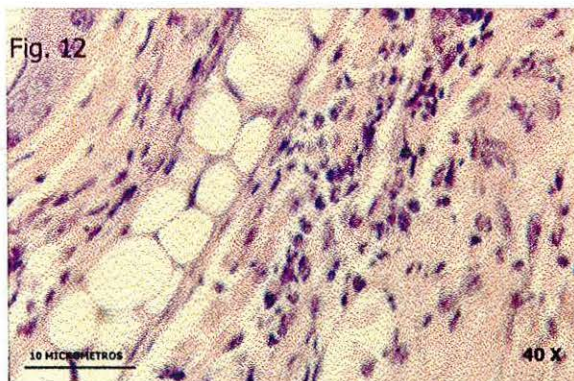
inflamatorio: Esta disminución fue más notoria en los grupos 3, 5 y 6 (Gráfica 6). En cambio, en los grupos 1, 2 (sanos con vehículo y acíbar) y 4 (linfoma con acíbar) no hubo diferencias significativas, al igual que los dos grupos tratados con ciclofosfamida. Otro inmunosupresor de origen químico que se utilizó en dosis única por vía intraperitoneal de 200 mg/Kg. En la gráfica 6 se observa que el efecto supresor no fue modificado por el acíbar.



inflamatoria del pabellón auricular de los ratones, en el que se aplicó la prueba

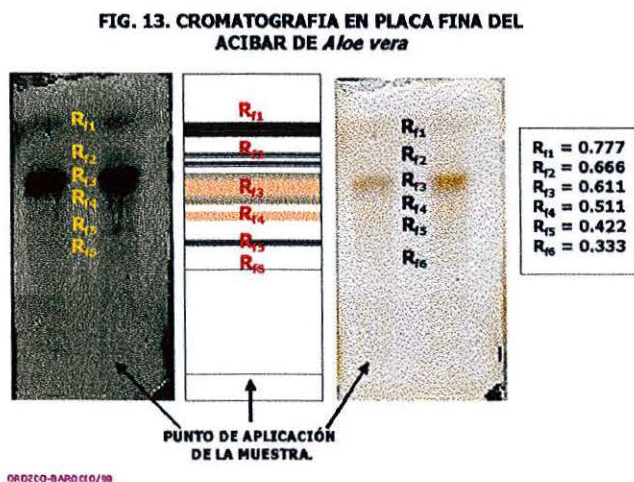
Por medio de la observación de cortes histopatológicos por microscopía de luz, se confirmó la valoración de las pruebas de hipersensibilidad retardada a DNFB (Tabla 4). Para ello se dieron valores de 1 a 4 cruces, según la cantidad de elementos celulares que participan en la reacción

reveladora de la sensibilidad a DNFB. La mayor inflamación (4 cruces, fig.12) se observó en los grupos 2 y 4. El grupo 1 tuvo una reacción inflamatoria menor equivalente a 3 cruces, el grupo 3 tuvo una supresión a la reacción de inflamación que solo alcanzó una sola cruz; en cambio los grupos 5 y 6 no tuvieron reacción inflamatoria (fig.11). Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos al medir la inflamación del pabellón auricular de los ratones y las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) por la prueba de Kruskal – Wallis.



ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA DEL ACIBAR DE *Aloe vera*.

La cromatografía en capa fina del acibar de *A. vera* muestra una separación de 6 bandas que se separan a lo largo de la capa de gel de sílice con diferentes velocidades relativas de desplazamiento (R_f) (fig. 13). Los R_f de estos compuestos son los



siguientes: $R_{f1} = 0.7777$, $R_{f2} = 0.6666$, $R_{f3} = 0.6111$, $R_{f4} = 0.5111$, $R_{f5} = 0.4222$ y $R_{f6} = 0.3333$. Por el comportamiento de desplazamiento que presentan estos compuestos se observa que van de mediana polaridad a no polares. La banda que aparenta tener mayor concentración es la que su velocidad de

desplazamiento es el R_{f3} , o tal vez sea necesario utilizar otro solvente de elución para separar mejor esta banda.

DISCUSION

Aloe vera es una planta de origen africano, pero que ha formado parte de la flora medicinal de México desde el siglo XVI (Rodríguez-Chavez, J.M., 1996); por sus múltiples usos medicinales, en particular, en las afecciones del sistema inmune (Granados-Sánchez, 1988; Peng, 1991; Vázquez, 1996; Syed, 1996; Egger, 1996), se ha considerado para su análisis biológico, con atención en sus propiedades inmunomoduladoras. La parte más estudiada en otros países es el gel obtenido de la hoja (tejido parenquimatoso), en cambio, en México, los estudios etnobotánicos, muestran que se recomienda más el acíbar (savia o jugo) (Granados-Sánchez, 1988; Rodríguez-Chávez, 1996; Linares, Bye, 1990; Haller, J. S., 1990; Roberts, D., B., 1995); por esta razón, en este trabajo se realizó un perfil inmunológico de la influencia que tiene el acíbar en el sistema inmune en ratones BALB/c.

Considerando lo anterior, el objeto de este trabajo fue el de valorar el efecto del acíbar de *A. vera*, en la respuesta inmune administrado a dosis de mg/Kg de peso en ratones BALB/c, (esta dosificación esta dada en razón a la DL₅₀ obtenida de 2.5 g/Kg de peso). Fue necesario establecer modelos de inmunosupresión. Se utilizó un inmunosupresor químico, la ciclofosfamida que es un quelante de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), uniéndose a los nucleosomas; disminuye la fagocitosis, el número de macrófagos, la producción de linfocinas y la actividad de los linfocitos asesinos naturales NK (Sell, 1996), además de que a la dosis que se utilizó (200 mg/kg) inhibe la reproducción celular. Se aplicó en una dosis única, por vía intraperitoneal, al inicio del tratamiento con acíbar. El otro supresor de la respuesta inmune fue un modelo biológico, el linfoma murino L5178Y, el cual alcanza el estado de inmunosupresión en los ratones BALB/c a los 10 días de desarrollo, según Daneri-Navarro. Nuestros resultados, en la cinética de la supresión del linfoma, muestran que entre el 5º y 6º día de evolución inicia un estado de supresión que termina por establecerse,

notablemente, para el día 7, cuando se inocula a los ratones con 1×10^7 células de linfoma. Daneri-Navarro y col., utilizan el líquido de ascitis del tumor y el suero de ratón con linfoma con 10 días de desarrollo para inmunosuprimir a otros animales no tratados con linfoma.

Los mecanismos de supresión que presenta el linfoma L5178Y no son bien conocidos, por lo tanto fue necesario realizar el estudio de la cinética de supresión. Para utilizar el modelo biológico de inmunosupresión bien establecido, la valoración de la respuesta inmune específica e inespecífica, se dio a los 10 días de desarrollado del tumor, ya que en este tiempo el ratón esta completamente suprimido (gráfica 2).

Los resultados obtenidos de la evolución de la respuesta inmune específica, de los ratones BALB/c inoculados con 1×10^7 células de linfoma, y 10 días de desarrollo tumoral, nos muestran que la supresión es general tanto para la respuesta humoral (Tabla 3), como para la respuesta celular (gráfica 6).

Como ya se menciona arriba, los hospederos con tumor frecuentemente presentan una depresión multifactorial de la respuesta inmune, la cual, frecuentemente es atribuida a la existencia de factores supresores en los fluidos biológicos de los pacientes con tumor o en el sobrenadante de los cultivos de células tumorales. La lista de estos factores incluye citocinas derivadas del tumor o del hospedero tales como IL-3, IL-4, GM-CSF, TGF- β , IFN- γ y prostaglandinas (Weinberg, 1996; Daneri-Navarro, 1995).

En cambio, la respuesta inespecífica no se ve deprimida, ni la fagocitosis (gráfica 3), ni la capacidad de ingestión y digestión de los MA (gráfica 4). Probablemente por ser, el linfoma de origen tímico (Tapía y col, 1976) no afecte en forma directa a los macrófagos alveolares, o por su situación anatómica, dentro de los alvéolos pulmonares que les permitió no tener contacto directo con el linfoma.

Cuando se administró 1 mg/Kg de peso/día del liofilizado de acíbar de *A. vera* durante 10 días por vía orogástrica diluido en 0.1 ml de agua estéril inyectable, la respuesta inmune específica (humoral y celular) (gráficas 5,6 y tablas 3 y 4) y la inespecífica (fagocitosis) (gráfica 3) se ven estimuladas en los ratones sanos, aunque la capacidad ingestiva y digestiva no es alterada (gráfica 4). Esta modificación tal vez se deba a la acción de sustancias iguales o parecidas al acemannan que actuando sobre los macrófagos estos estimulen la respuesta inmune en su fase aferente en el reconocimiento y presentación del antígeno. Como lo reporta Stuart, los macrófagos peritoneales (MP) de ratón C57BL/6, en cultivo, presentan una actividad elevada del metabolismo respiratorio, la fagocitosis y la capacidad digestiva contra *Cándida albicans* cuando la albúmina bovina manosilada se une a los receptores a manosa de los MP. En otra investigación, Stuart y col., prueban la acción del acemannan, un polisacárido obtenido del gel de las hojas de *A. vera*, y observa el mismo comportamiento de los MP que con la albúmina manosilada (Stuart, 1997). Karaca y Zhang, coinciden en que los macrófagos son células pluripotentes capaces de ser estimuladas por sus receptores de membrana a manosas mediante la unión del acemannan. Karaca y col., determinaron que el acemannan estimula la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos de pollo, la estimulación fue dosis dependiente, y que puede ser mediada a través de los receptores de manosa de los macrófagos, también concluyen que los efectos inmunomoduladores del acemannan, en los pollos, sean por la estimulación de los macrófagos (Karaca, 1995). De igual forma, Zhang establece que los efectos de aceleración de la curación de heridas, inmunoestimulador, anticancerígeno y antiviral que presenta el acemannan debe de ser por una vía de células efectoras pluripotentes como los macrófagos. Él estableció que en cultivo la línea celular RAW 264.7 de macrófagos murinos, fue capaz de producir citocinas, liberar ON, expresar moléculas de superficie y cambios morfológicos celulares, cuando se les estimuló con acemannan, estableciendo que la producción de IL-6 y el TNF α fue dosis dependiente y que los cambios morfológicos, la producción de ON y la expresión de receptores de superficie fueron aumentados en respuesta a la estimulación por una mezcla de acemannan e IFN γ . Concluyen con estos resultados

que, al menos en parte, el acemannan actúa a través de la activación de los macrófagos (Zhang, 1996; Karaca, 1995).

Tal vez el acíbar contiene dicho polisacárido y es capaz de viajar por el torrente sanguíneo y actuar en los receptores a manosa de los MA, estimulándolos a fagocitar (*in vivo*), pero no a digerir ni aumentar su avidez por las levaduras. Esta ausencia de digestión, probablemente sea por falta de más estímulo por parte del acemannan, ya que Stuart determina que los MP en cultivo (*in vitro*) aumentan su porcentaje de digestión cuanto más tiempo tienen en contacto con el acemannan (Stuart, 1997). Es necesario realizar otras investigaciones para poder demostrar cualquiera de estas suposiciones.

Sin embargo, los grupos de ratones inmunosuprimidos con 1×10^7 células de linfoma murino L5178Y con 10 días de evolución, tratados con la misma cantidad del liofilizado de acíbar, mostraron una franca recuperación de la respuesta inmune celular (gráfica 6) y en el porcentaje de fagocitosis (número de células que fagocitaron) (gráfica 3), pero la respuesta inmune humoral no presenta recuperación alguna (gráfica 5) al igual que los índices de fagocitosis (IF) y digestión (ID) que no se vieron alterados (gráfica 4). Sell, establece que en la inmunidad contra tumores, las células responsables de la hipersensibilidad retardada (T_{DTH}), específicamente reconocen antígenos en tejidos y son activados para liberar mediadores que atraen y activan a los macrófagos. Los macrófagos activados son capaces de fagocitar y destruir las células tumorales. En algunos modelos animales este mecanismo es altamente efectivo en la destrucción de tumores *in vivo*, pero este mecanismo no puede ser reproducido *in vitro* (Sell, 1996). Por otro lado, los macrófagos también pueden ser activados por una variedad de agentes, incluyendo micobacterias (BCG) y polinucleótidos. El mecanismo de este tipo de destrucción tumoral, envuelve la actividad fagocítica de los macrófagos, a través de la formación de radicales libres de O_2 y la activación de enzimas proteolíticas. (Sell, 1996). Tal vez a este fenómeno de activación de linfocitos T_{DTH} , por el DNFB y la de

macrófagos por agentes inespecíficos, aunado, en forma sinérgica, por el acíbar, la RIC se observe restablecida.

Por otro lado, la inmunosupresión obtenida por la aplicación de la ciclofosfamida, no fue modificada por la aplicación del acíbar, ya que el efecto supresor de esta sustancia se da por su afinidad a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) impidiendo su replicación, por lo que las células afectadas no pueden responder a ningún tipo de estímulo (Sell, 1996).

Se observa que las investigaciones actuales evocan la participación de los macrófagos como posibles blancos de acción de las sustancias inmunoestimuladoras de *A vera*, por su efecto relacionado con la unión a receptores de manosa (Stuart, 1997). Además la variedad de fenómenos curativos que presentan, (inmunoestimulador, bactericida, fungicida, antiviral y antitumor) tanto el gel como el acíbar, de *Aloe vera* solo se explican desde la activación de células reguladoras de una serie de eventos celulares que estimulan el sistema de defensa como lo es el macrófago. Queda por dilucidar los efectos del acíbar de *Aloe vera* sobre la fisiología del macrófago y su interacción con el proceso inmunológico, además de investigar si también estimula a otro tipo de células presentadoras de antígenos como los linfocitos B, las células de Langerhans, en la piel o la microglia en el sistema nervioso central.

Por otra parte, en el análisis cromatográfico en placa fina se observan compuestos con mediana o poca polaridad, estos pudieran ser como los encontrados, por Yamaguchi y Zonta, en el gel de *Aloe vera* como los ácidos grasos, que se encuentran en gran cantidad (Yamaguchi, 1993) y que intervienen en la comunicación inter e intracelular, como segundos mensajeros (Alberts, 1994; Devlin, 1997), así como el ácido linoléico, que ha sido caracterizado como un inmunomodulador (Pisha, en Wagner, 1994). Vazquez y col. encontraron sustancias como esteroides (saponinas), antraquinonas y triterpenos, en el gel de *Aloe vera*, con actividad antiinflamatoria (Vázquez, 1996),

estos compuestos, obtenidos de otras plantas, han sido probados como imunoestimuladores (Wagner, en Arnason, 1995).

Con la observación de estos fenómenos se puede decir que, el acíbar de *A. vera*, actúa estimulando la respuesta inmune en ratones sanos e inmunosuprimidos, y que además de modularla, rescatándola de un estado de inmunosupresión, también la estimula en estado normal.

Falta comprobar que el acíbar pueda contener los mismos compuestos que el gel y probar los efectos inmunobiológicos de las fracciones obtenidas

CONCLUSIONES

1. La DL_{50} obtenida para el acíbar fue de 2.5 g/Kg, la dosis terapéutica fue mil veces menor de la dosis de 1 g/Kg que no provocó ningún daño a los ratones, por lo que el acíbar de *Aloe vera* se dosificó de 1 mg/Kg por vía orogástrica por 10 días.
2. El Linfoma murino L5178Y induce inmunosupresión en los ratones BALB/c, inoculados con 1×10^7 células por vía intraperitoneal, en la respuesta inmune celular *in vivo* al 5º día, y se establece en forma franca a partir del día 7º. A los 10 días de evolución del tumor se observa, también, la supresión de la respuesta inmune humoral, pero la respuesta inmune inespecífica no se ve alterada, ni la fagocitosis ni los índices ingestivo y digestivo de los macrófagos alveolares.
3. El acíbar liofilizado de *Aloe vera*, dosificado en 1 mg/Kg/día, durante 10 días por vía orogástrica, en ratones BALB/c sanos tiene efecto inmunoestimulador en la respuesta inmune específica e inespecífica.
4. El acíbar de *A. vera* a dosis de 1 mg/Kg durante 10 días, rescata a ratones BALB/C de la supresión producida por el linfoma L5178Y a la respuesta inmune celular y a la fagocitosis, pero no hace lo mismo con la respuesta inmune humoral y los índices de ingestión y digestión de los MA.
5. La inmunosupresión con ciclofosfamida a dosis única de (200 mg/Kg) por vía ip no es modulada por el acíbar de *A. vera*.
6. La cromatografía en capa fina revela una mezcla de compuesto que, debido al solvente que se utilizó, presentan características medianamente polares.

CUCBA
UNIVERSIDAD DE CUBA

LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

1. **Población experimental pequeña (n).** Se realizaron los experimentos con grupos pequeños con una n de 5 individuos debido a que los ratones son organismos singénicos (genéticamente iguales) y se mantuvieron con variables ambientales controladas, iguales para todos. Sería conveniente aumentar la n para tener una mejor valoración estadística.
2. **Prueba de hemaglutinación.** Es una técnica con baja sensibilidad para medir la producción de anticuerpos, pero de fácil manejo, económica y confiable en sus resultados, además se sigue utilizando con frecuencias para medir la respuesta inmune humoral (Ivanovska, 1996; Agarwal, 1994). Por otro lado, en ensayos previos en nuestro laboratorio vimos una correlación de resultados entre la prueba de hemaglutinación y la técnica de células formadoras de placas, resultados que no se publicaron en este trabajo por no haber concluido todos los grupos experimentales con esta técnica.
3. **Cultivo de transformación blastoide.** En nuestro trabajo no contemplamos trabajar con técnicas *in vitro*, es por eso que no lo realizamos, ya que primero deseábamos demostrar el efecto del acíbar en los organismos vivos, pero dentro de nuestras expectativas a futuro, es realizar dichos estudios con el objeto de ver su efecto mitogénico y su interacción molecular con las células en cultivo.
4. **Estudios cromatográficos.** Como se menciona en el texto, los compuestos del acíbar no se conoce, por lo que nosotros hicimos un estudio muy incipiente sobre la caracterización química de él, falta realizar estudios cualitativos que nos permita conocer los compuestos que lo forman y separarlos para probar biológicamente su acción de cada uno, con procedimientos cromatográficos mas específicos.

BLIOGRAFIA.

Alberts, B.; Dennis, B.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J.D.: Molecular Biology of the Cell. 3ª ed. Garland Publishing, Inc.1994.

Agarwal, A.K.; Singh, M.; Gupta, N.; Saxena, R.; Puri, A.; Verma, A.K.; Saxena, R.P.; Dubey, C.B. and Saxena, K.C.: Management of giardiasis by an immuno-modulatory herbal drug Pippali rasayana. J. of Ethnopharmacology. 1994; 44: 143-146.

Arion, V. Y.: Sanina, I.V., Breusov, Yu. N. Chemistry and Biology of Immunoregulators, "Zinatne". Riga, 1985. 39-52.

Arnason, J.T.; Mata, R. and Romeo, J.T.: Phytochemistry of Medicinal Plants, Vol. 29. Edit. Plenum Press 1995.

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo III. Arturo Argueta Villamar (Coordinador Gral.). 1ª Ed. Instituto Nacional Indigenista. 1994.

Azuine, M.A. and Bhide, S.V.: Adjuvant chemoprevention of experimental cancer: catechin and dietary turmeric in forestomach and oral cancer models. J.of Ethnopharmacology. 1994; 44: 211-217.

Bah, M.; Bye, R. and Pereda-Miranda, R.: Hepatotoxic Pyrrolizidine alkaloids in the Mexican medicinal plant *Packera candidissima* (Asteraceae: Senecioneae). J. of Ethnopharmacology. 1994; 43: 19-30.

Borchers AT, Hackman RM, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. Complementary medicine: a review of immunomodulatory effects of Chinese herbal medicines. Am. J. Clin. Nut. 1997 Dec; 66 (6): 1303 - 1312.

Bye, R.; Linares, E.: The Role of Plants Found in the Mexican Markets and their importance in Ethnobotanical Studies *Journal of Ethnobiology*. 1978; 3 (1): 1 - 13.

Courreges, M.C.; Benencia, F.; Massouh, E.J. and Coulombie, F.C.: In vitro antiphagocytic effect of *Melia azedarach* leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells. *J. of Ethnopharmacology*. 1994; 43: 135 - 140.

Cunningham, A.J.; Szenberg, A.: Further improvements in the Plaque Technique for Detecting Single Antibody-Forming Cells. *Immunology*. 1968; 14: 599 - 600.

Daneri-Navarro, A.; Del Toro-Arreola, A.; García-Velazco; Del Toro-Arreola, S; Orbach-Arbouys, S.; and Bravo-Cuellar, A.: L5178Y lymphoma associated immunosupresion in BALB/c mice. *Biomed & Pharmacother*. 1995; 49; 39 – 44.

Davis RH, Stewart GJ, Bregman PJ.: Aloe vera and the inflamed synovial pouch model. *J Am Podiatr Med Assoc*. 1992 Mar; 82 (3): 140 – 48.

De la Cruz, M.: Badiano, J. :*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, Manuscrito Azteca de 1552, según traducción Latina de Juan Badiano. México, D.F. : Instituto Mexicano del Seguro Social. 1964.

De, S.; Ravishankar, B. and Bhavsar, G.C.: Investigation of the anti-inflammatory effects of *Paederia foetida*. *J. of Ethnopharmacology*. 1994; 43: 31 - 38.

Devlin, M.T.: *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. 1997. Ed. Wiley – Liss.

Domínguez, X.A.: *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 1973. Ed. Limusa, México, pp 281.

Essam Abdel Sattar, Ahmed M. Galal and Gaber S. Mossa.: Antitumor Germacranolides from *Anivella Garcinii*. J. Nat. Prod. 1996; 59, 403 - 405.

Etlinger, H.M.; Hodgins, H.D.; Chiller, J.M.: Evolution of the Lymphoid System. Journal of Immunology. 1976. 116: 1547 - 1553.

Gad, S. C.: The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. Toxicology 93. 1994; 33 - 46.

Gabius, H-J.; Gabius, S.; Joshi, S.S.; Koch, B.; Schroeder M; Manzke, W.M. and Westerhausen M.: From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: Will there be a reason for oncological application of mistletoe. Planta Med. 1994; 60: 2 - 7.

Garg, S.; Talwar, G.P. and Upadhyay, S.N.: Comparison of extraction procedures on the immunocontraceptive activity of neem seed extracts. J. of Ethnopharmacology. 1994; 44: 87 - 92.

Giral Gonzalez, F.: "Fitoquímica de las Plantas Medicinales Mexicanas" en Memorias del Coloquio: "Estado Actual del Conocimiento en Plantas Medicinales Mexicanas". IMEPLAN A.C. Luz Saviñón 214, Mex. 12, D.F. 1976: 103 - 107.

Gómez Pompa, A.: "El Instituto de Investigaciones de Recursos Bióticos, A.C." en Memorias del Coloquio: "Estado Actual del Conocimiento en Plantas Medicinales Mexicanas". IMEPLAN A.C. Luz Saviñón 214, Mex. 12, D.F. 1976: 217 - 226.

Granados-Sánchez, D. y Castañeda-Pérez, A.D.: Sábila, *Aloe barbadensis* Mill. Planta agroindustrial (medicinal) del desierto. Universidad Autónoma de Chapingo. 1988.

Haller, J. S.: A drug for all seasons medical and pharmacological history of aloe. Bull. N.Y. Acad. Med. 1990; 66 (6): 647- 657.

Hashimoto, K.; Yanagisawa, T.; Okui, Y.; Ikeya, Y.; Maruno (Chin), M. and Fujita, T.: Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldi*. *Planta Med.* 1994; 60: 124-127.

Hutter JA, Salman M, Stavinoha WB, Satsangi N, Williams RF, Streeper RT, Weintraub ST.: Antiinflammatory C-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *J Nat Prod* 1996 May; 59 (5): 541 - 543.

Ivanovska, N.; Philipov, S.; Istatkova and Georgieva, P.: Antimicrobial and immunological activity of ethanol extracts and fractions from *Isopyrum thalictroides*. *J. Ethnopharmacology.* 1996 (54) 143 – 151.

Ingolfssdottir, K.; Jurcic, K.; Fischer, B. and Wagner H.: Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. *Panta Med.* 1994; 60: 527 - 531.

Kahlcon, J.B.; Kemp, M.C.; Carpenter, R.H.; McAnalley, B.H.; McDaniel, H.R. and Shannon, W.M.: Inhibition of AIDS virus replication by acemannan in vitro. *Mol. Biother*, 1991 Sep; 3:3, 127 - 135.

Kandil, o.; Radwan, M.N.; Hassan, A.B.; Amer, A.M.M.; and El-Banna, H.A. and Amer W.M.M.: Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *J. of Ethnopharmacology.* 1994; 44: 19 - 24.

Karaca K, Sharma JM, Nordgren R.: Nitric oxide production by chicken macrophages activated by Acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Int J Immunopharmacol* 1995 Mar; 17 (3): 183 – 188.

Kok, L.D.S.; Wong, C.K.; Leung, K.N.; Tsang, S.F.; Fung, K.P. and Choy, Y.M.: Activation of the anti-tumor effector cells by Radix bupleuri. Immunopharmacology. 1995; 30: 79 - 87.

Kondo, Y.; Takano, F. and Hojo, H.: Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicrin in mice. Planta Med. 1994; 60: 414 - 416.

Kumar, V.L. and Basu, N.: Anti-inflammatory of latex of Calotropis procera. J. of Ethnopharmacology. 1994; 44: 123 - 125.

Lee, G-I; Ha, J.Y.; Min, K.R; Nakagawa, H.; Tsurufuji, S.; Chang, I-M. and Kim, Y.: Inhibitory effects of Oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-Activated rat Macrophages. Planta Med. 1995; 61: 26 - 30.

Leff, E.: La Formación de recursos humanos en salud ambiental en América Latina. Materiales de la Red de Formación Ambiental para América Latina y El Caribe. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 1995.

Lesuisse, d.; Berjonneau, J.; Ciot, C.; Devaux, P.; Doucet, B.; Gourvest, J.F.; Khemis, B.; Lang, C.; Legrand, R.; Lowinski, M.; Maquin, P.; Parent, A.; Schoot, B. and Teutsch.: Determination of Oenone B as the Active 5- α - Reductase-Inhibiting Principle of the Folk Medicine *Epilobium parviflorum*. J. Nat. Prod. 1996 ; 59, 4990 - 492.

Lewis, H.W. and Elvin-Lewis, P.F.: Medical Botany, Plants Affecting Man's Health. John Wiley & Sons, Inc. 1977.

Levey, R. H.: La Hormona del Timo. 1964. en Inmunología. Prensa Científica. 2ª edición. 1984; 129 - 135.

CUC

Linares, E.; Bye, R.; Flores, B.: Tés Curativos de México. Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías, México, D.F. 1984.

Linares, E.; Flores, B.; Bye, R.: Selección de Plantas Medicinales de México. México, D.F.: Edit. Limusa-Noriega.1990.

Loomis, T. D.: Fundamentos de Toxicología Ed. Zaragoza, Esp. Edit. Acribia [1982].

López-Coronado, G. A.: Contribución a las plantas medicinales de los tianguis de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Guadalajara, 1994.

Lozoya, X.: Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. Investigación y Ciencia. 1997; 254, 4 - 10.

Mata, Raquel.: Chemical studies and biological aspects of some mexican plants used in traditional medicine. en Phytochemical Potential of Tropical Plants. Edited by K.R. Downum et al., Ienum Press, N.Y. 1993; 41 – 62.

McCormick, J.L. ; McKee, T.C. ; Cardellina II, J.H. and Boyd. M.R. : HIV Inhibitory Natural Products. 26. Quinoline Alkaloids from *Euodia roxburghiana*. J. Nat. Prod. 1996 ; 59, 469 - 471.

Mohaghehpour, N.; Gelber, R.H.; Engleman, E.G.: T Cell Defect in Lepromatous Leprosy is Reversible in vitro in the Absence of Exogenous Growth Factors. J. Immunol. 1987; 138: 570 - 574.

Mori, M.; Fuchigami, M.; Inoue, N; Nagai, H.; Koda, A. and Nishioka, I.: Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response. Planta Med. 1994; 60: 445 - 449.

Mori, M.; Fuchigami, M.; Inoue, N; Nagai, H.; Koda, A.; Nishioka, I and Meguro, K.: Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response: Effect of Phellodendrine on cellular and humoral immune responses. *Planta Med.* 1995; 61: 45 - 49.

Navarro-Ruiz, A.; Bastidas-Ramírez, B.E.; García-Estrada, J.; Garcí-López, P. and Garzón, P.: Anticonvulsant activity of *Casimiroa edulis* in comparison to phenytoin and phenobarbital. *J. of Ethnopharmacology.* 1995; 45: 199 - 206.

Numata, M.; Yamamoto, A.; Moribayashi, A. and Yamada, H.: Antitumor components isolated from the Chinese herbal medicine *Coix lachryma-jobi*. *Panta Med.* 1994; 60: 356 - 359.

Peng, S.Y.; Norman, J.; Curtin, G.; Corrier, D.; McDaniel, H.R. and Busbee, D.: Decreased mortality of Norman murine sarcome in mice treated with the immunomodulator, acemannan. *Mol. Biother.*, 1991; 3: 79 - 87.

Pomilio, A.B.; Rutty-Solá, G.A.; Mayer, A.M.S. and Rumi, L.S.: Antitumor and cytotoxic screen of 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. *J. of Ethnopharmacology.* 1994; 44: 25 - 33.

Roberts, D.B. and Travis, E.L.: Acemannan-containing wound dressing gel reduces radiation-induced skin reactions in C3H mice. *I. J. Radiation Oncology. Biology. Physics.* 1995; 32: 1047 - 1052.

Rodríguez-Chávez, J.M. y Gómez-Campos, A.: Plantas que curan. *Guía México Desconocido.* 1996; No. 29.

Roitt, I.M.: *Essential Immunology.* 7a. Ed. Blackwell Scientific Publications, 1991.

Salisbury, F.B. and Ross, C.W.: Plant Physiology. 4^a Ed. Wadsworth Publishing, Ca. 1992.

Sell, S.: Immunology, Immunopathology and Immunity. 5^a Ed. Appleton & Lange, 1996.

Sheets, M.A.; Unger, B.A.; Giggelman, G.F. Jr. and Tizard, I.R.: Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. Mol. Biother, 1991, Mar; 3:1, 41 - 45.

Slowing, K; Carretero, E. and Villar, A.: Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. J. of Ethnopharmacology. 1994; 43: 9 - 11.

Streilein, W.P.; Galen, T.T.; Toews, M.D.; James, N.G.; Bergstresser, P.R.: The Role of Langerhans Cell Sensitivity within Epidermis. J. Invest. Dermatol. 1980; 74: 319 - 322.

Stuart RW, Lefkowitz DL, Lincoln JA, Howard K, Gelderman MP, Lefkowitz SS.: Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. Int J Immunopharmacol. 1997. Feb; 19 (2): 75 - 82.

Sur, P. and Ganguly, D.K.: Tea plant root extract (tre) as an antineoplastic agent. Planta Med. 1994; 60: 106 - 109.

Suresh, K. and Vasudevan, D.M.: Augmentation of murine natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity activities by *Phyllanthus emblica*, a new immunomodulator. J. of Ethnopharmacology. 1994; 44: 55 - 60.

Sun, H. ; Qui, S. ; Lin, L. ; Wang, Z. ; Lin, Z. ; Pengsupard, T. ; Pezzuto, J.M. ; Fong, H.H.S. ; Cordell, G.A. ; and Farnsworth, N.R.: Nigranoic Acid, a Triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* That Inhibits HIV- I Reverse Transcriptase. J. Nat. Prod. 1996; 59: 525 - 527.

Syed TA, Ahmad SA, Holt AH, Ahmad SA, Ahmad SH, Afzal M. Management of psoriasis with Aloe vera extract in a hydrophilic cream: a placebo-controlled, double-blind study. Trop Med Int Health. 1996. Aug; 1 (4): 505 - 509.

Svendsen, L.; Rattan, S.I.S. and Clark,B.F.C.: Testing garlic for possible anti-ageing effects on long-term growth characteristics, morphology and macromolecular synthesis of human fibroblasts in culture. J. of Ethnopharmacology. 1994; 43: 125 - 133.

Tapía, A.G.; Arellano, B.G.; Gómez, E.H.; Fernández, Q.P.: Partículas viroides tipo a y c en el linfoma murino L5178Y. Arch. Invest. Med. (Méx.). 1976, 7: 9 – 16.

Vázquez, B.; Avila, G.; and Escalante, B.: Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. J. of Ethnopharmacology. 1996. Dec; 55; 1: 69 - 75.

Wagner, H. and Farnsworth, N.R.: Economic and Medicinal Plant Research, Volume 6. Academic Press Limited. 1994: 189 - 226.

Wagner, H.K.M. en : Phytochemistry of Medicinal Plants, Arnason, J.T. ; Mata, R. and Romeo, J.T. Vol. 29. 1 - 17. Edit. Plenum Press 1995.

Weinberg, R.A.: How Cancer arises.: Scientific American. 1996; 275 (3): 32 – 42.

Womble, D. and Helderman, J.H. : Enhancement of alloresponsiveness of human lymphocytes by acemannan. Int. J. Immunopharmac. 1988; 10: 967 - 974.

Yamaguchi, I.; Mega, M. and Sanada, H. : Components of Gel of *Aloe vera* (L.) Burm. F. Biosci. Biotech. Biochem. 1993; 57 (8): 1350 - 1352.

Yagi A, Egusa T, Arase M, Tanabe M, Tsuji H: Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells in vitro from Aloe vera gel. Planta Med. 1997. Feb; 63 (1): 18 – 21.

Zonta, F.; Boboni, P.; Masotti, P.; Micali, G. : High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances. Journal of Chromatography A. 1995 ; 718 : 99 - 106.

Dr. EDUARDO RIOS JARA
COORDINADOR DEL POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLOGICAS
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por el C. **ARTURO OROZCO BAROCIO**, con el título: **MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES BALB/c TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera*, CON LINFOMA MURINO L5178Y**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro en particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Zapopan, Jal., a 3 de abril de 1998


Dr. VITALY Y. ARION
DIRECTOR DE TESIS


Dra. GALINA ZAITSEVA P
ASESOR

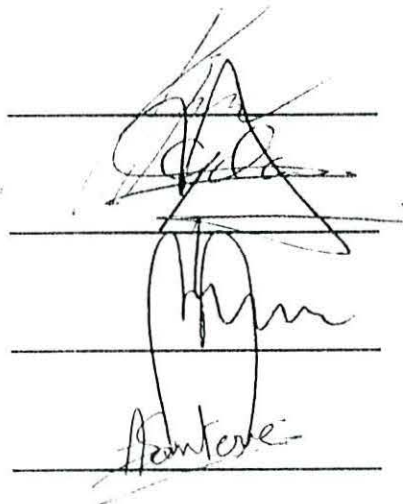
COMITÉ TUTORIAL:

Dra. Galina Zaitseva Petrovna

Dr. Adrian Daneri Navarro

Dr. Servando Carvajal

Dra. Anne Santerre Lucas



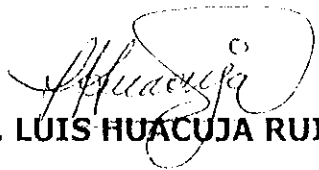
Dr. EDUARDO RIOS JARA
COORDINADOR DEL POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLOGICAS
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, me permito informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por el C. **ARTURO OROZCO BAROCIO**, con el título: **MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES BALB/c TRATADOS CON ACIBAR DE *Aloe vera*, CON LINFOMA MURINO L5178Y**, considero que ha quedado debidamente concluido para su impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro en particular, agradezco de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Zapopan, Jal., a 3 de abril de 1998


DR. LUIS HUACUJA RUIZ
Jurado de la tesis.



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas

**M.C. ELIAS SANDOVAL ISLAS
COORDINADOR DE INVESTIGACION Y POSGRADO
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E**

Por este conducto le solicito a Usted hacer los trámites correspondientes para realizar **el examen de grado de Doctor en Ciencias** del M.C. **ARTURO OROZCO BAROCIO**, que concluyó satisfactoriamente todos los créditos del Doctorado en Ciencias Biológicas en el área de Inmunobiología.

La fecha de examen propuesta por el Consejo del Posgrado es el **7 de mayo** del presente año, **a las 17:00 hrs.** en la sala de exámenes de la División de Ciencias Biológicas; así mismo, los miembros, propuestos para el jurado son los siguientes:

Presidente:	Dra. en C. Galina Zaitseva Petrovna
Secretario:	Dr. en C. Adrian Daneri Navarro
Vocal Propietario:	Dr. en C. Servando Carvajal Hernández
Primer Vocal:	Dr. Luis Huacuja Ruíz
Segundo Vocal:	Dra. en C. Anne Santerre Lucas

Sin otro por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Piensa y Trabaja"

Dr. Eduardo Ríos Jara

Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológicas
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., el 27 de abril de 1998