
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias de la Salud

DOCTORADO EN INMUNOLOGÍA



TESIS DE GRADO

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANTITUMORAL E INMUNOLÓGICA DE
EXTRACTOS OBTENIDOS DE
*Bursera fagaroides.***

PRESENTA:

M. en C. Ana María Puebla Pérez

TUTOR

D. en C. LUIS HUACUJA RUIZ

COTUTOR

DR. XAVIER LOZOYA LEGORRETA

ASESOR

D. en C. GALINA ZAITSEVA PETROVNA

GUADALAJARA, JALISCO. DICIEMBRE DE 1999.

Esta Tesis se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano de Seguro Social, bajo la Tutoría del Dr. en C. Luis Huacuja Ruiz, la Cotutoría del Dr. Xavier Lozoya Legorreta y en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la asesoría de la Dra. en C. Galina Zaitseva Petrovna.

Fue financiado parcialmente por CONACYT con No. de registro 0479P/N9506 y por la Dirección de Prestaciones Médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social. No de Proyecto FP-0038/411.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
COORDINACION DE POSGRADO

042/99.

DRA. EN C. GALINA ZAITSEVA PETROVNA
PRESENTE.

Por este medio me permito invitar a usted a participar como **SECRETARIO** en el cuadro de sinodales del examen que sustentará la M. EN C. **ANA MARIA PUEBLA PEREZ**, alumna del Doctorado en Inmunología con el tema de tesis: "**ACTIVIDAD CITOTOXICA, ANTITUMORAL E INMUNOLOGICA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE BURSERA FAGOROIDES**" el **jueves 2** de diciembre del presente año a las **14:00 hrs.**, en el 3er. Nivel módulo "**Q**" Aula de exámenes de Posgrado de este Centro Universitario.

Sin otro particular y esperando su puntual asistencia, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jalisco. Noviembre 25 de 1999.

DR. EN C. ADRIAN DANERI NAVARRO
COORDINADOR DE POSGRADO

ADN/rvl.

Sierra Mojada No. 950, Puerta 7
Edif. "A", planta baja
Col. Independencia, C.P. 44340
Tels y Fax. 617-04-02 y 617-03-35
Guadalajara, Jalisco. México

I. ABSTRACT

Bursera fagaroides, “copalillo”, is a mexican medicinal plant. The traditional medicine reported that it have an anticancer effect. It was also studied for its immobilization and agglutination effects on human and mouse spermatozoa, however the high toxicity limited in vivo studies. The purpose of this study was to evaluate the citotoxic and antitumour activity of *B. fagaroides* ethanol extracts in a murine test system L5178Y lymphoma. Likewise, we investigated how the antitumour therapeutic dose exert influence in the immune response of mice with lymphoma. For this purpose we studied the citotoxic activity of three liophilized ethanol extracts from *B. fagaroides* stem bark. The citotoxic activity of the three liophilized was dose-dependent and DE-50 of the L5178Y lymphoma cells in culture was 20 µg/ml. The phytochemistry revealed that the three liophilized was positive for saponins and flavonoids. The thin layer chromatography (TLC) gave three similar principals compounds in the three liophilized. For the in vivo assays we used male BALB/c mice. DL-100 was 400 mg/kg and DL-50 was 250 mg/kg. The antitumour activity measuring survival of BALB/c mice (2×10^4 cells L5178Y i.p.). 24 h after inoculation mice were treated with sublethal doses of 50 or 100 mg/kg of extract daily, over 15 days in independent groups of 10, using two administration routes. Oral administration resulted in 8% of mice being tumour free after 60 day while i.p. administration showed 26% survived at dose of 100 mg/kg/day for 15 days. To evaluate the influence of *B. fagaroides* on immune response of BALB/c mice with L5178Y lymphoma we observed that the phagocytic activity of alveolar macrophages was increased. Likewise the cellular immune response evaluated by delayed type hypersensitivity (DTH) to DNFB and by proliferation of splenocytes in response to PHA was enhanced in immunosuppressor mice. With this results we suggest that the therapeutic efficacy of the ethanolic extract of this plant is mediated in part by it immunoregulators effects.

I. RESUMEN

Bursera fagaroides “copalillo”, es una planta medicinal mexicana y la Medicina Tradicional le atribuye efecto anticancerígeno, ha sido estudiada con fines anticonceptivos, ya que causó inmovilización y aglutinación de espermatozoides tanto de humano como de ratón, sin embargo, su alta toxicidad limitó los estudios *in vivo*. El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad citotóxica y antitumoral de extractos hidroalcohólicos obtenidos de *B. fagaroides* utilizando como modelo *in vitro* e *in vivo* el linfoma murino L5178Y. Así mismo, se investigó de qué forma influye la dosis terapéutica antitumoral en la respuesta inmune de ratones portadores de tumor. La actividad citotóxica de tres liofilizados obtenidos de la corteza de la planta, fue dosis dependiente y la dosis que mató al 50 % (DE-50) de las células de linfoma L5178Y en cultivos de 24 h correspondió a 20 µg/ml. El análisis fitoquímico por técnicas cualitativas fue positivo a saponinas y flavonoides. El análisis cromatográfico (TLC) reveló principalmente tres compuestos en los liofilizados. Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones machos BALB/c. La DL-100 fue de 400 mg/kg y la DL-50 de 250 mg/kg. La actividad antitumoral se determinó mediante sobrevida de ratones previamente inoculados con 2×10^4 células L5178Y i.p. y tratados 24 h después con el extracto de la planta a razón de 50 y 100 mg/kg de peso corporal, diariamente durante 15 días en grupos independientes de 10 por grupo utilizando dos vías de administración. El extracto a dosis de 100 mg/kg/día por 15 días por vía oral mostró actividad antitumoral en el 8 % de los animales y por vía intraperitoneal en el 26 % ya que no desarrollaron tumor en un periodo de observación de 60 días. La influencia de *B. fagaroides* en la actividad fagocítica de ratones portadores del linfoma mostró incremento en macrófagos alveolares. Así mismo, la respuesta inmune celular valorada por la prueba al DNFB, y por proliferación de los esplenocitos de ratones portadores de tumor también se observó recuperada. Por ello, es posible que la eficacia terapéutica del extracto hidroalcohólico de esta planta sea mediada en parte por sus efectos inmunoreguladores.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| <i>I. RESUMEN</i> | ii |
| Tabla de contenido | iii |
| Lista de figuras..... | iv |
| Agradecimientos | v |
| Dedicatorias | vi |
| Abreviaciones | vii |
| | |
| <i>II: ANTECEDENTES CIENTÍFICOS</i> | 9 |
| 1. Cáncer (Generalidades)..... | 9 |
| 2. Tratamiento del Cáncer..... | 11 |
| 3. Las plantas en el tratamiento del cáncer..... | 12 |
| 4. Mecanismos Básicos de la Respuesta Inmune..... | 18 |
| 5. Respuesta Inmune Antitumoral..... | 21 |
| 6. Plantas Medicinales con Actividad Inmunomoduladora | 24 |
| | |
| <i>III: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i> | 28 |
| | |
| <i>IV: HIPÓTESIS</i> | 29 |
| | |
| <i>V: OBJETIVOS</i> | 30 |
| | |
| <i>VI: DISEÑO EXPERIMENTAL</i> | 31 |
| | |
| <i>VII: MATERIAL Y MÉTODOS</i> | 32 |
| | |
| <i>VIII. RESULTADOS</i> | 43 |
| | |
| FIGURAS Y TABLAS..... | 52 |
| | |
| <i>IX DISCUSIÓN</i> | 71 |
| | |
| <i>X CONCLUSIONES</i> | 81 |
| | |
| <i>XI EXPECTATIVAS</i> | 83 |
| | |
| <i>XII BIBLIOGRAFÍA</i> | 84 |

LISTA DE FIGURAS

| <i>Número</i> | <i>Pag</i> |
|---------------|--|
| Figura 1 | <i>Bursera fagaroides</i> 52 |
| Figura 2 | TLC de los liofilizados de <i>Bursera fagaroides</i> 53 |
| Figura 3 | Efecto citotóxico de <i>Bursera fagaroides</i> 55 |
| Figura 4 | DE 50 de los liofilizados de <i>Bursera fagaroides</i> 56 |
| Figura 5 | DL 50 y DL 100 del extracto de <i>Bursera fagaroides</i> 57 |
| Figura 6 | Sobrevida de ratones con L51 y tratados con <i>B.fagaroides</i> 58 |
| Figura 7 | Sobrevida de ratones comparando dos dosis 59 |
| Figura 8 | Sobrevida de ratones comparando vías de administración. 60 |
| Figura 9 | Porcentaje de Fagocitosis de Macrófagos Alveolares 62 |
| Figura 10 | Indice fagocítico de MA 63 |
| Figura 11 | Indice Digestivo de MA..... 64 |
| Figura 12 | Microfotografía de Fagocitosis 65 |
| Figura 13 | Hipersensibilidad Retardada al DNFB 66 |
| Figura 14 | Microfotografías de HSR-DNFB 68 |
| Figura 15 | Proliferación de esplenocitos 69 |
| Figura 16 | Respuesta Inmune Celular valorada por dos pruebas 70 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|-----------|--|
| Tabla I | Efecto citotóxico de <i>Bursera fagaroides</i> 54 |
| Tabla II | Efecto de <i>B. fagaroides</i> en la actividad fagocítica de MA 61 |
| Tabla III | Efecto de <i>B. fagaroides</i> en la RIC 67 |

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en C. Luis Huacuja Ruiz por sus enseñanzas, apoyo y confianza que siempre me ha brindado.

Al Dr. Xavier Lozoya Legorreta por su gran apoyo, estímulo, confianza y sus valiosas orientaciones que ha tenido a bien dispensarme.

A la Dra. en C. Galina Zaitseva Petrovna por sus valiosos conocimientos y orientaciones que siempre recibí incondicionalmente y por su valiosa colaboración.

Al Dr. en C. Adrián Daneri Navarro, Coordinador del Posgrado en Inmunología por sus valiosas enseñanzas, orientaciones e invaluable apoyo.

A todos los Profesores del Posgrado especialmente:

A la Dra. en C. Mary Fafutis Morris.

A la Dra. en C Anne Santerre

Al Dr. en C. Arturo Orozco Barocio

Por sus acertadas orientaciones para la culminación de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeras, amigas y colaboradoras

a la Q.F.B. María Martha Villaseñor García y a la M. en C. María de la Luz Miranda Beltrán.

Al personal del Bioterio del CIBO-IMSS por su gran apoyo.

A la Universidad de Guadalajara, por darme otra oportunidad en mi superación académica.

Al invaluable apoyo de la Lic. Laura Margarita Puebla Pérez.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en este trabajo.

Muchas Gracias.

DEDICATORIA

Esta Tesis la dedico con mucho cariño a una Gran Señora que ha sido una gran amiga y compañera de toda la vida, a mi Madre la señora Ana María Pérez Baez por su gran Amor, Sacrificio, Educación, Paciencia y Bendiciones que me ha otorgado, Muchas Gracias y Dios la bendiga .

A la Memoria de mi Padre el Señor Félix Puebla Ordaz quien sigue viviendo en nuestros corazones y nos sigue acompañado en cada paso por la vida. Dios lo tenga en su Gloria.

A mis Hermanos y a toda la familia por su motivación, cariño y comprensión.

ABREVIACIONES

| | | | |
|---------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| RNA | Ácido Ribonucleico | µg/ml | microgramo x mililitro ⁻¹ |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico | RPMI-1640 | Medio de Cultivo |
| BALB/c | Cepa murina | TGF | Factor de crecimiento transformante |
| L5178Y | Línea tumoral murina | TNF | Factor de necrosis tumoral |
| mg/kg | Unidad de dosificación | MHC | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| DNFB | Dinitrofluorobenceno | IFN | Interferón |
| WA-16 | Carcinoma Walker | NK | Células asesinas naturales |
| DE-50 | Dosis Efectiva 50 | CTL | Linfocitos 'T' citotóxicos |
| DL-50 | Dosis Letal 50 | AAT | Antígenos asociados a tumor |
| TLC | Cromatografía en capa fina | CSF | Factor estimulador de colonias |
| IL | Interleucina | LAK | Células asesinas activadas |
| g | Gramo | TIL | Linfocitos infiltrantes de tumor |
| p/v | Peso x Volumen ⁻¹ | SFT | Suero fetal de ternera |
| L1 | Liofilizado 1 | SSBH | Solución Salina Balanceada de Hank |
| v/v | Volumen x Volumen ⁻¹ | | |
| DBA/2 | Cepa murina | | |
| H-2d | Haplotipo murino | | |

ABREVIACIONES

DL-100 Dosis Letal 100

IE Índice de Estimulación

Rf Velocidad relativa de desplazamiento

ip Intraperitoneal

HSR Hipersensibilidad Retardada

PHA Fitohemaglutinina

LPS Lipopolisacárido

Con A Concanavalina A

DTH Delayed type hypersensitivity

MA Macrófagos alveolares

RIC Respuesta Inmune Celular

II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

1. CÁNCER (GENERALIDADES)

En términos generales puede decirse que, una célula neoplásica maligna, proviene de una célula normal que se transformó como consecuencia de un proceso multifactorial, en el que pueden participar factores biológicos, físicos y químicos que pueden actuar tanto desde el interior como desde el exterior del huésped. Por ello, podemos definir al cáncer como una enfermedad que puede afectar diferentes partes del organismo. Esta patología se caracteriza por una formación rápida e incontrolada de células alteradas en los mecanismos de control que regulan su proliferación y diferenciación y que en ocasiones producen metástasis y hasta pueden causar la muerte del organismo. Esos cambios en el fenotipo de la célula maligna ocurren en individuos con ciertos antecedentes genéticos, en individuos infectados en forma crónica por virus o bacterias, así como en individuos expuestos a carcinógenos químicos y a radiaciones **(1-3)**.

La función de los oncogenes y cómo algunos genes promueven el crecimiento neoplásico, han jugado un papel muy importante en la etiología del cáncer, sin embargo para los diferentes tipos de neoplasias no se conoce una causa definitiva y en la mayoría de los casos siguen siendo desconocidas **(4-7)**.

Una primera clase de genes, los oncogenes responsables de varios tipos de cáncer de las células de mamífero son homólogos a los genes de transformación de los retrovirus, una familia de virus de RNA que inducen la transformación oncogénica. Estos genes celulares en los mamíferos, codifican para factores de desarrollo específicos y sus receptores, y pueden ser amplificados o modificados por un solo nucleótido en las células malignas **(4-6)**.

Otra clase de genes, los genes supresores de tumores, pueden eliminarse o dañarse con cambios neoplásicos resultantes tales como el gen p^{53} que ha mutado de un gen supresor del tumor a un oncogen en un alto porcentaje de casos de tumores humanos, incluyendo a los de hígado, mama, colon, pulmón, cuello uterino, vejiga, próstata y piel. La forma “silvestre” normal del gen p^{53} parece desempeñar una función importante en la supresión de la transformación neoplásica; la mutación de este gen pone en alto riesgo de transformación a la célula **(8)**.

Es indudable que los resultados de estas investigaciones ha permitido entender cómo se desarrolla el cáncer y mejorar estrategias en métodos de prevención y detección, y con ello un mejor pronóstico del paciente; sin embargo, los resultados que se tienen con las medidas terapéuticas actuales no ofrecen de forma ideal la solución definitiva de este proceso patológico.

2. TRATAMIENTO DEL CÁNCER

La cirugía, la radiación y los fármacos (agentes quimioterapéuticos) son las principales formas de tratamiento del cáncer, se han utilizado solas o combinadas con resultados variables, según su efectividad y en función de las características y evolución del tumor, así como al estado del huésped, además de que no son selectivas y dañan en mayor o menor grado las células normales del organismo. Los agentes quimioterapéuticos pueden proporcionar una mejoría temporal de los síntomas, la prolongación de la vida y ocasionalmente la curación (7). En los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo en la síntesis de fármacos con actividad potencial antitumoral. De varios tipos químicos conocidos, se han sintetizado cientos de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer (7). Una gran proporción de ellos han sido consecuencia del descubrimiento de las propiedades antileucémicas de las mostazas nitrogenadas en 1940 (Mecloretamina, Ciclofosfamida, Melfalán y Clorambucilo) (9, 10). La actividad de estos compuestos se atribuye a su capacidad para la alquilación biológica, es decir, tienen la propiedad de intervenir en reacciones fuertemente electrofílicas mediante la formación de complejos de transición con las moléculas blanco o por intermediarios del ión carbónico. Estas reacciones llevan a la formación de enlaces covalentes (alquilación) con diversas sustancias nucleofílicas, incluyendo a grupos funcionales de gran importancia biológica como: fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes tienen relación directa con los componentes del DNA (9-11). Sin embargo, frecuentemente la dosis efectiva de estos agentes resultó ser

prácticamente la misma que la dosis tóxica (12), hecho atribuido a la falta de selectividad del producto. Estos sencillos agentes son sumamente dañinos y ello da lugar a reacciones indiscriminadas con un amplio rango de componentes celulares y como consecuencia, cuando los pacientes están en tratamiento sufren severos efectos colaterales (13). Un producto anticancerígeno eficaz debe destruir o incapacitar las células malignas sin producir daño excesivo a las células normales, este ideal es difícil de lograr. Una estrategia con fines de contrarrestar los efectos colaterales ha sido la síntesis de nuevos antitumorales o la modificación de las estructuras de fármacos conocidos; lo que se ha constituido en una importante línea de investigación (14). Sin embargo, un gran volumen de trabajo de síntesis ha aportado relativamente pocas novedades sobre las moléculas-prototipo. Por lo que, existe la necesidad de disponer de nuevos patrones (estructuras químicas) para emplear en el diseño de nuevos agentes útiles en quimioterapia. Para solventar esta necesidad, los productos naturales de plantas parecen ser la opción apropiada.

3. LAS PLANTAS EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER

Las plantas han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades malignas durante siglos, en la literatura científica antigua y moderna se describen plantas con propiedades anticancerígenas. Los recientes estudios fitoquímicos realizados con más historia por su empleo popular para el tratamiento del cáncer han dado resultado en muchas ocasiones.

En cuanto al aislamiento de principios con actividad antitumoral así como su empleo en la terapia de diferentes enfermedades, son temas sobre los que se han realizado importantes investigaciones, siguiendo esquemas racionales y métodos químicos y farmacológicos que en ocasiones son muy sofisticados **(15)**.

En 1955, el Instituto Nacional de Cancerología de Estados Unidos fundó e impulsó un gran programa de detección selectiva de productos naturales con sensible actividad antitumoral. El programa fue propuesto en Universidades, Institutos de Investigación y en la Industria Farmacéutica, de esta manera la Universidad de Wisconsin en 1959 inició el estudio de extractos crudos de un número limitado de plantas con sensible actividad antitumoral **(16)**.

Solanum dulcamara fue una de las primeras plantas estudiadas, los antecedentes de esta especie describen que fue utilizada para el tratamiento de tumores y verrugas desde el tiempo de Galeno y referencias semejantes aparecen en tratados de fitoterapia **(17)**, Recientemente ha sido identificado el principio activo inhibidor de tumores: la β -solamarina, compuesto heterocíclico de un alcaloide esteroide. Agentes de origen vegetal con estas características también se encontraron en los extractos alcohólicos de *Elephantopus elatus*, al presentar una actividad inhibitoria significativa *in vitro* sobre células derivadas del carcinoma nasofaríngeo humano **(18)**.

En modelos experimentales, los estudios de los efectos de las lactonas sesquiterpénicas en la síntesis de proteínas han sido comparados con los agentes inhibidores de la síntesis

de proteínas ya conocidos, entre ellos la Helenalina, aislada de *Balduina angustifolia*, que ha mostrado ser un potente antineoplásico en el carcinoma intramuscular Walker-256 (WA 16), en el carcinoma de Erlich y moderadamente activo en filtrados de células de leucemia linfocítica p-388 (19).

El mayor éxito de plantas superiores utilizadas en quimioterapia del cáncer lo constituyen los alcaloides de *Catharantus roseaus*. Las investigaciones sobre esta planta fueron estimuladas por sus antecedentes en la Medicina Tradicional, pero no como remedio contra el cáncer sino en el tratamiento de la diabetes. No se detectó actividad hipoglucémica, pero la susceptibilidad para la infección bacteriana en los animales tratados motivó a los investigadores a emprender un extenso trabajo sobre los posibles principios inmunosupresores causantes de estos efectos. Como consecuencia se aislaron diversos alcaloides indólicos diméricos, que mostraron actividad antileucémica. Dos de ellos, vinca-leucoblastina (Vinblastina) y leucocristina (Vincristina), que se emplean tanto solos como en combinación con otras formas terapéuticas para el tratamiento del cáncer (20,7).

Hace más de una década que resurge el interés de la investigación de productos naturales de plantas como fuente potencial de nuevos agentes quimioterapéuticos. Datos obtenidos principalmente en el Annual Reports of Medicinal Chemistry de 1984-1995 indican que más del 60% de los agentes anticancerígenos y antimicrobianos son de origen natural y se encuentran en etapa previa como nueva droga. Así mismo, se ha reportado que por lo menos 119 compuestos obtenidos de 90 especies de plantas

pueden ser considerados como drogas importantes comúnmente usadas en varios países, cabe mencionar que el 77% de ellos fueron obtenidos de plantas usadas en Medicina Tradicional (21).

De la Medicina Tradicional Japonesa surgió la idea de investigar la actividad antitumoral de ciertas fracciones relacionadas a ligninas, obtenidas de los extractos de las “piñas” de los pinos, en ellas se encontró que los extractos acuosos obtenidos de *Pinus parviflora* inhiben el crecimiento de las células de sarcoma 180 en fase ascítica y en fase sólida transplantadas en ratones, así mismo se realizaron estudios que mostraron que esta planta también posee actividad antiviral y de esos hallazgos también se demostró que la planta posee actividad inmunopotenciadora (22).

En la Medicina Tradicional Mexicana se reporta que *Bursera fagaroides* tiene actividad contra el cáncer, en literatura científica se reporta que esta planta pertenece a la familia Burceraceae y los estudios experimentales mostraron que tiene actividad antitumoral. En 1969, se reportaron dos agentes antitumorales obtenidos de extractos clorofórmicos de *Bursera fagaroides* (planta mexicana) y se demostró su actividad biológica en el carcinoma WA 16. (23), Así mismo, *Bursera microphylla* (24-25), *Bursera schlechtendalii* (26), *Bursera klugii* (27) y *Bursera morelensis* (28), de todas estas especies se han aislado compuestos relacionados a lignanos con actividad antitumoral, desconocemos por qué no se continuaron los estudios con estas plantas. Recientemente, se han reportado cuatro constituyentes citotóxicos aislados de *Bursera permollis*, dos

de los cuales fueron potencialmente citotóxicos en un panel de líneas cancerosas de humano (29).

Bursera fagaroides también ha sido estudiada con fines anticonceptivos debido a su potente efecto aglutinante-inmovilizante de los espermatozoides tanto del humano como de diferentes mamíferos (30), lo cual indicaba que sería una planta prometedora como agente inhibidor de la fertilidad en ratas macho. Sin embargo, su alta toxicidad limitó los estudios *in vivo* con propósitos de ser utilizada como agente antifertilizante.

Un gran número de agentes antitumorales obtenidos de las plantas han sido recientemente evaluados en la clínica tales como: el taxol (paclitaxel) (31), la harringtonina (32), la homoharringtonina (33-35) el 10-hidroxy-camptothencina (36), el tenepósido (37) y el indurubin (38) entre otros. Paclitaxel es un producto natural derivado de la corteza de *Taxus brevifolia*, es un compuesto nuevo de gran interés químico, biológico y clínico (39-42).

Los productos naturales anteriormente señalados que han mostrado actividad antitumoral abarcan un amplio campo de tipos estructurales, por lo que todavía no hay una característica común (estructura-función) para explicar su actividad biológica (36-38).

Algunos de los metabolitos secundarios obtenidos de las plantas, tienen efectos terapéuticos los cuales reciben el nombre de constituyentes activos. De esta manera los medicamentos herbolarios modernos o fitofármacos de producción industrializada son productos que contienen un extracto estandarizado de una planta medicinal como ingrediente biológico activo **(43)**.

El mayor éxito de los fármacos anticancerosos se observa en tumores de rápida proliferación, en este sentido los tratamientos eficaces se han observado en leucemias infantiles, tumores testiculares y linfomas no Hodgking, que anteriormente eran fatales. Sin embargo, aún existen tumores como los de pulmón y colon que entre otros éstos responden muy poco a la quimioterapia. Cabe mencionar que hay diversidad entre los tipos de tumores en cuanto a heterogeneidad, accesibilidad, tamaño y aspecto, así como en la velocidad de crecimiento. Todo ello proporciona diferencias significativas en cuanto a sensibilidad a los fármacos (quimiosensibilidad), por lo que se continúa en la búsqueda de nuevos fármacos con sensible actividad antitumoral tratando de encontrar uno de amplio espectro que por lo menos sea útil para más de un tipo de tumor **(38)**.

Por otra parte, la Inmunología es una de las áreas de investigación biomédica de más rápido desarrollo y es a través de esta ciencia que se sabe el sistema inmune está involucrado tanto en la etiología, como en los mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades. Así las alteraciones inmunológicas están involucradas con las enfermedades inflamatorias de la piel, el tracto respiratorio, las articulaciones, el

intestino, así como con las enfermedades infecciosas y las enfermedades neoplásicas asociadas con un estado de inmunosupresión (44).

4. MECANISMOS BÁSICOS DE LA RESPUESTA INMUNE.

El sistema inmune (SI) puede ser considerado como un sensor que forma parte de la red de homeostasis directamente relacionado con otros sistemas. Frente a un agente extraño el SI reacciona inmediatamente de manera no específica, posteriormente desarrolla una acción clonal y específica, la cual con el tiempo le permite tener memoria, por tal razón en presencia de una nueva agresión del mismo agente reacciona de manera inmediata y específica contra el mismo agresor. Para que el sistema realice su función es necesario la fagocitosis, llevada a cabo por células presentadoras del antígeno (CPA), la proliferación celular y la cooperación de los linfocitos T y B. Es a través de esta cooperación que se desarrolla la proliferación celular, la producción de anticuerpos, la diferenciación a células citotóxicas, el incremento en células asesinas naturales (NK) y la activación de las células fagocíticas así como un aumento en la hematopoyesis. Todo finamente orquestado por las citocinas quienes constituyen la inmunorregulación (45).

La respuesta inmune puede ser dividida en innata o natural (inespecífica) y adquirida o específica (46,47).

La inmunidad innata se desarrolla en presencia de microorganismos a través de un proceso inflamatorio localizado, en el cual participan los siguientes elementos celulares: macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células NK. También participan citocinas según se trate si el patógeno es un virus o una bacteria **(48)**.

Frente a los virus la respuesta es regulada por interferon α (IFN- α) e interferón β (IFN- β). La fuente principal del IFN- α son los fagocitos mononucleares, para el IFN- β son los fibroblastos. El efecto antiviral del interferón es parácrino, es decir, las células infectadas secretan la citocina que crea un estado antiviral en las células vecinas, al inducir una maquinaria enzimática que interfiere con la replicación del virus. Por otra parte los IFN α y β intensifican el potencial asesino de las células NK y la eficacia de los linfocitos T citotóxicos (CTL), al aumentar la expresión de las moléculas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) en las superficies celulares **(48-50)**.

Frente a las bacterias, la respuesta inflamatoria es regulada principalmente por el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6). El TNF- α es el principal mediador de la respuesta frente a bacterias gram negativas y su fuente principal son los fagocitos mononucleares activados por productos de la pared bacteriana como el lipopolisacarido (LPS) **(49)**. Localmente el TNF- α desencadena una reacción inflamatoria: induce la expresión de moléculas de adhesión por el endotelio vascular, lo que facilita la adhesión y la migración de neutrófilos al foco de infección desde la circulación, activa neutrófilos, estimulando primero la producción de IL-1 y

después de IL-6. Estas tres citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) pueden ser liberadas coordinadamente por macrófagos activados y se les conoce como citocinas proinflamatorias **(50)**. El proceso inflamatorio debe ser regulado para que no sea permanente, ya que si el proceso continúa este puede establecerse en una respuesta inflamatoria sistémica no controlada que puede afectar a otros órganos provocando en ellos insuficiencia y finalizar en una coagulación intravascular generalizada. Para evitar el establecimiento del proceso inflamatorio, los macrófagos, junto con el sistema neuroendócrino, controlan este proceso a través de la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y los esteroides. La IL-10 producida por los macrófagos activados inhibe la síntesis de las citocinas proinflamatorias **(51,52)**.

En la respuesta inmune específica, los linfocitos B a través de su receptor reconocen conformaciones de determinantes antigénicos ya sea que estos sean proteínas, carbohidratos, lípidos o grupos químicos sencillos. En tanto que los linfocitos T, mediante su receptor (TCR), principalmente reconocen péptidos de proteínas procesadas por medio de las células presentadoras del antígeno, unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Las células que dirigen y controlan la respuesta inmune específica son los linfocitos TCD4⁺ (linfocitos T colaboradores o helper). Inicialmente tras el contacto con el antígeno producen una serie de citocinas que van a determinar que el linfocito TCD4⁺, TH virgen o TH0 pueda diferenciarse en una célula TH1 o bien en una TH2. Ambos procesos son excluyentes. El que se desarrolle una u otra subpoblación tras el contacto con el antígeno va a depender de la naturaleza del estímulo antigénico, la dosis o concentración y el tipo de célula presentadora de

antígeno que lo suministra. El inductor de la diferenciación a TH1 es la IL-12 producida principalmente por los macrófagos y las células dendríticas estimuladas por productos microbianos o víricos. La inducción de TH2 es más complicada y desconocida, ya que requiere de IL-4 y sólo se ha podido demostrar que ésta se produce en forma significativa por las propias células TH2 tras su activación. Las células TH1 son productoras de INF- γ , IL-2 y TNF β . Las células TH2 son productoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Este patrón determina el tipo de respuesta que se pone en marcha. El inicio de la respuesta inmune ya sea natural o específica es similar. La relación entre las dos respuestas es muy importante y se establece a través de la comunicación entre las células inflamatorias (células fagocíticas, células presentadoras de antígeno y células NK) y los linfocitos B y T. La alteración de este complejo equilibrio por diversas causas traería consecuencias patológicas como enfermedades neoplásicas, granulomatosas, alergias, procesos autoinmunes y linfoproliferativos entre otros. **(48-53)**.

5. RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

Una de las funciones del sistema inmune es la inmunovigilancia, la cual controla el desarrollo de las células tumorales. La inmunología antitumoral se fundamenta en el hecho de que las profundas alteraciones genéticas, metabólicas y morfológicas que presenta una célula tumoral induce o se acompaña de la aparición de nuevos antígenos denominados antígenos asociados a tumores (AAT) **(54)**. Es la presencia de estos antígenos lo que permiten al sistema inmune reconocer como extrañas a las células

tumorales y tratar de eliminarlas. Los mecanismos antitumorales son múltiples y complejos, existe todo un sistema celular que interacciona entre sí a través de factores solubles como las citocinas, los anticuerpos, el sistema del complemento, etc. capaz de destruir células tumorales, ya sea mediante una actividad espontánea inespecífica ejercida a través de las células NK o a través de células inflamatorias conocida como citotoxicidad natural, que como se mencionó anteriormente se caracteriza por no generar memoria inmunológica y no estar restringida por proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (48). Por otra parte, el sistema mediado por linfocitos T, donde se requiere la célula presentadora del antígeno, la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) produce células de memoria y dicha actividad es específica inducida y dependiente del CMH-I (54). De esta manera, el sistema inmune reconoce los antígenos tumorales y activa una respuesta para la eliminación de las células que los presentan. Sin embargo, las células tumorales tienen la propiedad de evadir al sistema inmune de varias formas: a) a través de una disminución en la expresión de las moléculas de histocompatibilidad, por lo tanto habrá una menor expresión de los antígenos tumorales y b) la secreción de mediadores inmunosupresores, como es el caso de algunos factores de crecimiento como el TGF- β , una de las principales citocinas inhibitoras de la respuesta inmune (51). El conocimiento de la acción bioquímico-molecular de citocinas estimuladoras de la respuesta inmune, de los linfocitos T y de células NK, indujo la generación de la terapia biológica contra el cáncer, mejor conocida como inmunoterapia del cáncer, estrategia que se basa en la estimulación de los mecanismos de defensa del huésped contra el tumor (55,56). Entre los procedimientos inmunoterapéuticos se

encuentran la utilización de algunas citocinas como: IL-2, IL-7, IL-12, TNF- α , GM-CSF (factor estimulador de colonias granulocito macrófago) y los diferentes tipos de interferón (α, β, γ) ya sea en forma aislada o en mezcla con linfocitos del mismo individuo previamente activados *in vitro* con citocinas. Otro procedimiento lo constituye la utilización de células citotóxicas LAK (células asesinas activadas por citocinas), generadas a partir de linfocitos sanguíneos periféricos tratados con IL-2 (IL-7 o IL-12); células TIL (linfocitos infiltrantes del tumor), separados y tratados *in-vitro* con IL-2 y las células TIL modificadas genéticamente, células derivadas del propio paciente y readministradas. En ambos casos (células LAK y TIL) el propósito es aportar a nivel local la citocina respectiva para reclutar y activar células citotóxicas que actúen específicamente contra el tumor. En tanto que en células modificadas genéticamente el propósito es aumentar su inmunogenicidad. Paralelamente, el creciente conocimiento de los antígenos tumorales está permitiendo por una parte, utilizarlos como vacuna y además poder obtener *in vitro* aquellos clones celulares autólogos, especialmente linfocitos T citotóxicos (LTc), para expandirlos y utilizarlos también como una posibilidad de tratamiento (57). Por todo ello, la inmunoterapia del cáncer aún puede considerarse en etapa experimental, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas estrategias contra este padecimiento.

6. PLANTAS MEDICINALES CON ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA.

La función y la eficacia del sistema inmune pueden ser modificados tanto por factores exógenos como endógenos, (alimentos, fármacos, agentes nocivos, venenos, estrés físico y psicológico, hormonas y citocinas, entre otros) que dan como resultado ya sea inmunosupresión o inmunoestimulación. En este sentido, lo más probable es que un estado saludable esté basado en una sofisticada y fina armonización de mecanismos inmunoreguladores **(58)**.

Se define como inmunomodulador o inmunoregulador a una sustancia capaz de producir un efecto o un cambio en los mecanismos básicos de regulación de la respuesta inmune. Las terapias biológicas pueden ser diseñadas para reparar, estimular o incrementar la función del sistema inmune. El empleo de agentes farmacológicos para modificar la función inmune es una de las áreas más importantes dentro de la terapéutica. Los llamados modificadores de la respuesta biológica son agentes que modifican en forma benéfica la respuesta biológica del huésped frente a una neoplasia o a cualquier agente patógeno. En el caso concreto de una neoplasia, los modificadores biológicos incluyen agentes que producen un efecto antitumoral en forma indirecta (aumentando la respuesta inmune contra las células neoplásicas) o directamente sobre las células tumorales **(58,59)**.

Drews define, que la inmunoestimulación es un recurso profiláctico o terapéutico basado en preparaciones con hierbas, microbios, y productos sintéticos, capaces de activar los mecanismos de defensa corporal específicos y no específicos (60).

Por otra parte, se ha reportado que las drogas oncostáticas o citotóxicas obtenidas de plantas o sintéticas, pueden comprometer de forma secundaria los mecanismos de defensa del huésped, ejemplo de ello lo constituyen los alcaloides vegetales como vincristina y vinblastina que tienen actividad citotóxica, pero también tienen propiedades inmunosupresoras (61).

El científico alemán Heidelberg Wagner, utiliza los términos “inmunoestimulante” y “adaptógeno” para describir drogas o sustancias (obtenidas principalmente de plantas) capaces de aumentar la resistencia de un organismo contra agentes estresores de diferente origen. Según Wagner, los inmunoestimulantes actúan de una manera no antígeno dependiente y pueden influir sobre la respuesta inmune celular y humoral ya que contrarrestan estados de inmunosupresión principalmente de origen microbiano.

En tanto que los adaptógenos aumentan la resistencia del organismo también por mecanismos no específicos, pero en estados de estrés por agentes nocivos de tipo físico, químico o biológico donde participan tanto el sistema inmune como el endócrino. (59,62).

Además de ser estimuladores o supresores, ciertos agentes también tienen actividad para normalizar o modular procesos fisiopatológicos y por ello son llamados agentes inmunomoduladores **(63)**.

En la literatura científica existe un gran número de plantas que pueden ser referidas como fuentes de inmunomoduladores, las más importantes son: *Echinacea purpurea*, *Eleutherococcus senticosus*, *Panax ginseng*, *Thuja occidentalis*, *Baptisia tinctoria* y *Eupatorium cannabinum* **(63,65)**. En la Medicina China, las más importantes son: *Astragalus*, *Codonopsis*, *Hedyotis*, *Ligustrum* y *Rehmannia* **(66)**. Como ejemplo de un inmunomodulador en la terapia del cáncer podemos citar al Mistletoe (*Viscum album*) **(67)**.

En una investigación reciente sobre las actividades inmunomoduladoras de extractos obtenidos de 59 plantas africanas, se demostró que a través del estudio de extractos hidroalcohólicos y de extractos diclorometanólicos de *Zanha africana* (Sapindaceae), fue una de las plantas más efectivas que estimuló la actividad tumoricida de macrófagos y la producción de superóxido por macrófagos y granulocitos **(68)**.

En México, a pesar de su diversidad biológica en plantas medicinales, las investigaciones sobre antitumorales e inmunomoduladores de origen vegetal son escasas. En nuestro laboratorio estamos interesados en la búsqueda de nuevos productos antitumorales obtenidos de plantas medicinales mexicanas, que además del efecto deseado y tomando en cuenta la función intermediaria que tiene el sistema inmune en la interacción de las enfermedades oncológicas y la inmunocompetencia, los

nuevos productos antitumorales también pudieran modular positivamente la respuesta inmune.

Por ello, es que este trabajo está orientado a valorar el efecto antitumoral del extracto hidroalcohólico obtenido de *Bursera fagaroides* y a estudiar de qué forma participa en la respuesta inmune del huésped con tumor. Con ello iniciamos la búsqueda de nuevos antitumorales que además pudieran participar de forma menos nociva en el sistema inmune.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En investigaciones continuas de plantas con actividad antitumoral la familia Burceraceae de diferentes partes del mundo ha sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico y de síntesis. Sin embargo, los estudios respecto a su actividad biológica son escasos. Tomando en cuenta estos antecedentes retomamos los estudios de la actividad biológica de esta planta con fines antitumorales e inmunológicos ya que se desconoce si el extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* tiene efecto citotóxico en células de linfoma murino L5178Y en cultivo y efecto antitumoral en ratones portadores de linfoma. Así mismo se desconoce su efecto en la respuesta inmune de ratones portadores de tumor.

IV. HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* tiene efecto citotóxico en células de linfoma murino L5178Y en cultivo, efecto antitumoral en ratones portadores de tumor y modula la respuesta inmune de ratones con linfoma.

V. OBJETIVO GENERAL

Investigar la actividad citotóxica y antitumoral del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* utilizando como modelo el linfoma murino L5178Y, y estudiar si la dosis terapéutica tiene influencia en la respuesta inmune de ratones BALB/c portadores del tumor.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estudiar mediante análisis cromatográfico (TLC) y análisis fitoquímico (cualitativo) el grado de complejidad y tipo de compuestos del extracto hidroalcohólico.
- 2.- Valorar el efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Bursera fagaroides*, mediante la Dosis Efectiva 50 (DE-50), en cultivo de células tumorales a manera de dosis-respuesta.
- 3.- Establecer la Dosis Letal 50 (DL-50) del extracto hidroalcohólico liofilizado en ratones BALB/c.
- 4.- Evaluar el efecto antitumoral de diferentes concentraciones del extracto administrado por vía orogástrica o intraperitoneal, mediante la inhibición del crecimiento tumoral por sobrevida de ratones portadores de linfoma L5178Y.
- 5.- Estudiar el efecto del extracto en la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares de los ratones inmunosuprimidos por el linfoma y tratados con la dosis terapéutica antitumoral que resulte más prometedora.
- 6.- Estudiar el efecto del extracto de *Bursera fagaroides* en la respuesta inmune celular de ratones inmunosuprimidos por el linfoma y tratados con la dosis terapéutica antitumoral.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

a) TIPO DE ESTUDIO: Experimental, prospectivo y comparativo entre grupos independientes.

b) UNIVERSO DE ESTUDIO: ratones de la cepa BALB/c con y sin linfoma murino L5178Y, tratados y sin tratar con *Bursera fagaroides*

c) TAMAÑO DE LA MUESTRA: Grupos de 10 ratones en cada etapa experimental.

d) VARIABLE INDEPENDIENTE:

Administración de extractos de
Bursera fagaroides por vía
oral o intraperitoneal.

e) VARIABLES DEPENDIENTES:

- 1) Citotoxicidad
- 2) Sobrevida de los animales
- 3) Porcentaje de fagocitosis
- 4) Índice fagocítico
- 5) Índice de digestión
- 6) Hipersensibilidad Retardada al DNFB
- 7) Respuesta proliferativa de linfocitos.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1) PLANTA.- La planta recolectada en Enero de 1995 en el estado de Michoacán, fue identificada taxonómicamente como *Bursera fagaroides* por Abigail Aguilar, en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social en México D.F., y por Jaqueline Reynoso, en el Instituto de Botánica del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

2) PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS DE *Bursera fagaroides*.

PROCEDIMIENTO I. Se utilizaron 500 g de la corteza de la planta, se extrajo una vez con hexano en proporción 1:2.5 (p/v) en Soxhlet durante 5 horas a 60 °C , el solvente hexánico se eliminó totalmente. El residuo de la planta se reextrajo dos veces con etanol al 70% en proporción 1:2.5 (p/v) por reflujo a 60 °C/5 h. Después de eliminar el alcohol se liofilizó y se almacenó como Liofilizado 1 (L1).

PROCEDIMIENTO II. **A.-** Se utilizaron 500 g de la corteza de la planta y se hizo una extracción hexánica al igual que el procedimineto I. **B.-** En la reextracción por duplicado se utilizó acetato de etilo, se mezclaron con un volumen igual de etanol al 70 %, se agitó vigorosamente durante 30 minutos. Se dejó reposar hasta la separación de dos fases transparentes. La fase inferior hidroalcohólica se separó, se eliminó el alcohol y se almacenó como Liofilizado 2 (L2). **C.-** Al residuo de la planta se le reextrajo por tercera ocasión con etanol al 70 %, se eliminó totalmente el alcohol como se describió

en el procedimiento I y se almacenó como Liofilizado 3 (L3). Los tres liofilizados se almacenaron en porciones de 250 mg en ampollas ambar previamente etiquetadas (30).

3) ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO. En virtud de que los extractos fueron hidroalcohólicos, la identificación de las categorías de los compuestos se realizó mediante pruebas cualitativas específicas para saponinas, flavonoides y alcaloides (30,69).

Identificación de Saponinas.

Prueba de Lieberman Buchard: consiste en mezclar 1 ml de anhídrido acético + 1 ml de cloroformo, a 0 °C, se adiciona una gota de ácido sulfúrico concentrado y una porción del extracto problema. La prueba se considera positiva cuando hay formación de colores ya sea azul, verde, rojo o naranja los cuales aparecen en un lapso de 15 a 30 minutos.

Prueba de Salkowski: se mezcla 1 ml de cloroformo + 1 ml de la muestra + 1ml de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva por la presencia de colores amarillo o rojo.

Prueba de Molish: Se hizo una reacción con dos gotas de solución al 5 % de alfa naftol en etanol con una parte de la muestra y por la pared del tubo se adicionaron una parte igual de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva si se forma un anillo de color violeta.

Identificación de Flavonoides.

Los extractos (L1, L2 y L3) en solución acuosa, fueron tratados con un álcali, la presencia de flavonoides hace variar la muestra de color café a color amarillo.

Otra prueba para identificar flavonoides consistió en adicionar ácido sulfúrico concentrado, el cambio a color amarillo confirmó la presencia de flavonoides.

Identificación de Alcaloides

Reactivo de Mayer.

Se preparó una solución de cloruro de mercurio (HgCl_2 1.36 g en 60 ml de agua), y una solución de yoduro de potasio (KI 5g en 10 ml de agua). Se mezclaron las dos soluciones y se aforó a 100 ml. Las muestras (1 mg) se prepararon en agua acidulada con HCl o con H_2SO_4 en proporción de ácido y agua 1:1 (v/v). La solución de Mayer se agregó a las muestras gota a gota (no más de cinco) la formación de un precipitado manifiesta la presencia de alcaloides.

Reactivo Ácido Silicotúngstico.

Se prepararon 5 g de ácido silicotúngstico en 100 ml de ácido sulfúrico 6 N

Reactivo Dragendorff.

Consistió en disolver 8 g de nitrato de bismuto en 20 ml de ácido nítrico al 30 % y 27.2 g KI en 50 ml de agua. Se mezclaron las dos soluciones (v/v) y después de 24 h de reposo, se aforó con agua a 100 ml.

Los extractos que contienen alcaloides forman precipitados con las soluciones antes mencionadas. Los resultados se registraron como abundantes (+++) moderado (++) escaso (+) dudoso (\pm) y negativo (-) (70).

4) ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO. Se realizó un análisis cromatográfico en capa fina de sílica-gel (Merck 5548) con el propósito de distinguir los compuestos que conformaron los liofilizados. El sistema de elución para desarrollar el cromatograma consistió de: Butanol: Ácido Acético: Agua (4:1:1: v/v) (69,70).

5) MATERIAL BIOLÓGICO.

ANIMALES. Se utilizaron ratones singénicos BALB/c (haplotipo H-2 d) machos de 6 a 8 semanas de edad, formados por grupos de 5 animales, alojados en jaulas de policarbonato. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio de CIBO-IMSS y se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada de 22 °C y ciclos alternos de iluminación-oscuridad de 12 h, alimentados con una dieta balanceada especial para roedores (PURINA-MÉXICO) y agua purificada para consumo voluntario.

CELULAS TUMORALES. Se utilizó como modelo el linfoma murino L5178Y, el cual es un tumor tímico (haplotipo H-2d) de origen espontáneo que en 1958 se obtuvo en el laboratorio del Dr. Fisher en un ratón DBA/2. Fue donado al laboratorio del Dr. Héctor Gómez Estrada por el Dr. Stevens de la Universidad de Utah y lo hemos conservado por más de 20 años por trasplante intraperitoneal (i.p.) semanal en ratones BALB/c

que son compatibles con el locus H-2d con los ratones DBA/2. El tumor es de alta malignidad ya que 20×10^6 células L5178Y por vía i.p. mata a los ratones en 15 ± 2 días (71,72). Recientemente de esta línea tumoral se han reportado factores inmunosupresores (73).

6) ENSAYOS *IN VITRO*

ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD DE LOS LIOFILIZADOS.

Un modelo útil en la detección selectiva (screening) de extractos de plantas como probables inhibidores de tumores es mediante ensayos *in vitro* en células tumorales.

Para evaluar la citotoxicidad de *Bursera fagaroides* se hicieron cultivos celulares en ausencia (controles) y presencia de diferentes concentraciones del liofilizado (10,20,40 y 80 $\mu\text{g/ml}$) a manera de una curva de dosis-respuesta sobre las células del linfoma L5178Y (2×10^6) resuspendidas en 2 ml de medio RPMI pH 7.4 adicionado de 10% de suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% en aire (95 % humedad) por 24 horas. Al final del período de incubación, se tomaron alícuotas de cada cultivo y por microscopía de luz, se determinaron las concentraciones celulares por cuenta en hemocitómetro, así como el porcentaje de viabilidad celular utilizando el método de exclusión con colorante de azul tripano (74, 75).

7) ENSAYOS *IN VIVO* .

a) DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 100 Y 50 (DL-100 Y 50)

Se formaron grupos de 5 ratones BALB/c sanos de 20 a 22 g de peso a los que se les administró por vía oral o i.p. dosis únicas del liofilizado (50, 100, 200, 300 y 400 mg/kg de peso corporal en 0.1 ml. de agua inyectable) se registró el tiempo de sobrevida de los animales y no se aumentó la dosis, solamente se reportó el estado general de los animales mediante signos clínicos como son el espasmo abdominal, inactividad, pelo erizado y tendencia a formación grupal. De ésta manera, se determinó la dosis letal 50 y 100 con el propósito de utilizar por lo menos dos dosis subletales con fines de investigación terapéutica.

b) ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL. Se utilizaron 100 ratones machos BALB/c sanos de 20 a 22 g de peso a los que se les implantó por vía i.p.. 2×10^4 células de linfoma murino L5178Y. Después de 24 h se inició el tratamiento en grupos independientes de 10 ratones cada uno, utilizando por lo menos dos dosis subletales a unos por vía oral y a otros por vía intraperitoneal durante 15 días. Se usaron como controles un grupo de ratones portadores de tumor sin tratamiento y dos grupos tratados con placebo a base de solución salina fisiológica administrada por vía oral o i.p. Se cuantificó para cada grupo el crecimiento tumoral por peso en gramos, comparado entre sí y entre grupos, así mismo se determinó la sobrevida de los animales, la concentración del extracto y la vía de administración que nos proporcionó el mejor resultado terapéutico.

c) PRUEBAS DE ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA. Con la dosis terapéutica antitumoral de *Bursera fagaroides* previamente establecida en los ensayos *in vivo*, se estudió la respuesta inmune a través de pruebas inmunológicas tales como: fagocitosis, hipersensibilidad retardada (HSR) al dinitrofluorobenceno (DNFB) y proliferación de linfocitos de bazo en respuesta a fitohemaglutinina (PHA). La prueba de fagocitosis y la de proliferación celular, se realizaron un día después de la última dosis del tratamiento en grupos de animales con tumor y se compararon con el grupo control (sin tumor y sin tratamiento). Esto se debe a que los productos obtenidos de las plantas que tienen actividad antitumoral o antimicrobiana influyen de manera importante en el sistema inmune (58).

Fagocitosis.

Se utilizó el método de Stossel (75). Consistió en adherir a un cubreobjetos de 22 X 22 mm cortado en cuatro partes, 2×10^6 macrófagos alveolares (MA), se agregaron 10^6 levaduras de *Candida albicans* previamente incubadas 15 minutos en suero autólogo. Las levaduras y los macrófagos fueron incubados 30 min (tiempo de ingestión) a 37 ° C en cámara húmeda y posteriormente lavados con SSBH a 37 °C y nuevamente se incubaron 30 min con suero (tiempo de digestión). En seguida se lavaron y después de secar, se tiñeron con colorante de Wrigth. Se contaron 300 células y los resultados se reportaron como: a) porcentaje de MA que fagocitaron: b) índice de fagocitosis (promedio de levaduras de *Candida albicans* ingeridas por cada MA) y c) actividad digestiva (promedio de levaduras digeridas) (76).

Hipersensibilidad Retardada (HSR) al Dinitrofluorobenceno (DNFB)

La reacción de HSR valora la inmunidad específica a través de un proceso secuencial:

1.- Fase cognitiva, en la cual los linfocitos CD4⁺ y algunos CD8⁺ reconocen proteínas de antígenos extraños presentados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA).

2.- Fase de activación, en la cual las células T secretan citocinas y proliferan.

3.- Fase efectora, la cual se realiza en dos eventos: a) inflamación, en la cual las células del endotelio-vascular, activadas por citocinas reclutan leucocitos circulantes hacia el tejido local del reto antigénico, y b) resolución, en la cual los macrófagos activados por citocinas actúan para eliminar el antígeno extraño. Este proceso puede ser acompañado de daño al tejido. En este trabajo utilizamos la prueba al DNFB, en donde los animales sanos y portadores de linfoma con y sin tratamiento fueron sensibilizados con 20 µl de DNFB al 0.5 % en una mezcla de acetona y aceite de oliva en proporción 4:1 (v/v) en el abdomen de los ratones previamente rasurados, la sensibilización se realizó el 9^o y 10^o días del tratamiento y se retaron el día 13^o a través de la aplicación de 10 µl del DNFB al 0.2% en el pabellón auricular derecho. La inflamación se midió a las 48 h posteriores a la administración reveladora utilizando un micrómetro de precisión y se calculó como el incremento en el grosor del pabellón auricular en micrómetros (µm) con respecto a su lectura basal. (77-79).

Proliferación de linfocitos de bazo en respuesta a fitohemaglutinina.

Esta prueba valora la respuesta inmune celular *in vitro*. Se realizó de la siguiente manera: al décimo sexto día del tratamiento se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, y se les realizó esplenectomía. El bazo se colocó en una caja de Petri que contenía 7 ml de solución salina balanceada de Hank (SSBH) a 4 °C, se disgregó el bazo a travez de una bolsa nytex (Malla de microfilamentos de nylon con poros de diámetro de 210 μ , Teteco. Inc., Elmsford, N.Y.) en campana de flujo laminar (ALDER). La suspensión celular se colocó en un tubo cónico de polipropileno que contenía 4 ml de Histopaque-1077 (Sigma Chem. Co. H-8889). Los tubos se centrifugaron por 20 min a 2500 rpm. Se obtuvo la interfase de linfocitos y se lavó dos veces con SSBH. Las células se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (SFT). Se determinó la viabilidad con azul tripano al 0.1 %. Los linfocitos se contaron en cámara Neubauer. La concentración final para la suspensión celular se ajustó a 2×10^5 células/0.1 ml. Se hicieron cultivos de linfocitos en cajas de 96 pozos de la siguiente manera:

0.1 ml de linfocitos + 0.1 ml de RPMI-1640 (para células no estimuladas)

0.1 ml de linfocitos + 0.1 de fitohemaglutinina (PHA) 10 μ g / ml. Esta dosis óptima fue determinada mediante una curva de dosis respuesta utilizando 50, 25 y 10 μ g / ml de PHA (Sigma Chem. Co. L-9132). Los cultivos se hicieron por triplicado y se incubaron por 48 h en una incubadora (NAPCO Modelo 302) en atmósfera de humedad y 5 % de CO₂ a temperatura de 37 °C. Al terminar esta incubación se pulsó el cultivo con 1 μ Ci

de timidina tritiada [³H-timidina] (Methyl H3) (Amersham, 37 Mbq/ml) a cada pozo, el cultivo se incubó nuevamente por 24 h.

Después de las 72 h de incubación se cosecharon los cultivos con pipeta Pasteur, colocando las muestras en trozos de papel filtro del No.2 de 2 X 3 cm. Se lavaron dos veces por inmersión en ácido tricloroacético (Analytika A 3300) al 7 % y dos veces en alcohol (etanol) al 70 % en agitación constante por 5 min. Después de secar a temperatura ambiente, se recortaron en pequeños trozos y se colocaron en viales. A cada vial se le adicionaron 3 ml de líquido de centelleo [PPO2-5difeniloxozol (Sigma Chem, Co. D-4630), triton X100 (Sigma Chem. Co.6517), etilenglicol (J.T. Baker Analyzed 21766), etanol absoluto (Merck UN 1177WGKO) y Xilol (Sigma Chem. Co. 917)]. La proliferación de linfocitos en respuesta al mitógeno PHA se realizó mediante la síntesis de DNA marcado con timidina tritiada utilizando un contador de centelleo (Beckman, USA, LS6000 SE). Los resultados de las lecturas se expresan en cuentas por minuto (cpm). Se determinó el índice de estimulación (IE) por la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{\text{cpm de los linfocitos estimulados con el mitógeno}}{\text{cpm de los linfocitos no estimulados}}$$

Se hicieron cultivos de linfocitos de ratones sanos (Grupo control); portadores de linfoma (Grupo 2); portadores de linfoma tratados con el extracto por vía i.p. (Grupo3); portadores de linfoma tratados con el extracto por vía oral (Grupo 4). De cada ratón se hicieron cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), así como cultivos de linfocitos no estimulados en un período de 72 h a 37°C **(80,81)**.

Análisis Estadístico.

Los ensayos de citotoxicidad se expresaron como la concentración del liofilizado que mató el 50% de las células de linfoma murino L5178Y respecto al control en 24 h de cultivo (DE-50) por el procedimiento de Miller y Tainter. La actividad antitumoral de los liofilizados se expresaron en sobrevida de los ratones mediante pruebas estimadas de Kaplan Meier y la comparación estadística de los grupos por la prueba de Log-Rank. Los resultados de las pruebas inmunológicas -fagocitosis, hipersensibilidad al DFB y proliferación de linfocitos esplénicos- se expresaron como promedio y desviación estándar; la comparación se realizó por ANOVA y la prueba “t” de Student. Los valores obtenidos se consideraron significativamente diferentes cuando $p \leq 0.05$.

VIII. RESULTADOS

PLANTA. *Bursera fagaroides* (Figura 1), fue colectada en el estado de Michoacán y su identificación se realizó en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, por Abigail Aguilar (Registro No. IMSSM-12051) y en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara por Jaqueline Reynoso (IBUG-140748).

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS. Los resultados del análisis cromatográfico en capa fina de gel de sílice de los liofilizados 1, 2, 3, (L1, L2, L3) se muestran en la Figura 2. En la cromatoplaqueta se muestra una separación de ocho bandas en L1 y por lo menos tres bandas en L2 y L3, con velocidades relativas de desplazamiento (R_f) de 0.0 a 0.276. Las bandas con mayor concentración en los tres liofilizados fueron la 1 con $R_f = 0.0$; la 5 con $R_f = 0.217$ y la 8 con $R_f = 0.276$. Por el comportamiento de desplazamiento que presentaron estos extractos, se infiere la presencia de compuestos polares (localizados en el punto de origen) y de mediana polaridad.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS. El análisis fitoquímico realizado a los liofilizados (L1, L2, L3) mediante técnicas cualitativas específicas fue positivo a saponinas (+++) y flavonoides (+++) y negativo a alcaloides.

ENSAYOS *IN VITRO*

ESTUDIO CITOTÓXICO DE LOS LIOFILIZADOS.

Los resultados de la actividad citotóxica de los liofilizados se resumen en la Tabla 1 y Figuras 3 y 4. En la Figura 3, se observa el efecto citotóxico de los liofilizados de *Bursera fagaroides* valorado por la técnica de exclusión con azul tripano, la evaluación de la viabilidad en porcentaje se hizo en hematímetro utilizando un microscopio fotónico de contraste de fases 40X. **A** Control (93%) **B** 10 µg/ml (70%) **C** 20 µg/ml (50%) **D** 40 µg/ml (0%) **E** 80 µg/ml (0%). La viabilidad varió de manera proporcional a la concentración del extracto y se analizó estadísticamente por el procedimiento de Miller y Tainter con intervalo de confianza de 95 %. En la Figura 4 la curva de dosis-respuesta muestra la dosis que mató al 50 % de las células en cultivo (DE-50), en los tres liofilizados correspondió a 20 µg/ml, en tanto que las dosis de 40 y 80 µg/ml fueron 100 % citotóxicas. Estos resultados fueron corroborados por reinoculación en ratones sanos (n=3 para cada dosis) después del tratamiento *in vitro* por incremento en sobrevivencia (Tabla 1), los animales que recibieron las células en donde se observó la DE-50 desarrollaron tumor y mostraron sobrevivencia de 50-60 días, en tanto que con las dosis 100 % citotóxicas no se observó desarrollo tumoral en por lo menos tres meses de observación.

Debido a que los tres liofilizados produjeron resultados similares en la primera fase del proyecto (ensayos fitoquímico, cromatográfico y citototóxico), en los ensayos *in vivo* solo se trabajó con el extracto hidroalcohólico al 70% correspondiente al Liofilizado 1, ya que el rendimiento fue mayor y en menor tiempo.

ENSAYOS *IN-VIVO*

DOSIS LETAL 100 Y 50 (DL-100 Y 50).

Para determinar la DL-100 y DL-50 se administraron dosis únicas crecientes del extracto L1 de 50, 100, 200, 300 y 400 mg/kg por vía oral ó por vía intraperitoneal. Los ratones sanos que recibieron la dosis más alta (400 mg/kg) fallecieron en un lapso de 24 h, los que recibieron 300 mg/kg fallecieron 3 de 5 en 72 h. Los tratados con 200 mg/kg fallecieron 4 de 10 en 72 h. en tanto que los animales tratados con 100 o 50 mg/kg no se registró ninguna muerte. Todos los animales que fallecieron en un lapso de 72 h presentaron mal estado general como espasmo abdominal, inactividad, pelo erizado y tendencia grupal. En cambio los que sobrevivieron a la dosis tóxica así como los ratones tratados con 100 mg/kg manifestaron pelo erizado y mal estado general en las primeras 72 h, recuperándose en un lapso de 96 a 120 h. Cabe mencionar que los grupos de ratones tratados con 50 mg/kg manifestaron un estado clínico general saludable parecido a los ratones sanos sin ningún tratamiento. Con estos datos se estableció la DL-100 la cual fue de 400 mg/kg y la DL-50 correspondió a 250 mg/kg (Figura 5). El potencial antitumoral del extracto se estudió con dosis subletales.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL.

En la figura 6, se observa la sobrevida de ratones portadores del tumor (2×10^4 células) sin tratamiento o tratados con placebo (controles) y los grupos experimentales tratados con el extracto de *Bursera fagaroides* a razón de 50 y 100 mg/kg/día durante 15 días,

utilizando en grupos independientes dos vías de administración: la vía oral o la intraperitoneal.

La sobrevida promedio de los grupos no tratados o tratados con placebo fue de por lo menos 30 días, en tanto que los que recibieron *B. fagaroides* se incrementó en más de 33 días. Sin embargo, el mejor resultado terapéutico se observó con 100 mg/kg/día durante 15 días y por la vía de administración i.p., seguido de la administración oral. La sobrevida de los grupos tratados con 100 mg/kg fue mayor ($p < 0.001$) con respecto a los grupos control o placebo y con respecto a los grupos tratados con 50 mg/kg ($p < 0.05$).

La vía de administración intraperitoneal fue mejor ($p < 0.05$) que la oral, ya que en tres meses de observación después del tratamiento no hubo desarrollo tumoral en el 26 % y el 8 % de los animales respectivamente (Figuras 6, 7 y 8).

Una observación importante en relación a la toxicidad del tratamiento fue que no hubo cambios significativos por lo menos en biometrías hemáticas realizadas en los grupos estudiados.

ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA

Debido a que los extractos de una planta son siempre una mezcla compleja de diferentes sustancias químicas que reaccionan con estructuras celulares o tisulares, además de mostrar actividad antitumoral pueden también participar de manera importante en el

sistema inmune. Una vez establecida la actividad antitumoral del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides*, se estudió el efecto de la dosis terapéutica en la respuesta inmune de ratones con linfoma L5178Y.

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* en la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares de ratones BALB/c portadores o no de linfoma.

La respuesta inmune inespecífica está respresentada principalmente por células fagocíticas (granulocitos, macrófagos/monocitos) y diferentes factores solubles como el sistema del complemento y citocinas. En este trabajo investigamos la actividad fagocítica de macrófagos alveolares de ratones portadores de linfoma tratados con la dosis terapéutica antitumoral (100 mg/kg/día/15días) del extracto de *Bursera fagaroides*. En la Tabla 2, puede observarse que en el grupo de ratones sanos (Grupo 1) el 43.57 ± 15.01 % de los macrófagos fagocitaron por lo menos una levadura de *Cándida álbicans*, cada macrófago ingirió en promedio 1.23 ± 0.77 y digirió tan solo 0.69 ± 0.47 de la levadura. En el grupo de ratones con evolución tumoral de 16 días (Grupo 2), el 29.8 ± 7.05 % de los macrófagos fagocitaron y cada macrófago fagocitó en promedio 0.59 ± 0.12 y digirió 0.40 ± 0.07 levaduras. En los animales portadores de linfoma tratados con el extracto por vía i.p. (Grupo 3) el 28.2 ± 7.04 % de las células fagocitaron, el índice fagocítico fue de 0.57 ± 0.19 y el índice de digestión de 0.32 ± 0.31 , estos valores fueron muy parecidos a los encontrados en el Grupo 2. Al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas. En cambio cuando los animales

portadores de linfoma fueron tratados con *Bursera fagaroides* por vía oral (Grupo 4), aumentó el porcentaje de células que fagocitaron a $79.8 \pm 3.11 \%$; el índice fagocítico fue de 1.96 ± 0.33 y el índice de digestión de 0.53 ± 0.31 . Al comparar el porcentaje de células que fagocitaron en los Grupos 1, 2 y 3 contra el grupo 4 las diferencias fueron altamente significativas $p < 0.001$ (Figura 9). Con respecto a los índices fagocíticos de los Grupos 2 y 3 contra el Grupo 4 las diferencias fueron significativas $p < 0.001$ (Figura 10). En relación al índice de digestión (Figura 11) no hubo diferencias significativas en ninguno de estos grupos. Con el propósito de estudiar si la actividad fagocítica se modificaba en ratones sanos, valoramos la dosis terapéutica del extracto por ambas vías. El Grupo 5 fue tratado por vía i.p., los resultados fueron que el $87.8 \pm 1.48 \%$ de los macrófagos alveolares fagocitaron. El índice de fagocitosis fue de 3.29 ± 0.38 y el índice digestivo fue de 0.76 ± 0.19 . El Grupo 3 fue tratado por vía oral y la actividad fagocítica de los macrófagos se incrementó a $94.6 \pm 1.14 \%$; el índice fagocítico fue de 4.88 ± 1.29 y el índice digestivo fue de 1.73 ± 0.57 . En ambos grupos puede observarse que la actividad fagocítica se incrementó por lo menos $p < 0.01$, al compararla con cualquiera de los grupos con tumor ya sea que hubiesen recibido tratamiento o no, inclusive con respecto al Grupo control (Tabla 2 y Figuras 9, 10 y 11).

La Figura 12 muestra una microfotografía de la fagocitosis por macrófagos alveolares obtenidos de ratón con linfoma y tratado por vía oral con *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día durante 15 días).

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* en la respuesta inmune celular valorada por hipersensibilidad retardada al DNFB en ratones BALB/c portadores de linfoma.

La respuesta inmune celular está representada principalmente por linfocitos T, y células presentadoras de antígeno así como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad-II en donde también intervienen citocinas que regulan esta respuesta. Una de las pruebas que se utilizan para valorar esta respuesta es hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno (DNFB). En la Tabla 3 y Figura 13 se resumen los resultados en los seis grupos estudiados. Puede observarse que el grupo control presentó un incremento ($160.9 \pm 37.11 \mu\text{m}$) en el grosor del pabellón auricular con infiltrado celular de (+++). En los ratones portadores de linfoma (2×10^4 células L5178Y), el incremento en el grosor del pabellón auricular tan sólo fue de $61.2 \pm 22.8 \mu\text{m}$, estos valores comparados con los encontrados en el grupo control fueron significativos ($p < 0.001$). Puede verse claramente que el linfoma suprimió la respuesta inmune celular de los animales.

El tratamiento con el extracto administrado por vía intraperitoneal (Grupo 3), incrementó la respuesta inmune celular de los animales con tumor ($141.6 \pm 38.35 \mu\text{m}$) este incremento fue significativo ($p < 0.01$) al compararlo con el grupo portador de tumor sin tratamiento (Grupo 2) y no mostró diferencias con el Grupo 1. Por otra parte, el tratamiento administrado por vía oral en ratones con tumor (Grupo 4) también incrementó la respuesta inmune celular ($96.6 \pm 33.09 \mu\text{m}$), sin embargo estos valores no mostraron diferencias al compararlos con el Grupo 2. Aunque no alcanzó valores

cercanos al grupo control, ya que hubo diferencias entre ellos ($p < 0.01$), los resultados del Grupo 4 contra el Grupo 3 no mostraron diferencias significativas. Lo cual indicó que el tratamiento oral mejoró la respuesta inmune de los ratones, pero el tratamiento i.p. fue mucho mejor (Figura 13 y Tabla 3). La dosis terapéutica en ratones sanos tanto por vía i.p. como oral, no modificó significativamente la respuesta inmune celular valorada por la prueba del DNFB.

La figura 14A muestra una microfotografía de uno de los cortes histológicos del grupo de ratones portador del linfoma y tratado con el extracto por vía oral que en promedio el valor en micrómetros fue de 96.6 ± 33.09 . Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina fueron observados por microscopía de luz, con objetivo 10X puede observarse el infiltrado celular correspondiente a (+++). En tanto que la Figura 14B corresponde a uno de los ratones portadores de linfoma sin tratamiento donde se observó escaso infiltrado celular (+), razón por la que el valor del incremento en el grosor del pabellón auricular en este grupo inmunosuprimido fue de $61.2 \pm 22.8 \mu\text{m}$. Mediante el estudio histológico se confirmó el valor de las pruebas de hipersensibilidad retardada al DNFB. Con estos resultados se demuestra que los ratones portadores de linfoma se encontraron inmunosuprimidos y que el tratamiento terapéutico con el extracto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día durante 15 días) estimuló la respuesta inmune celular *in vivo*. Estos resultados fueron más evidentes en los ratones con linfoma y tratados por vía intraperitoneal. Por otra parte, el tratamiento no modificó la respuesta inmune celular de ratones sanos.

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* en la respuesta inmune celular valorada por proliferación de linfocitos de bazo de ratones BALB/c portadores de linfoma.

La proliferación de linfocitos esplénicos bajo el estímulo mitogénico de PHA y valorado por incorporación de ^3H - timidina se resumen en la Tabla 3 y Figura 15. El grupo de ratones con linfoma mostró un índice de estimulación ($\text{IE}=1.53\pm 0.53$) significativamente reducido ($p < 0.007$), con respecto al grupo de ratones control ($\text{IE}=4.48\pm 1.74$). En tanto que los ratones con linfoma y tratados con el extracto por vía oral ($\text{IE}=2.96\pm 0.76$) ó por vía intraperitoneal ($\text{IE}=2.56\pm 1.25$) mostraron un aumento en la respuesta inmune celular el cual no fué significativo al compararlos con el grupo de ratones inmunosuprimidos por el tumor. Sin embargo la respuesta inmune celular valorada por esta prueba fue muy parecida a la encontrada en el grupo control, ya que el análisis estadístico tampoco mostró diferencias significativas lo que indica que la dosis terapéutica antitumoral de *Bursera fagaroides* potencializa la respuesta inmune de ratones inmunosuprimidos por el linfoma.

En la Figura 16 se muestran los resultados de la respuesta inmune celular valorada por hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno y por proliferación de esplénocitos en respuesta a PHA. Puede observarse el mismo comportamiento de inmunoestimulación valorado por dos pruebas una *in vivo* y otra *in vitro*. Con lo que se confirma que el extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* potencializa la respuesta inmune celular de los ratones inmunosuprimidos por el linfoma.



Figura 1

Bursera fagaroides

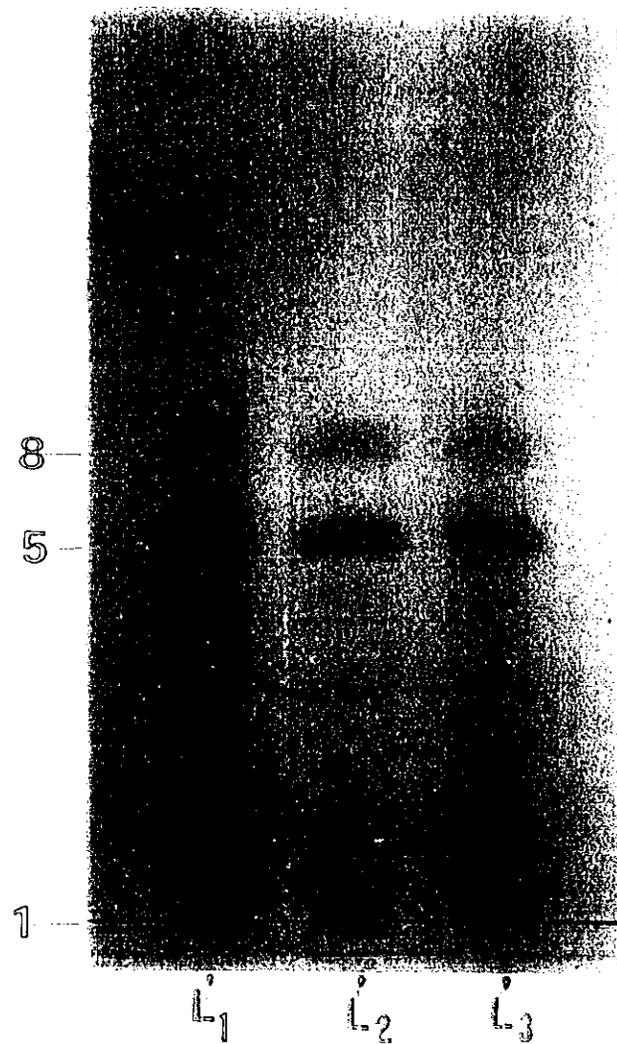


Figura 2

TLC de los liofilizados (L1, L2, L3). Se distinguen ocho compuestos con R_f de 0.0 a 0.276 (L1), las bandas con mayor concentración en los tres liofilizados fueron la 1 con $R_f = 0.0$, la 5 con $R_f = 0.217$ y la 8 con $R_f = 0.276$.

Tabla 1. Efecto citotóxico de *Bursera fagaroides* sobre las células del linfoma murino L5178Y y su corroboración en ratones BALB/c.

| Liofilizado | Efecto | Citotóxico | Corroboración |
|---|--|----------------------------|---|
| L1, L2, L3^a ($\mu\text{g/ml}$) | Celularidad* ($\times 10^6$) | Viabilidad* (%) | Desarrollo tumoral** Sobrevida en días |
| 0 | 1.9 ± 0.4 | 93.3 ± 2 | 30 ± 3 |
| 10 | 1.84 ± 0.56 | 70.4 ± 7 | 40 ± 6 |
| 20 | 1.37 ± 0.35 | 48.0 ± 14 | 56 ± 7 |
| 40 | 1.37 ± 0.30 | 0.77 ± 0.81 | --- ^b |
| 80 | 0.87 ± 0.35 | 0 | --- ^b |

* Los resultados representan el promedio \pm DS de nueve cultivos celulares tres para cada liofilizado.

** La corroboración citotóxica por desarrollo tumoral representa el promedio \pm DS en días de seis ratones para cada liofilizado.

^a Los experimentos por triplicado fueron similares con los tres liofilizados estudiados.

^b Los animales se observaron por un período de tres meses sin desarrollo tumoral.

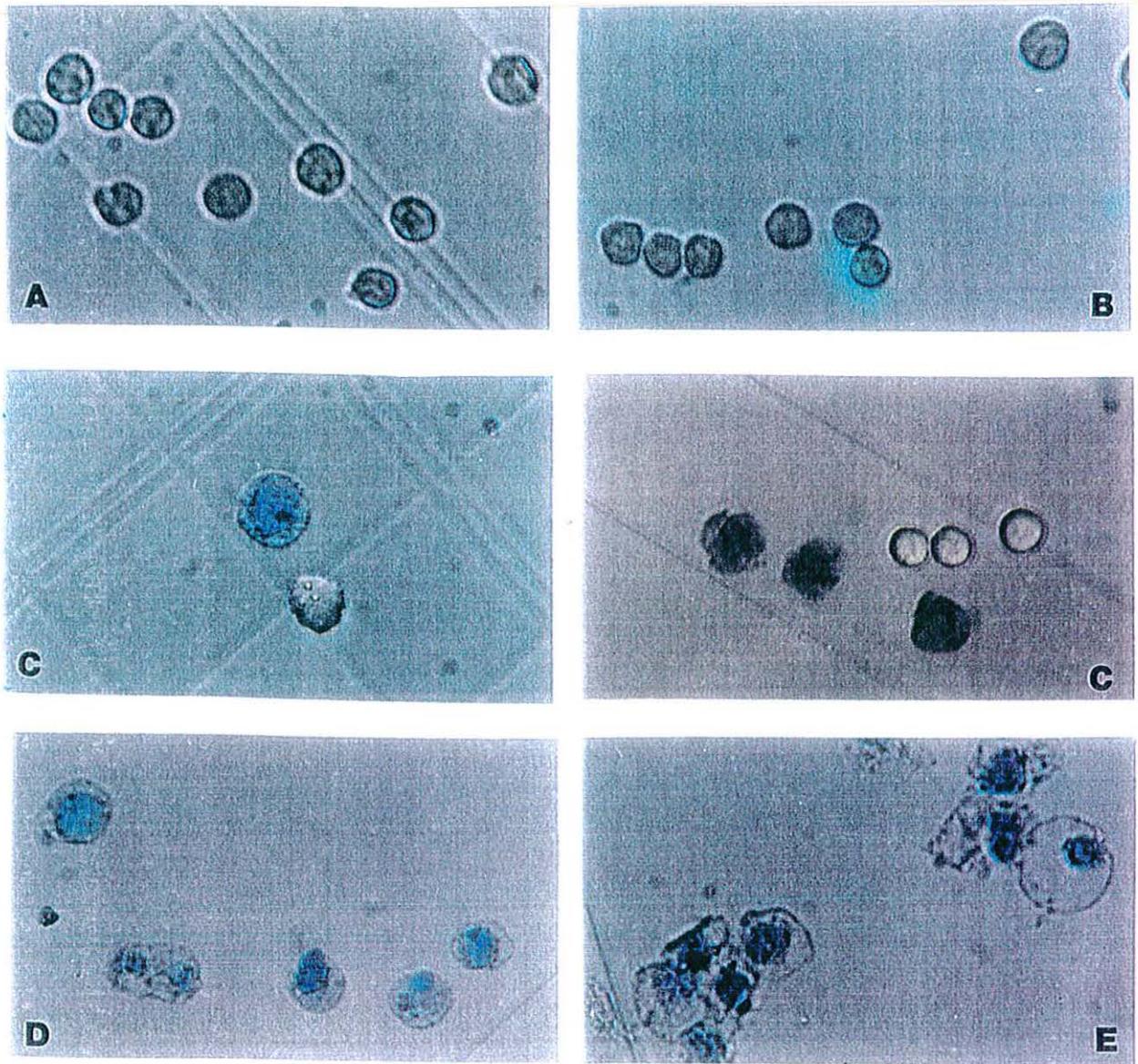


Figura 3

Efecto citotóxico de los liofilizados de *Bursaria fagaroides* valorado por la técnica de exclusión con azul tripano, la evaluación de la viabilidad (%) se hizo en hematímetro utilizando microscopio fotónico de contraste de fases 40X. A. Control (93%) B. 10µg/ml (70%) C. 20µg/ml (56%) D. 40µg/ml (0%) E. 80µg/ml (0%).

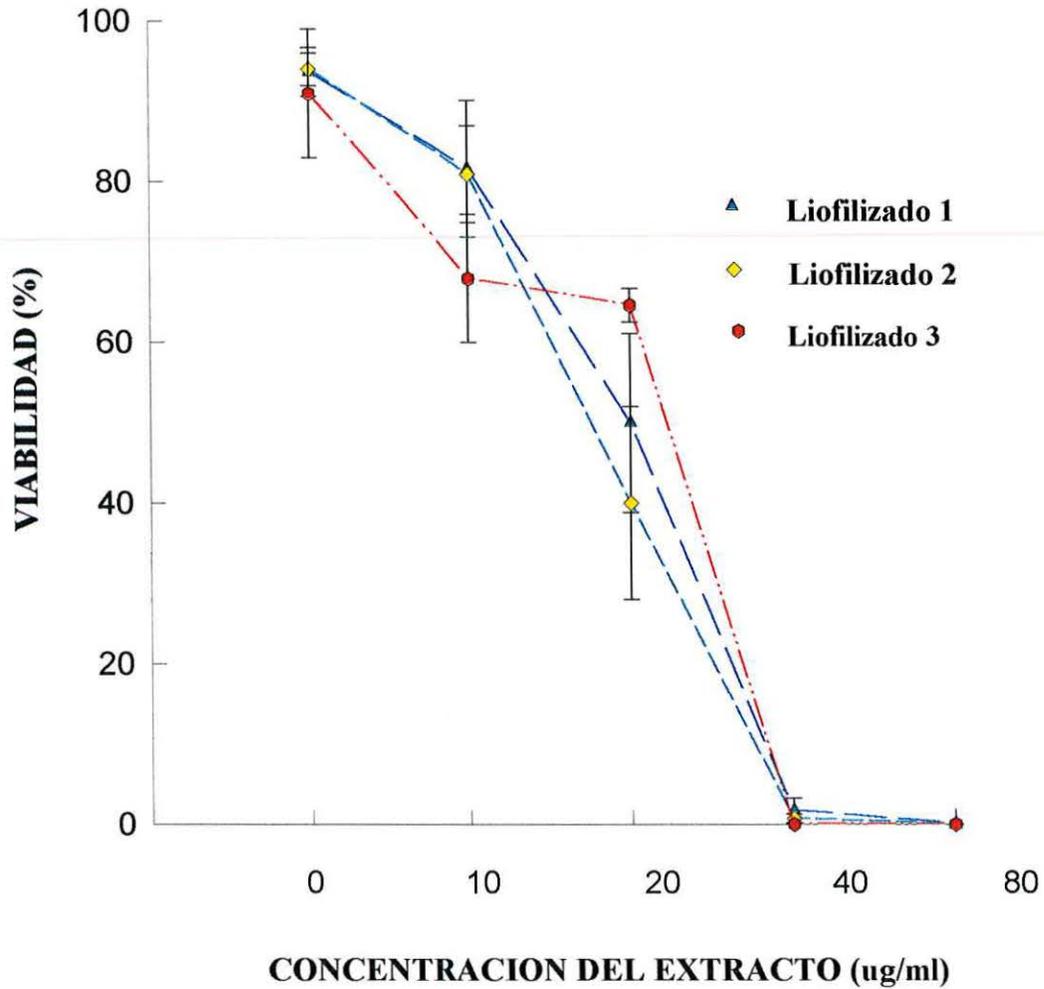


Figura 4. Citotoxicidad evaluada por viabilidad celular (%) de células L5178Y en presencia de diferentes concentraciones de los 3 liofilizados obtenidos de *Bursera fagaroides*.

Los datos representan el promedio +/- DS de 3 experimentos por dosis de cada liofilizado, comparados con los controles (sin tratamiento).

$ED_{50} = 20 \text{ ug/ml}$.

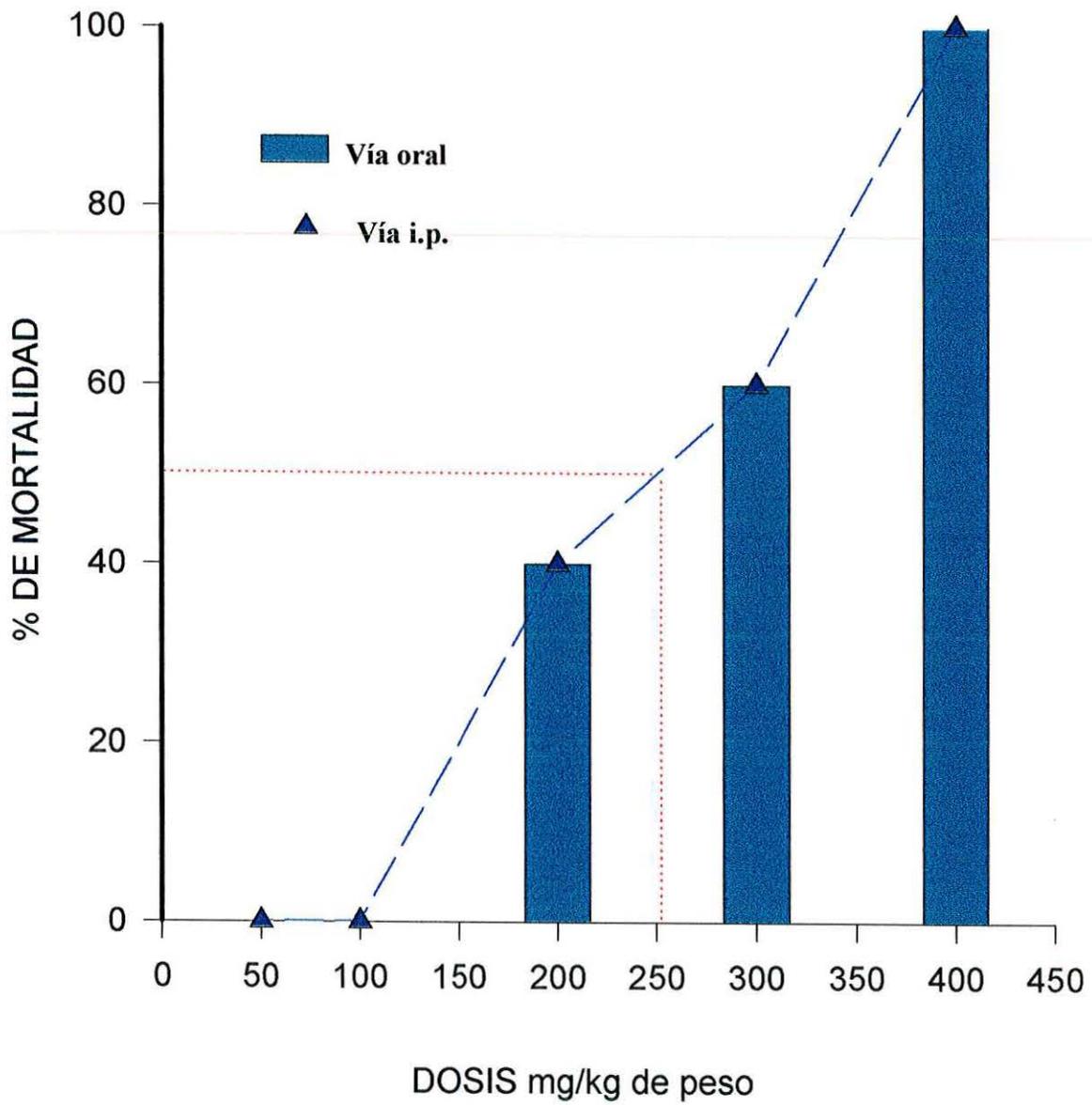


Figura 5. Determinación de la Dosis Letal 100 y DL 50 del extracto de *Bursera fagaroides* en ratones BALB/c utilizando dos vías de administración (ip y oral) en dosis única DL 100 = 400 mg/kg de peso. DL 50 = 250 mg/kg de peso

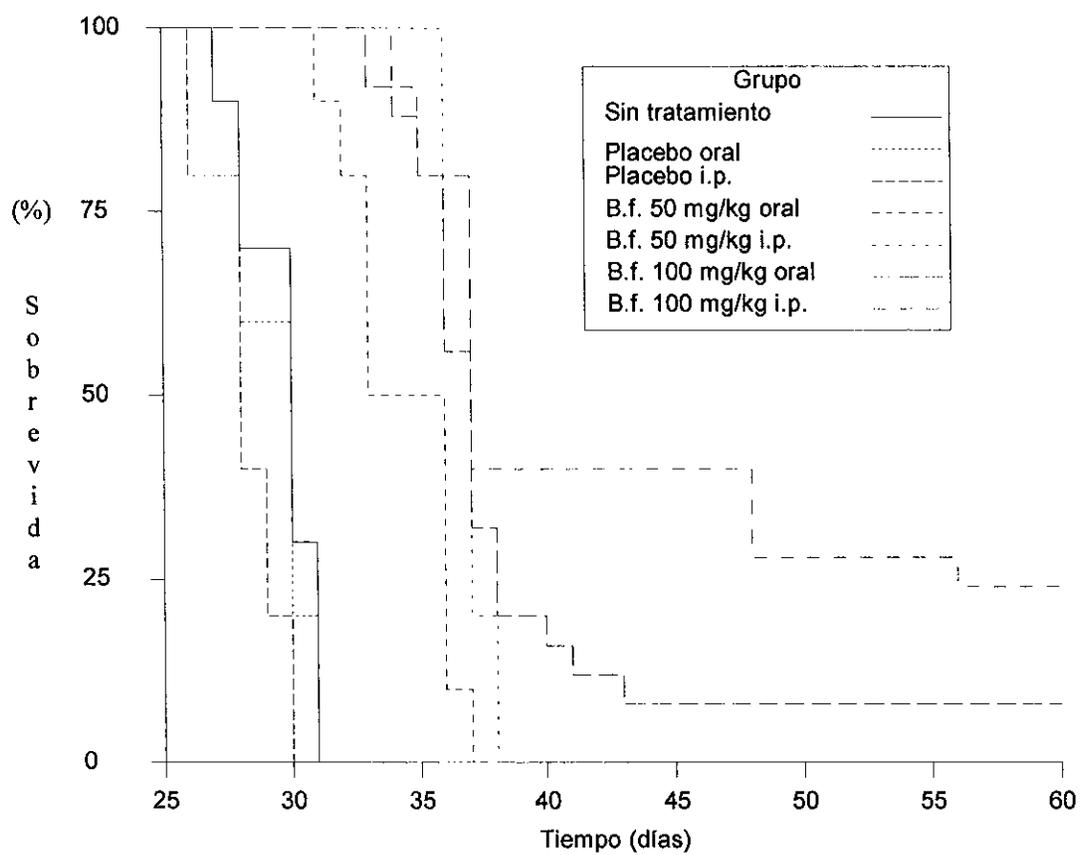


Figura 6. Efecto antitumoral de *Bursera fagaroides* evaluada por sobrevida en relación a los ratones con linfoma L5178Y, comparando los grupos control (sin tratamiento o tratados con placebo n = 10) contra los grupos tratados con 50 mg/kg/día/15 días (n = 10) y contra los grupos tratados con 100 mg/kg/día/15 días (n = 25). La estimación de sobrevida ($p < 0.001$) se hizo por la prueba de Kaplan Meier y Regresión de Cox.

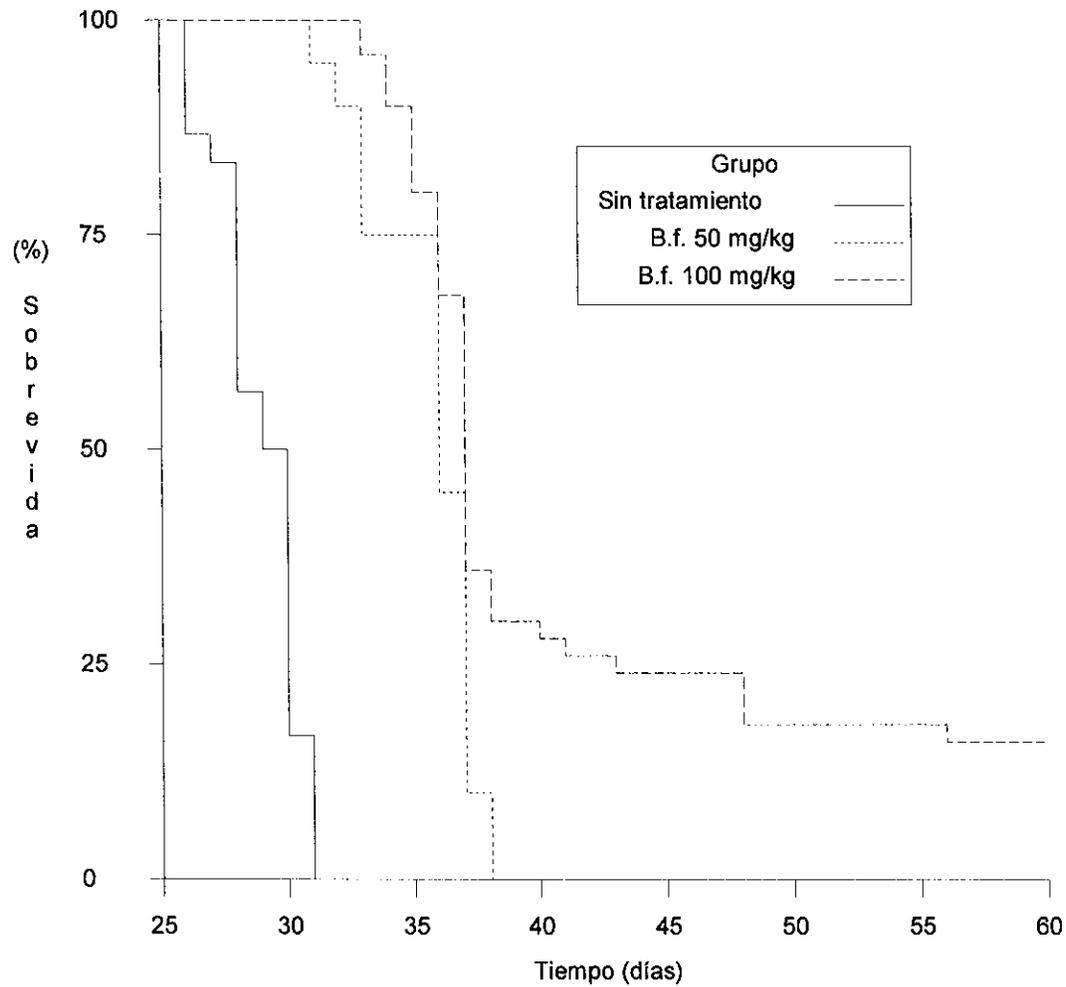


Figura 7. Efecto antitumoral de *Bursaria fagaroides* evaluada por sobrevida en relación a los ratones con linfoma L5178Y, comparando dos dosis ($p < 0.001$)

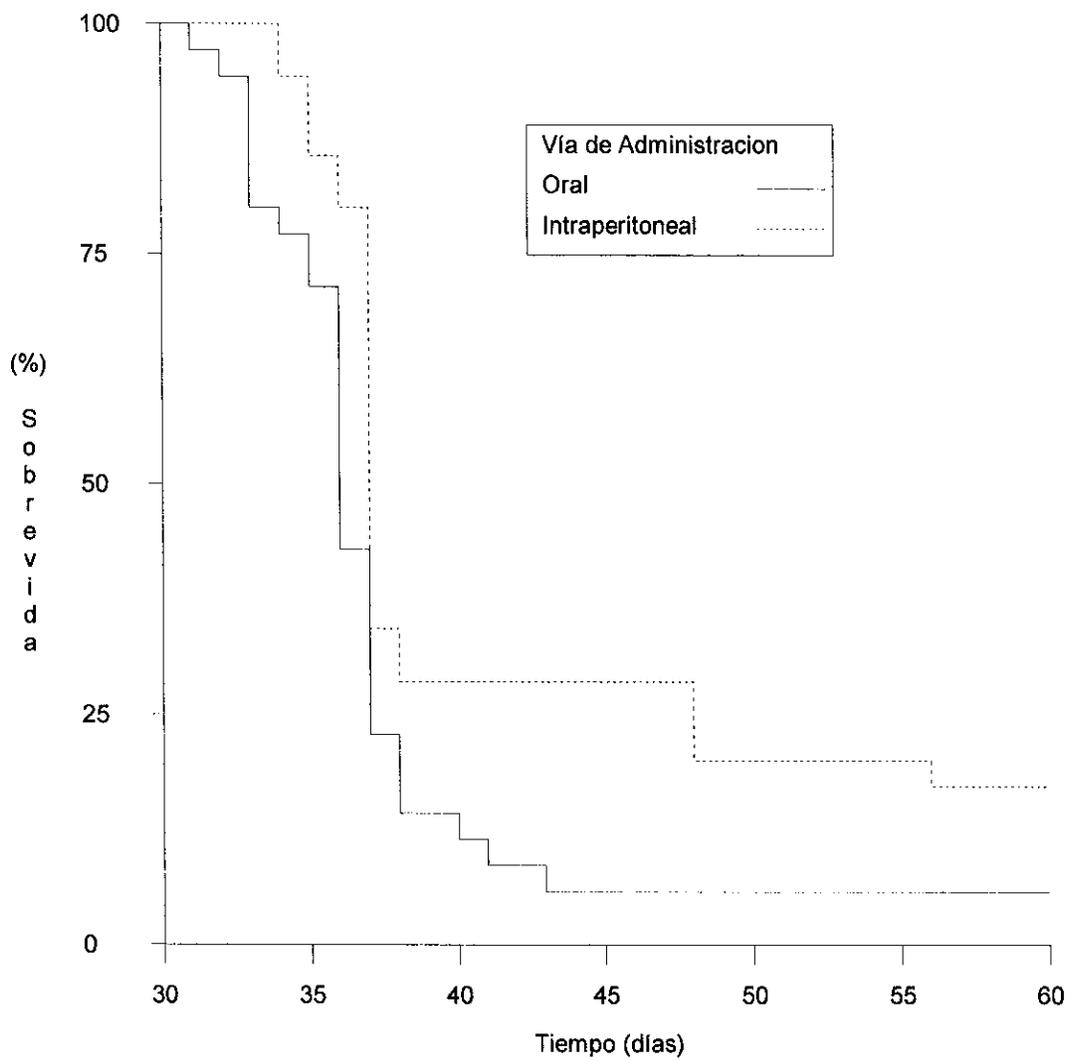


Figura 8. Actividad antitumoral de *Bursera fagaroides* evaluada por sobrevida en ratones con linfoma L5178Y, comparando dos vías de administración, oral contra intraperitoneal ($p < 0.001$)

Tabla 2. Efecto del extracto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) en la actividad fagocítica de macrófagos alveolares de ratones BALB/c portadores o no de linfoma L5178Y.

| | | % Fagocitosis | I. Fagocítico | I. Digestivo |
|------------------|---|---------------|---------------|--------------|
| Grupos | n | X±D.S | X±D.S | X±D.S |
| 1) Control | 5 | 43.57 ± 15.01 | 1.23 ± 0.77 | 0.69 ± 0.47 |
| 2) L5178Y | 5 | 29.8 ± 7.05 | 0.59 ± 0.12 | 0.40 ± 0.07 |
| 3) L51 + Bf i.p. | 5 | 28.2 ± 7.04 | 0.57 ± 0.19 | 0.32 ± 0.31 |
| 4) L51 + Bf oral | 5 | 79.8 ± 3.11 | 1.96 ± 0.33 | 0.53 ± 0.31 |
| 5) Bf i.p. | 5 | 87.8 ± 1.48 | 3.29 ± 0.38 | 0.76 ± 0.19 |
| 6) Bf oral | 5 | 94.6 ± 1.14 | 4.88 ± 1.29 | 1.73 ± 0.57 |

Prueba t de Student:

1 vs 4, 5 y 6 p < 0.001
 2 vs 4, 5 y 6 p < 0.001
 3 vs 4, 5 y 6 p < 0.001
 4 vs 5 y 6 p < 0.001

1 vs 5 y 6 p < 0.001
 2 vs 5 y 6 p < 0.001
 2 vs 4 p < 0.01
 3 vs 4, 5 y 6 p < 0.001
 4 vs 5 y 6 p < 0.001
 5 vs 6 p < 0.001

1 vs 6 p < 0.01
 5 vs 6, 2 y 3 p < 0.01
 6 vs 2 y 3 p < 0.001
 6 vs 4 p < 0.01

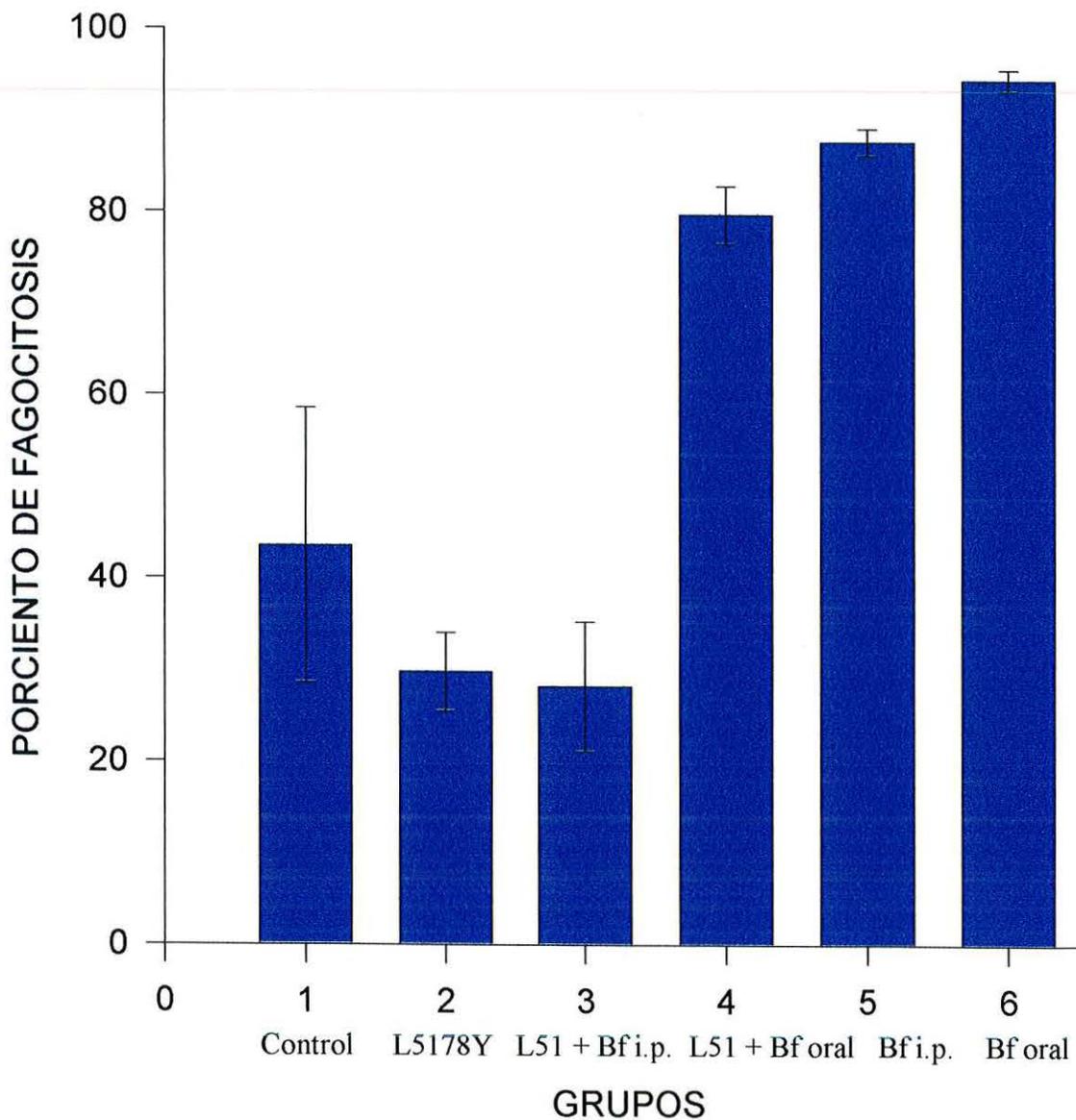


Figura 9. Efecto del extracto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) en el porcentaje de macrófagos alveolares de ratones sanos y con linfoma L5178Y que fagocitaron por lo menos una levadura de *C. albicans*.

Los valores representan el promedio +/- DS de 5 experimentos en cada grupo

Comparación de grupos por t de Student 1 vs 4, 5 y 6 $p < 0.001$, 1 vs 2 y 3 $p = N.S.$

2 vs 4, 5 y 6 $p < 0.001$, 3 vs 4, 5 y 6 $p < 0.001$; 4 vs 5 y 6 $p < 0.001$; 5 vs 6 $p < 0.001$

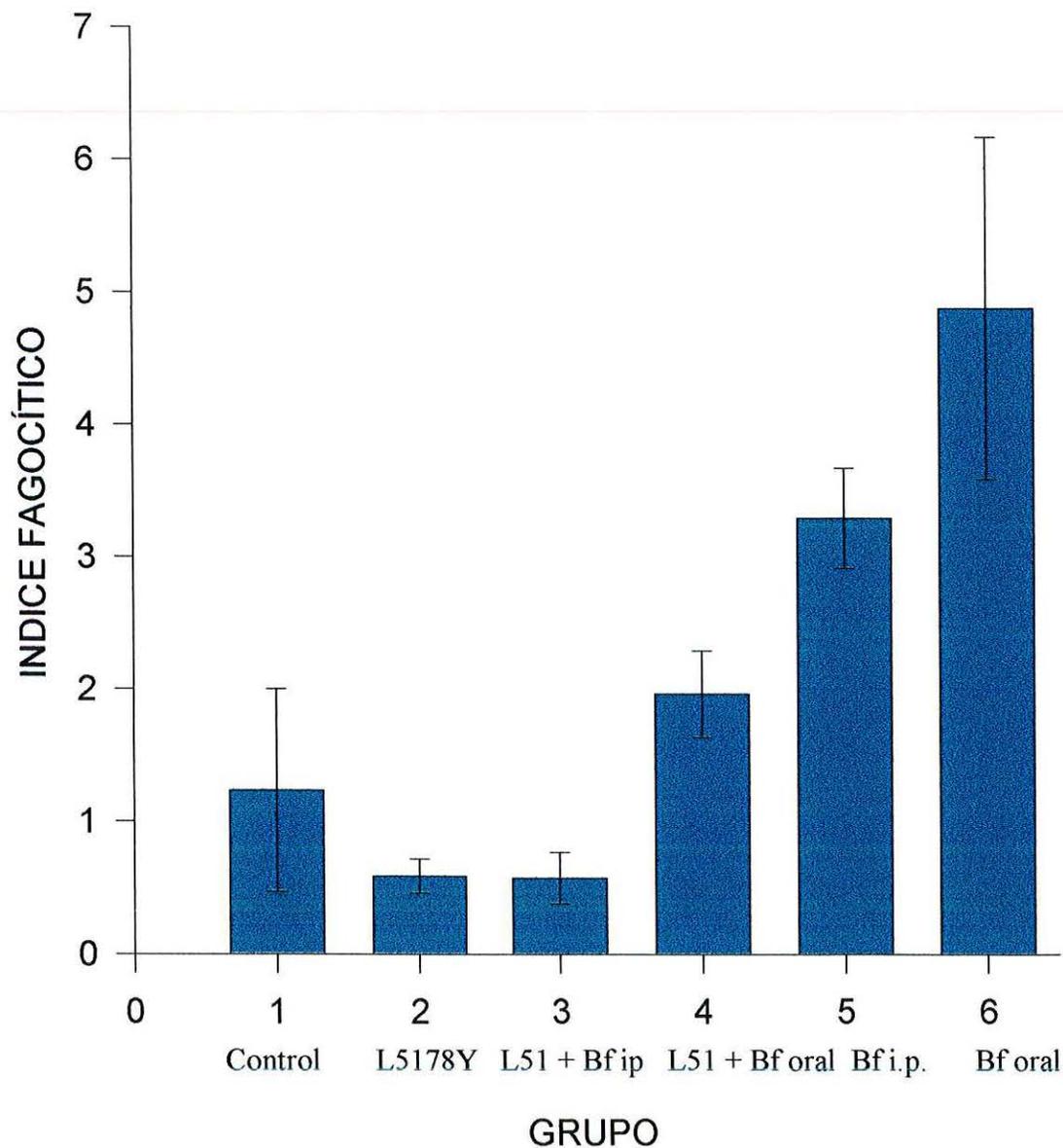


Figura 10. Efecto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) sobre el índice fagocítico de macrófagos alveolares de ratones con linfoma L5178Y comparados con el grupo control. Cada grupo representa el promedio +/- DS de una n = 5 Comparación de grupos por t de Student 1 vs 5 y 6 p < 0.001; 2 vs 4,5 y 6 p < 0.001 3 vs 4,5 y 6 p < 0.001; 4 vs 5 y 6 p < 0.001; 5 vs 6 p < 0.05.

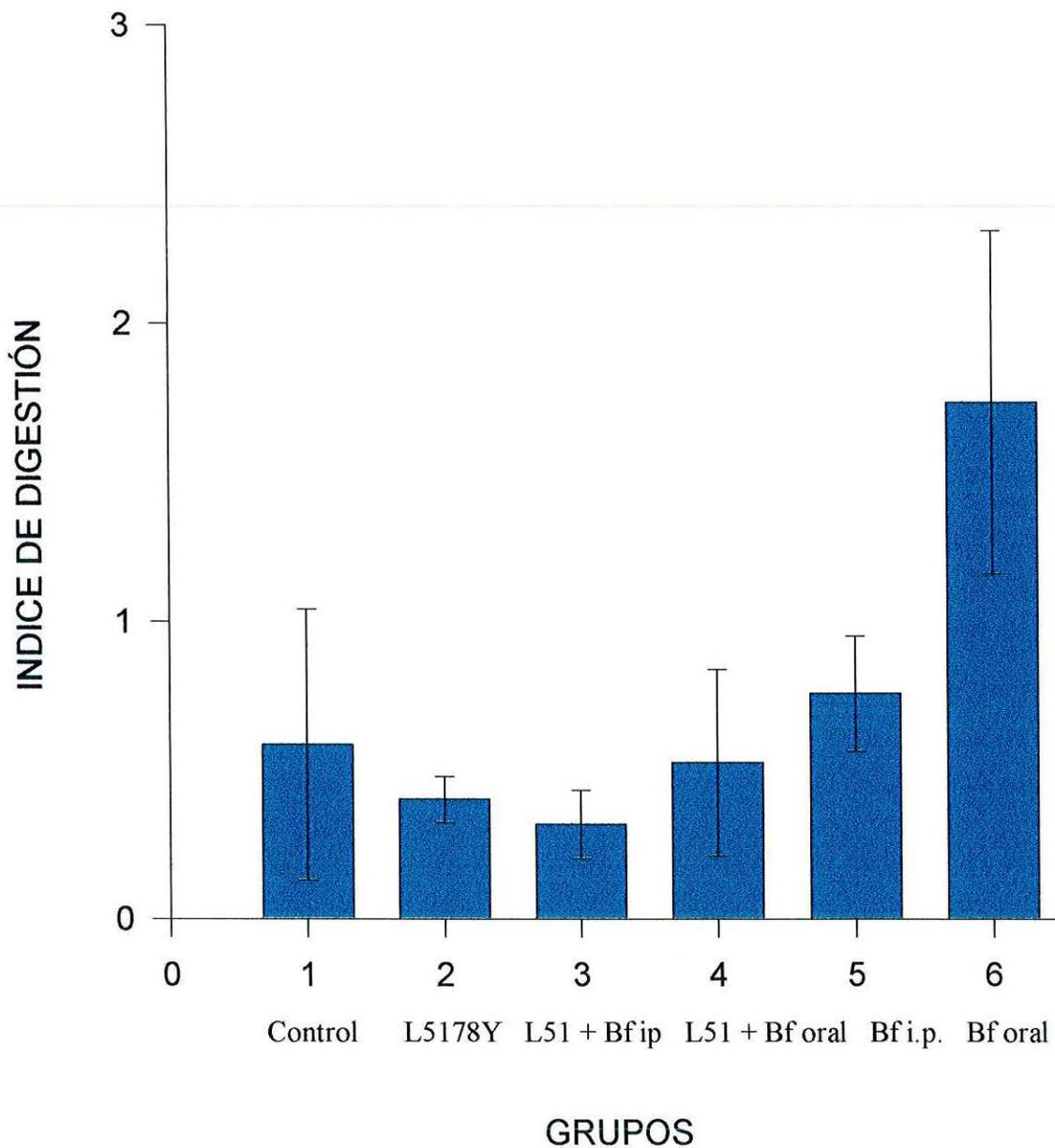


Figura 11. Efecto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) sobre el Índice de digestión de macrófagos alveolares de ratones con linfoma L5178Y comparados con el grupo control. Cada grupo representa el promedio +/- D.S. de una n = 5. 1 vs 6 p < 0.01; 2 vs 5 p < 0.01; 2 vs 6 p < 0.001 3 vs 5 p < 0.01; 3 vs 6 p < 0.001; 6 vs 4 y 5 p < 0.01.

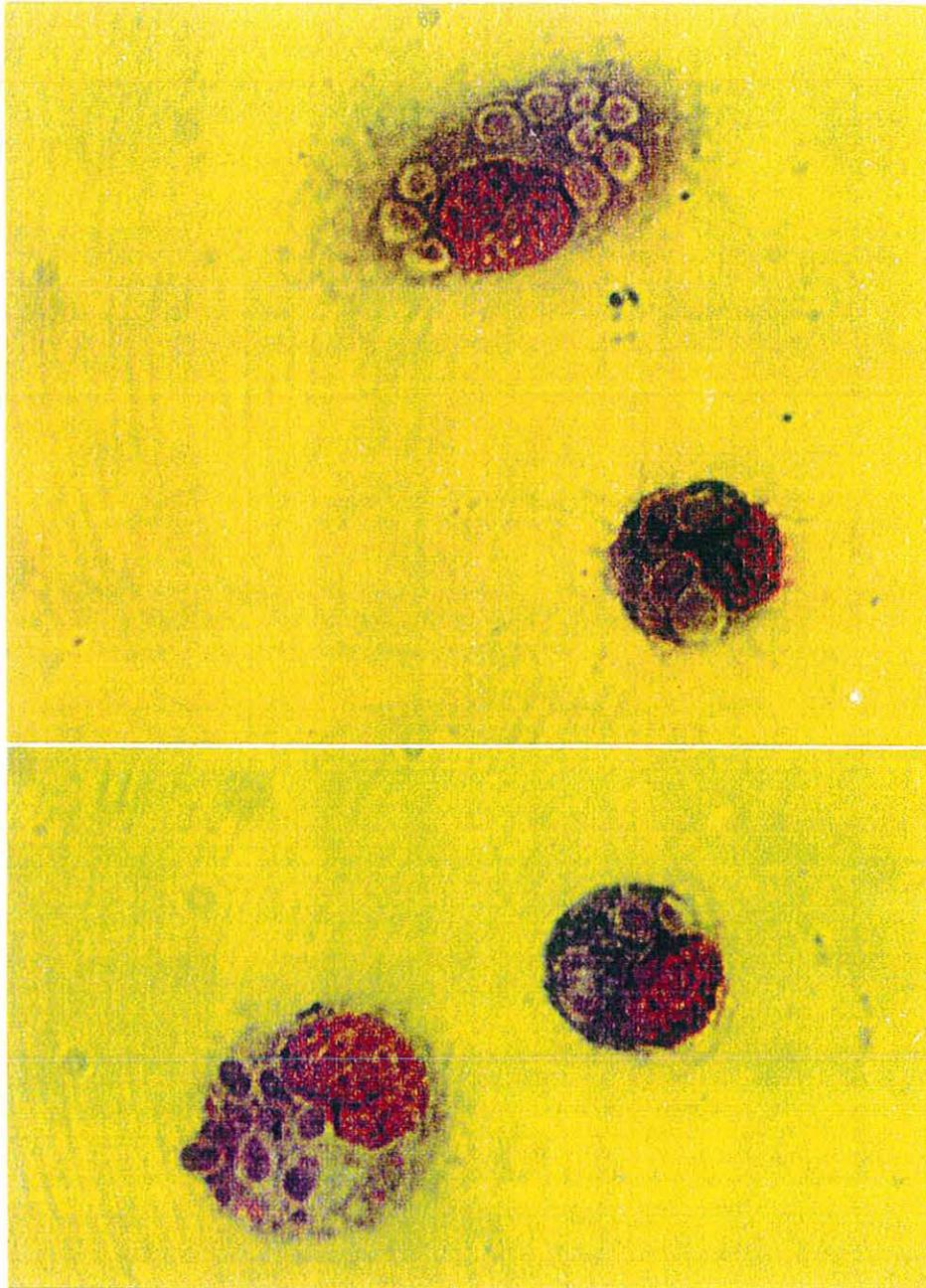


Figura 12

Microfotografía de la actividad fagocítica de macrófagos alveolares de ratón BALB/c portador de linfoma L5178Y y tratado con *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15días).

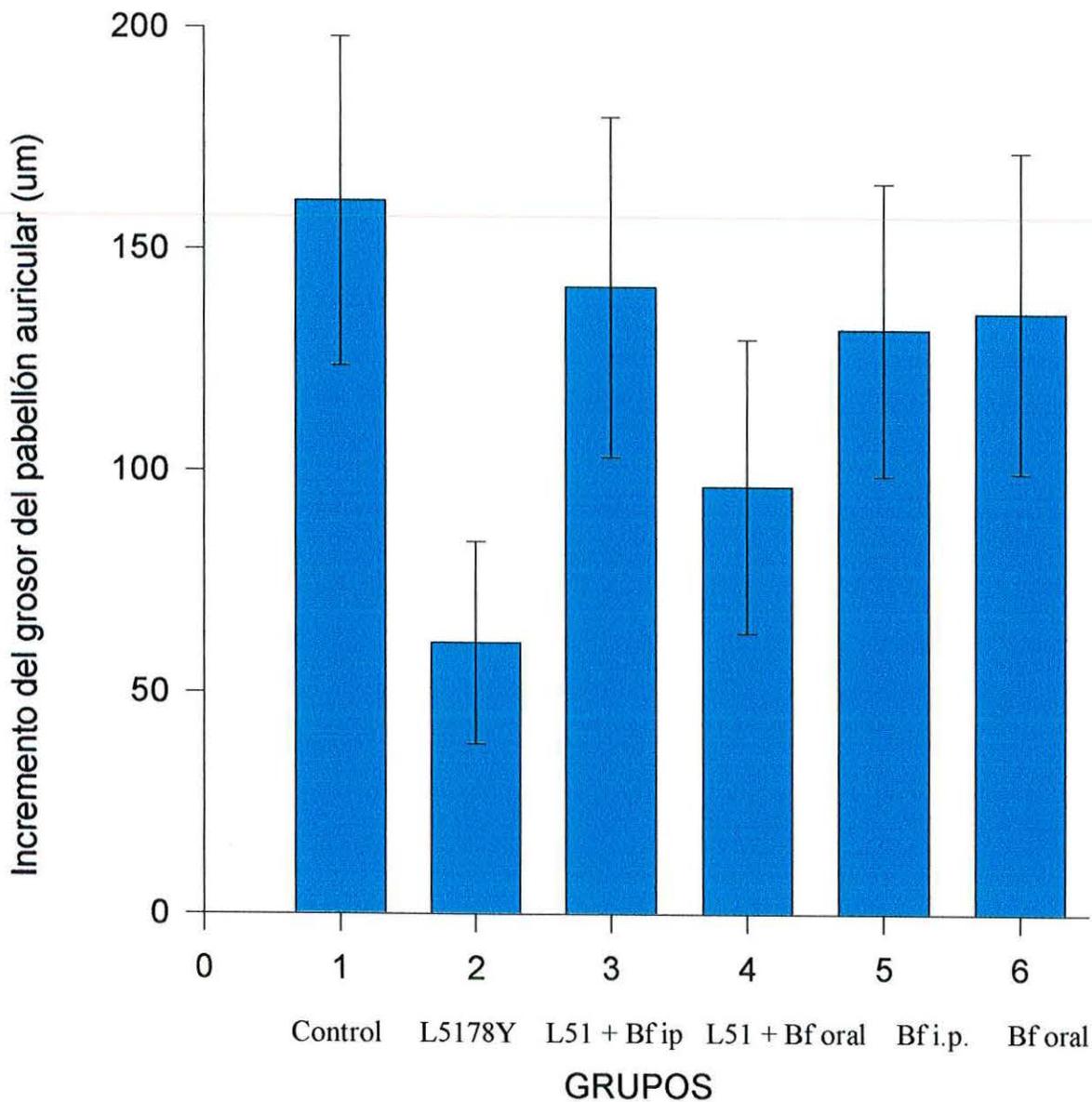


Figura 13. Efecto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) en la respuesta inmune celular valorada por hipersensibilidad retardada al DNFB. Los valores de cada grupo representan el promedio +/- D.S. de n = 10.

**Al análisis estadístico por t de Student 1 vs 2 p < 0.001; 1 vs 4 p 0.01
2 vs 3 p < 0.01; 2 vs 5 y 6 p < 0.001**

Tabla 3. Efecto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15días) en la respuesta inmune celular valorada por Hipersensibilidad Retardada al DNFB y mediante Proliferación de esplenocitos estimulados con PHA de ratones BALB/c portadores o no de linfoma L5178Y.

| Grupos | n | Incremento del grosor del pabellón aurícula (μ) X \pm D.S | Infiltrado celular | n | Respuesta proliferativa a PHA (IE) X \pm D.S |
|------------------|----|--|--------------------|---|---|
| 1) Control | 10 | 160.9 \pm 37.11 | +++ | 6 | 4.48 \pm 1.74 |
| 2) L 5178Y | 10 | 61.2 \pm 22.8 | + | 6 | 1.53 \pm 0.53 |
| 3) L51 + Bf ip | 10 | 141.6 \pm 38.35 | +++ | 6 | 2.96 \pm 0.76 |
| 4) L51 + Bf oral | 10 | 96.6 \pm 33.09 | +++ | 6 | 2.56 \pm 1.25 |
| 5) Bf i.p | 10 | 132 \pm 33 | +++ | | N.D. |
| 6) Bf oral | 10 | 135.8 \pm 36.2 | +++ | | N.D. |

Prueba t de Student:

1 vs 2 p < 0.001

1 vs 4 p < 0.01

2 vs 5 y 6 p < 0.001

2 vs 3 p < 0.01

1 vs 2 p < 0.01

2 vs 3 p < 0.01

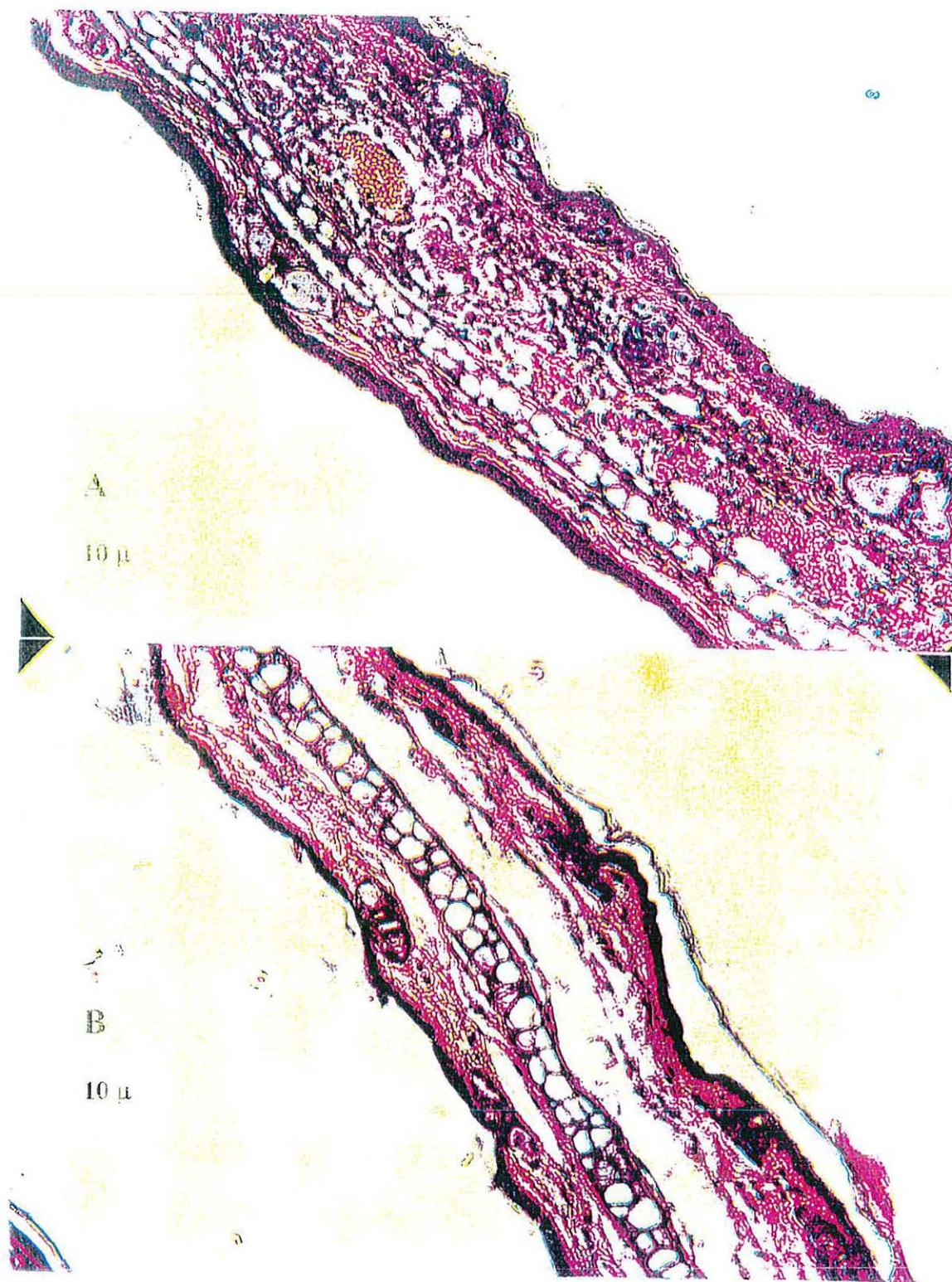


Figura 14

Microfotografías de cortes histopatológicos del pabellón auricular observados al microscopio de luz (10X) **A.** Ratón portador de linfoma L5178Y y tratado con *Bursaria fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) se observa abundante infiltrado celular **B.** Ratón inmunosuprimido por el linfoma L5178Y valorado por HSR al DNFB se observa por escaso infiltrado celular .

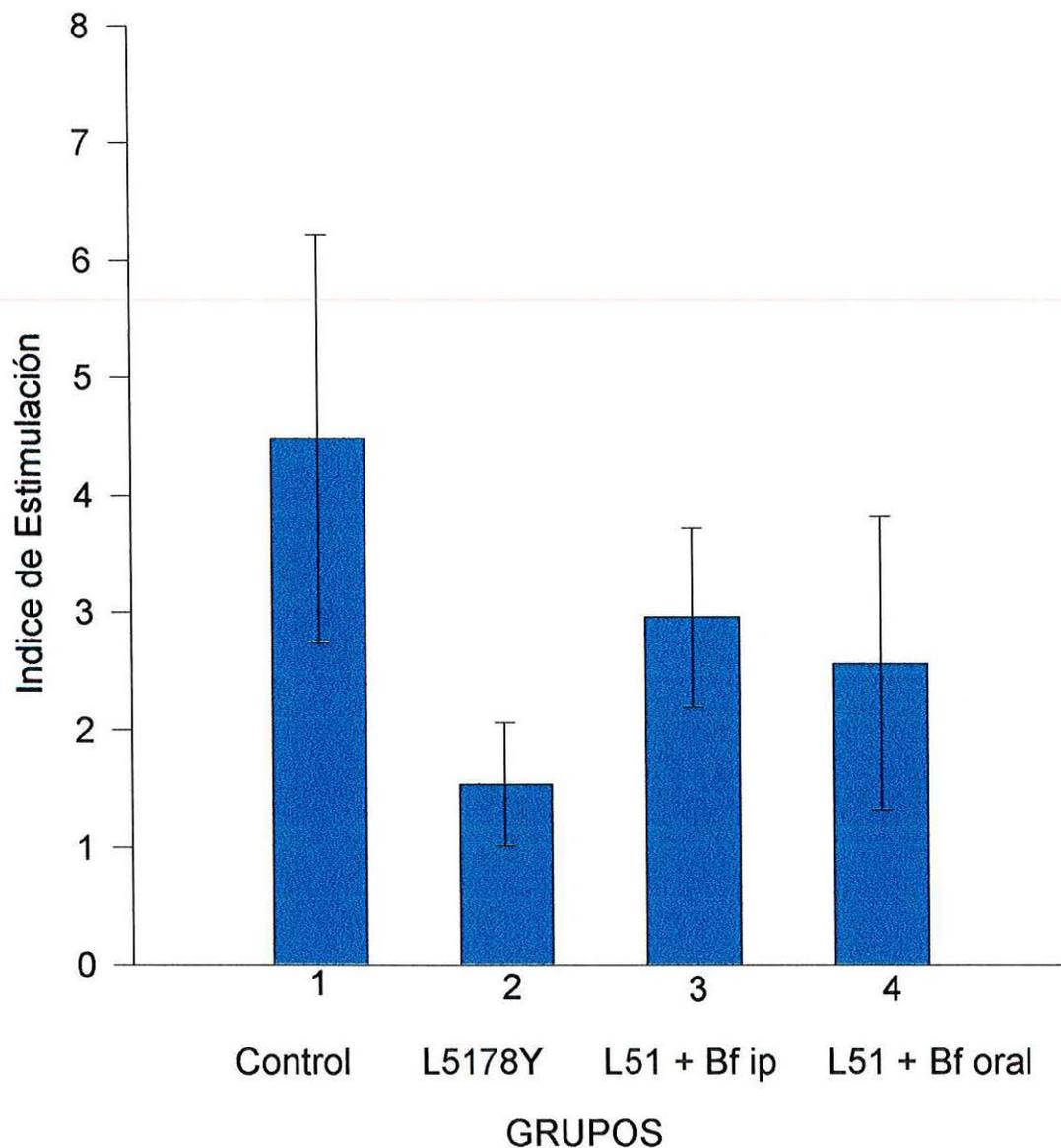


Figura 15. Efecto de *Bursera fagaroides* (100 mg/kg/día/15 días) en la respuesta inmune celular valorada por el Índice de estimulación de linfocitos de bazo estimulados con fitohemaglutinina. Los valores representan el promedio +/- D.S de 6 experimentos por grupos. El análisis estadístico por t de Student 1 vs 2 $p < 0.002$; 2 vs 3 $p < 0.003$; 2 vs 4 $p = \text{N.S.}$; 1 vs 3 y 4 $p = \text{N.S.}$

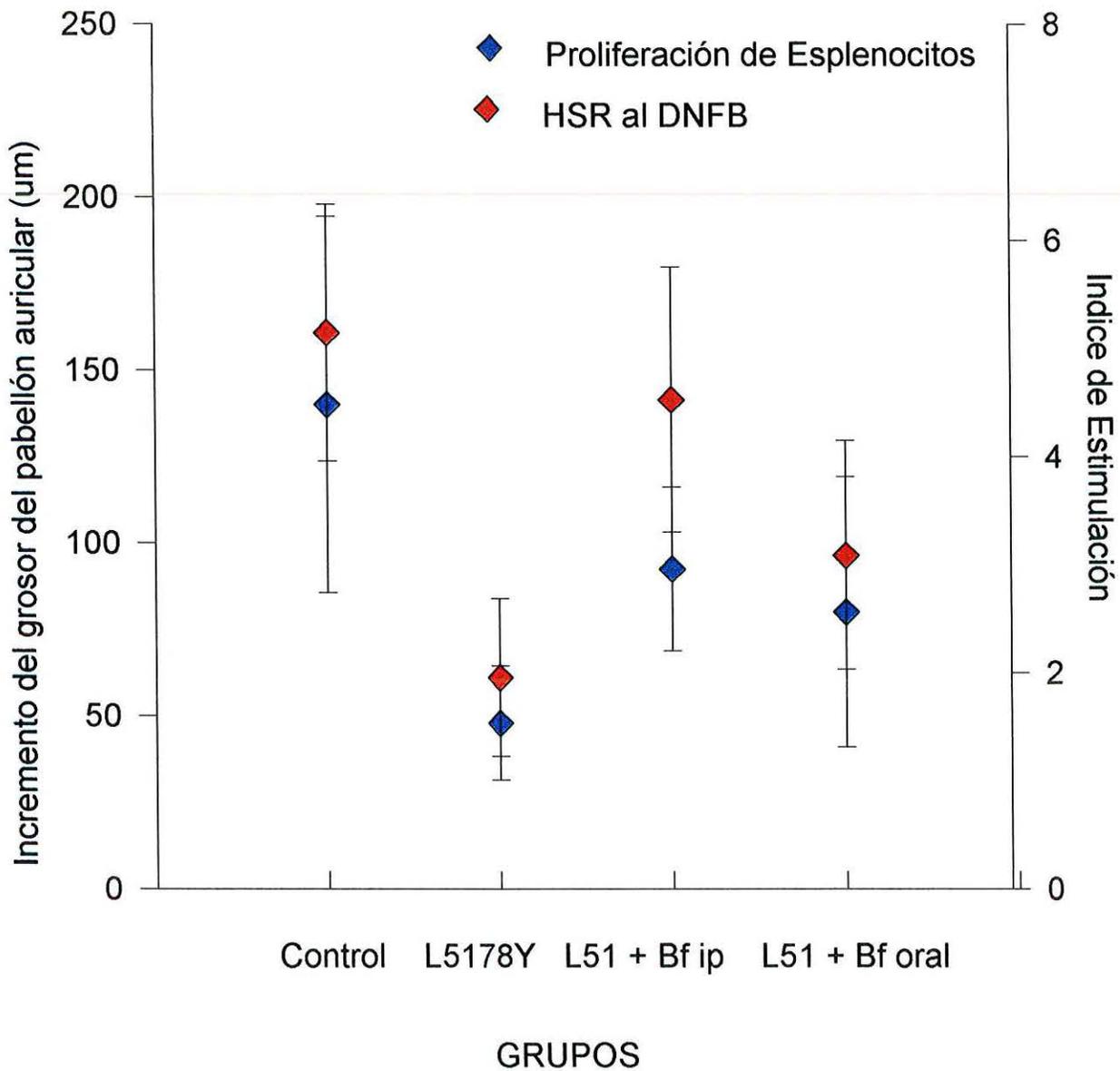


Figura 16. Resultados del efecto de *Bursaria fagaroides* (100 mg/kg/día/15días) en la respuesta inmune celular valorada por hipersensibilidad retardada al DNFB y por proliferación de esplenocitos en respuesta a PHA. Puede observarse el mismo efecto de inmunosupresión en ratones con linfoma y estimulación de la respuesta con el tratamiento

IX. DISCUSION

Bursera fagaroides es una de las plantas medicinales con mayor distribución en México, no obstante, la información de su actividad biológica es escasa. La búsqueda de productos antitumorales de plantas se basa en el empleo de bioensayos dirigidos *in vitro* (ensayos de citotoxicidad) como indicadores primarios de dicha actividad, seguido de modelos *in vivo*.

En el presente trabajo, se estudió el potencial citotóxico antitumoral e inmunológico del extracto hidroalcohólico obtenido de la corteza de *Bursera fagaroides*, conocida comúnmente en la Medicina Tradicional Mexicana como “copalillo”.

Los procedimientos para la obtención de compuestos procedentes de plantas con actividad biológica prometedora en cancerología requieren de estudios sistemáticos partiendo de la selección de **plantas medicinales**, conforme a los conocimientos medicinales y a la actividad biológica deseada. Para ello, diferentes partes de la planta son separadas y procesadas para extraer los compuestos con los solventes previamente seleccionados, de esta manera los extractos crudos son ensayados biológicamente antes de ser aislados y caracterizados (82). Este trabajo se realizó utilizando la corteza de la planta y se hizo una primera extracción con hexano para eliminar principalmente ceras y las siguientes extracciones con alcohol al 70 %, este solvente extrae principalmente compuestos polares y de mediana polaridad, es decir compuestos que son solubles o parcialmente solubles en agua. Es la forma más parecida a la que Medicina Tradicional

lo utiliza. En seguida el estudio fitoquímico cualitativo donde se identificó la presencia en gran proporción de flavonoides y saponinas. No se identificaron alcaloides. El análisis cromatográfico en capa fina de gel de sílice, en general reveló mucha semejanza en la complejidad de la composición de los tres liofilizados, pero sólo en el L1 se distinguieron ocho componentes, sin embargo sólo tres fueron compartidos en L1, L2 y L3 (Figura 2). Con los métodos empleados estudiamos el grado de complejidad de los extractos y se logró mostrar que los extractos hidroalcohólicos de esta planta tienen compuestos con la actividad biológica planteada: citotóxica, antitumoral e inmunológica.

La actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* fue evaluada en cultivo de células de linfoma murino L5178Y, y se encontró que 20 µg/ml fue la dosis que mató al 50 % de las células en cultivo. La DE-50 fue calculada por sobrevida de células valoradas con azul tripano. Para corroborar la citotoxicidad de *Bursera fagaroides*, las células cosechadas fueron lavadas tres veces con solución salina fisiológica y se reimplantaron i.p. en ratones sanos en donde se observó desarrollo tumoral por sobrevida (Tabla 1).

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad se encontraron en los límites aceptados en los protocolos del Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos de América (NCI), donde se menciona que para considerar a una planta prometedora con fines antitumorales en los ensayos biodirigidos de citotoxicidad, la dosis que mate al 50 % de las células tumorales en cultivo debe ser menor o igual a 20 µg/ml (74,75). Con

estos resultados se demostró el efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de esta planta, que fue uno de los objetivos generales y particulares del trabajo.

En virtud de que los extractos hidroalcohólicos mostraron actividad citotóxica en los límites antes mencionados, se procedió a los ensayos *in vivo*. El ensayo de citotoxicidad, fue el bioensayo dirigido en el que nos basamos para sólo trabajar con el liofilizado 1, ya que se obtuvo en menor tiempo, con mayor rendimiento y a menor costo en relación con el L2 y el L3.

Aún cuando solo se tienen pruebas experimentales de la presencia de saponinas y flavonoides en los extractos, no es posible con los datos hasta ahora obtenidos atribuir el efecto citotóxico a las saponinas o a los flavonoides o a ambos. Sin embargo, estos datos son motivo de otras investigaciones ya que por una parte los flavonoides son pigmentos vegetales con un esqueleto carbonado los cuales se encuentran tanto libres como unidos a un glicósido, estas sustancias contribuyen de manera importante al sabor y color de muchos de los frutos de consumo humano. Aproximadamente se conocen unos 200 flavonoides naturales y existen varios reportes donde se les atribuye efectos antiinflamatorios, antialérgicos, antioxidantes, antitumorales y antivirales **(70,83)**. Por otra parte, las saponinas son glicósidos con un esqueleto esteroideal muy polares y una de sus características fisicoquímicas es que disminuyen la tensión superficial del agua, por lo que al agitar las soluciones que contienen estos compuestos se forma una espuma abundante y relativamente estable **(70)**. En general, las saponinas debido a la base esteroideal que presentan se cree que reaccionan con el colesterol de las membranas celulares por lo que aumenta la permeabilidad celular y por ello se les

atribuye efecto antiinflamatorio, adyuvante y hemolítico entre otros efectos biológicos **(70, 84, 85, 86)**.

Por todo lo anterior, se continuó la investigación de la actividad biológica del extracto crudo de esta planta. Así, después de determinar la DL-50 la cual correspondió aproximadamente a 250 mg/kg de peso corporal, se procedió a evaluar la actividad antitumoral. Los ratones BALB/c inoculados i.p. con 2×10^4 células de linfoma murino L5178Y murieron aproximadamente en 30 días cuando no recibieron ningún tratamiento o fueron tratados con placebo. Sin embargo, cuando fueron tratados con el extracto hidroalcohólico liofilizado obtenido de la corteza de la planta (50 o 100 mg/kg/día durante 15 días) se observó que los animales sobrevivieron mas tiempo en días ($p < 0.001$) comparados con el grupo placebo o con el grupo control (Figura 6). De esta manera, *Bursera fagaroides* a razón de 100 mg/kg i.p./día durante 15 días inhibió totalmente el desarrollo tumoral en el 26 % de los ratones, mientras la misma dosis, administrada por vía oral inhibió el desarrollo tumoral en el 8 % de los animales **(87)**. Es importante señalar que tanto el grupo tratado por vía oral como el tratado por vía intraperitoneal se realizó en experimentos independientes con grupos de cinco animales y los experimentos fueron repetidos 5 veces por lo que el número total de animales fue de 25 para cada vía de administración. En este estudio se trabajó con dos vías de administración debido a que por una parte la vía oral es la más usual en Medicina Tradicional, y a que es más fácil de administrar; por otra parte la absorción, biotransformación, distribución y excreción de los compuestos son diferentes ya que el efecto puede ser sistémico. En tanto que la vía intraperitoneal puede tener un efecto

directo con las células tumorales -al menos en este modelo que crece en fase ascítica- y no tener un efecto sistémico o tenerlo en menor proporción que la vía oral.

Ahora bien, los estudios de *Bursera fagaroides* se iniciaron a finales de la década de los sesentas en la Universidad de Arizona, por Bianchi *et al* (23), como parte de una continua búsqueda seleccionada (screening) de plantas por su potencial actividad antitumoral; nuestros resultados en relación a la actividad antitumoral del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides*, apoyan la actividad biológica reportada por Bianchi, en su estudio observaron incremento en el porcentaje de la sobrevivencia de los animales, en tanto que nuestros resultados además del incremento en la sobrevivencia, se inhibió el desarrollo tumoral en algunos de los animales. Tal vez se deba en parte al sistema de extracción, ya que ellos utilizaron cloroformo en lugar de etanol al 70 %. Si tomamos en cuenta que el cloroformo extrae compuestos no polares, además de que se trabajó con compuestos puros del tipo de las peltaltinas. Por ello, lo más probable es que se trate de compuestos diferentes, ya que en el ensayo fitoquímico nosotros detectamos la presencia de saponinas y flavonoides y en la cromatografía se observan por lo menos ocho compuestos diferentes; tal vez alguno de estos compuestos o la mezcla de ellos sean los responsables del efecto antitumoral en ratones con linfoma L5178Y. Por otra parte, también el sistema tumoral fue diferente, ellos utilizaron el carcinoma intramuscular Walker 256 (WA16) en ratas y por otra parte la referencia no menciona vía ni tiempo de administración (23). Por todo lo anterior, consideramos que nuestros ensayos de extracción de los compuestos que conforman el extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* y el modelo para valorar actividad citotóxica y

antitumoral fueron los adecuados e inclusive mejor que lo reportado por Bianchi. En este sentido, los datos sobre la actividad biológica que esta planta medicinal mexicana mostró, resultaron ser prometedores y fueron motivo para continuar con estas investigaciones.

Si tomamos en cuenta que los extractos de una planta son siempre una mezcla compleja de diferentes sustancias químicas que reaccionan con estructuras celulares de una forma no selectiva (43), el daño en células sanas del huésped sobre todo las células que participan en la regulación de la respuesta inmune puede ocurrir, tal como ocurre en el tratamiento de enfermedades malignas por drogas o productos citotóxicos donde con frecuencia se observan serios efectos colaterales, tales como infecciones oportunistas y enfermedades malignas secundarias (31,44,89). Por otra parte, se ha demostrado que los ratones con linfoma L5178Y después de un tiempo de evolución del tumor, se manifiesta en ellos un estado de inmunosupresión (73,88). Por lo anterior, consideramos importante evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico en la respuesta inmune de los animales con linfoma L5178Y.

La respuesta inmune no específica, fue evaluada a través de la fagocitosis de *Cándida albicans* por los macrófagos alveolares de los diferentes grupos estudiados. Se eligió macrófagos alveolares debido a que el linfoma murino L5178Y fue implantado en cavidad peritoneal y no tuvimos el éxito en los animales donde la masa tumoral interfería para hacer una buena evaluación de la actividad fagocítica y poder compararlos con los otros grupos. La dosis terapéutica antitumoral del extracto administrado por vía oral, incrementó significativamente ($p < 0.001$) la actividad

fagocítica de los macrófagos alveolares de ratones portadores de tumor comparado contra los macrófagos de los ratones inmunosuprimidos por el linfoma (Figura 9). El extracto administrado por vía i.p. no mostró cambios significativos con respecto a los macrófagos obtenidos de ratones inmunoprimidos por el linfoma (Figuras 10, 11 y 12). Con respecto a la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares de ratones sanos, se encontró que la dosis terapéutica administrada por vía oral mejoró la respuesta de los animales inmunosuprimidos por el tumor sin embargo, administrado por vía i.p. no produjo el mismo efecto. Cabe mencionar que este incremento sólo se observó en el porcentaje de fagocitosis y en el índice de ingestión (Figuras 9 y 10) pero no en el índice de digestión (Figura 11), tal vez esto se deba a que le faltó tiempo a los macrófagos para digerir las levaduras fagocitadas, o a que los compuestos que conforman el extracto, no activen la producción de óxido nítrico (ON) o de alguna de las citocinas que participan en la actividad antitumoral, y/o los mecanismos fungicidas de los macrófagos (45,47,50). Por otra parte, la razón por la que el extracto administrado por vía i.p. no produjo efecto en los macrófagos alveolares de los animales, tal vez se deba a que el extracto no es absorbido y por lo tanto no se encuentra biodisponible en forma sistémica como en el caso de la administración por vía oral, por esta vía pudiera ser que el metabolito activo responsable del efecto pudiera surgir de un proceso de biotransformación digestiva del extracto; y que este no esté presente en cavidad peritoneal puesto que no se lleva a cabo una biotransformación. Otra probable causa es que si bien, el extracto administrado i.p. aumenta la sobrevivencia de ratones con linfoma, esto pudiera deberse a que **1**) actúa directamente sobre la célula

tumoral y que debido a esto, no queda disponible más extracto o quede en pequeñas cantidades para hacer su efecto sobre los macrófagos alveolares; ó 2) que el efecto antitumoral suceda a través de la activación de los macrófagos peritoneales datos que estamos por confirmar en estudios subsecuentes.

La respuesta inmune específica valorada tanto por hipersensibilidad retardada al DNFB como por la proliferación de esplenocitos al mitógeno PHA en ratones con linfoma y tratados con el extracto tendió a mejorar; sin embargo, al análisis estadístico las diferencias no fueron significativas con respecto al grupo de ratones portadores del tumor sin ningún tratamiento, tampoco hubo diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en el grupo sano sin tumor y sin tratamiento (Figuras 13 y 15), lo cual indica que el tratamiento antitumoral con el extracto de *Bursera fagaroides*, ya sea administrado por vía oral o i.p., estimula la respuesta inmune celular de los ratones portadores de linfoma L5178Y porque no lo mantiene en la inmunosupresión sino que incrementa la repuesta inmune de los animales portadores de tumor y tratados por cualquiera de las dos vías. Este efecto es muy importante, ya que muestra la eficacia terapéutica antitumoral sin comprometer el sistema de defensa del hospedero, que es lo que ocurre casi siempre con un compuesto o la mezcla de compuestos que tiene actividad citotóxica y antitumoral, estos tienen efecto inmunosupresor (89,90).

En este trabajo lo que podemos observar es que el extracto además de su efecto antitumoral tiende a rescatar de la inmunosupresión a los ratones portadores del tumor y tal vez los responsables de esta actividad sean los glicósidos tipo flavonoides y/o las

saponinas o algún otro compuesto presente en el extracto, que pudieran estar actuando directamente con las células tumorales o bien a través de la activación de los macrófagos, que como se mencionó son componentes de la inmunidad innata y cuando son activados son capaces de fagocitar y destruir células tumorales mediante el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la producción de óxido nítrico (NO), a través de la formación de radicales libres oxidantes, interleucina -1 beta (IL-1 β), enzimas proteolíticas y probablemente el mecanismo sea mediante la inducción de apoptosis (91). Por otra parte, como células presentadoras de antígeno los macrófagos desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células donde los principales protagonistas son los linfocitos T, sus subpoblaciones y las citocinas. El estudio de la inmunidad celular puede realizarse mediante pruebas *in vivo*, como es la hiepersensibilidad retardada al DNFB, o pruebas *in vitro* como la proliferación de linfocitos T en respuesta a un mitógeno inespecífico como la fitohemaglutinina. Ambas pruebas, entre otras, son de utilidad para detectar efectos de agentes inmunosupresores o inmunoestimulantes. Tomando en cuenta el estado de inmunosupresión en ratones con linfoma L5178Y el cual fue evaluado por pruebas de hipersensibilidad al DNFB (73, 88), los datos obtenidos mediante el tratamiento con el extracto de *Bursera fagaroides* muestran claramente la tendencia de rescatar del estado de inmunsupresión a los animales con tumor, valorado el efecto inmunoestimulante mediante una prueba *in vivo* y otra *in vitro* (Figura 16).

Aún cuando los efectos son claros, es difícil explicar los mecanismos por los cuales los compuestos presentes en el extracto tienen efecto antitumoral e inmunoestimulante. Lo que sí podemos mencionar es que tanto las saponinas como los flavonoides, son glicósidos a los cuales se les atribuye diferentes actividades biológicas. Así, a las saponinas se les atribuye propiedades antimicrobianas y antifúngicas, inclusive muchas de ellas son utilizadas como moléculas de partida para la síntesis de nuevos compuestos **(82,84,85)**. En tanto que a los flavonoides se les atribuye un amplio espectro de actividades farmacológicas tales como: actividad antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antioxidante y algunos son inhibidores enzimáticos **(83)**.

Debido a la presencia de estos compuestos en el extracto y a los resultados en los estudios de tipo inmune encontrados, podemos mencionar que es otra actividad de *Bursera fagaroides* y sólo falta dilucidar si los efectos descritos los ejercen los flavonoides o las saponinas o aún más pudiera tratarse de un efecto sinérgico o bien se deba a otro compuesto. Por todo lo anterior seguimos investigando en el laboratorio fracciones obtenidas de esta planta medicinal mexicana que parece ser prometedora, y tal vez nos encontremos en la frontera de nuevos agentes inmunomoduladores.

X. CONCLUSIONES

- 1.- El extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* es una mezcla de por lo menos ocho compuestos. Desde el punto de vista fitoquímico son glicósidos tipo flavonoides y saponinas de alta y mediana polaridad.
- 2.- El extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* posee actividad citotóxica en células de linfoma murino L5178Y, la dosis efectiva 50 (DE 50) fue de 20 µg/ml. Es una planta prometedora ya que cumple los requerimientos del INC para extractos crudos.
- 3.- La dosis letal 50 (DL-50) correspondió a 250 mg/kg de peso en dosis única en tanto que la dosis letal 100 (DL-100) fue 400 mg/kg de peso en dosis única.
- 4.- La dosis terapéutica antitumoral fue de 100 mg/kg/día durante 15 días ya que en el 8% de los animales, administrada por vía oral y en el 26% por vía intraperitoneal, inhibió totalmente el desarrollo tumoral. La dosis de 50 mg/kg/día/ 15 días incrementó la sobrevivencia de los animales tanto por vía oral como por vía i.p.
- 5.- La dosis terapéutica (100 mg/kg/día/15 días) del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* por vía oral estimula la respuesta inmune inespecífica, de ratones portadores de tumor y de ratones sanos, valorada por fagocitosis de macrófagos alveolares.

6.- La dosis terapéutica (100 mg/kg/día/15 días) del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* estimula la respuesta inmune celular valorada por hipersensibilidad retardada al DNFB y por proliferación de esplenocitos en respuesta a PHA, de ratones inmunoprimidos por el linfoma L5178Y. Y no modifica la respuesta inmune celular en ratones sanos

7.- El extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* tiene actividad citotóxica, antitumoral e inmunomoduladora en ratones BALB/c portadores de linfoma L5178Y. Probablemente los efectos biológicos encontrados se deban a la presencia de flavonoides, saponinas u otro compuesto o a la mezcla de ellos.

XI EXPECTATIVAS

Continuamos con los procedimientos correspondientes para obtener y caracterizar los principios activos del extracto estudiado.

Actualmente hemos realizado la separación de fracciones por filtración en columna de Sephadex LH-20 del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* con el propósito de repetir los bioensayos de citotoxicidad y determinar cual de ellas posee la actividad antitumoral. Seguido de la determinación en cada una de las fracciones de la presencia de glicósidos tipo saponinas y flavaonoides.

Estudiaremos cual de las fracciones es capaz de activar macrófagos *in vitro* y diseñar un protocolo para investigar la eficacia de los macrófagos frente a las células tumorales.

Así mismo, estudiaremos si estimula *in vitro* la proliferación de los linfocitos T, de manera semejante a la que causan algunos antígenos específicos o mitógenos inespecíficos como Con-A, PHA, y si es selectivo para linfocitos T o tiene efecto en los linfocitos B como el LPS.

En caso de no encontrar efecto prometedor con alguna de las fracciones se mezclarán de nuevo las fracciones y se obtendrá un extracto estandarizado de *Bursera fagaroides*, que estamos seguros será de utilidad en el tratamiento del cáncer, y en estados patológicos y de inmunosupresión.

XII BIBLIOGRAFÍA

1. Higginson J.: Changing concepts in cancer prevention: limitations and implications for future research in environmental carcinogenesis. *Cancer Res.* 1988; 48: 1381-1389.
2. Tomatis L, Aitio A, Wilbourn J, Shuker L.: Human Carcinogens So Far Identified. Review *Jpn. J. Cancer Res.* 1989; 80: 795-807.
3. Ganem D.: Infectious Avenues to Cancer. *Science.* 1999;284:1279.
4. Bishop JM.: Molecular Themes In Oncogenesis. Review *Cell.* 1991; 64: 235-248.
5. Otter WO, Koten WJ, Bert JH, Vegt VD, Beemer FA, Boxma OJ, Derkinderen DJ, DE Graaf PW, Huber J, Lips CJM, Roholl PJM, Sluijter FJH, Tan K EWP, Kees A, Heyden VD, Ven LVD, and Van Unnik JAM.: Oncogenes by Mutations in Anti-Oncogenes: A View. *Anticancer Res.* 1990; 10: 475-488.
6. Nicolson GL.: Quantitative Variations in Gene Expression: Possible Role in Cellular Diversification and Tumour Progression. *J Cell Biochemistry.* 1991; 46: 277-283.
7. Boyd MR, Paull KD.: Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Develop Res.* 1995;34:91-109.
8. Harris CC, Hollstein M.: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Eng J Med.* 1993;329: 1318-1325.
9. Gilman A.: The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surgery.* 1963; 105: 574-578.

10. Lyons RM, Goldenberg GJ.: Active transport of nitrogen mustard and choline by normal and leukaemia human lymphoid cells. *Cancer Res.* 1972; 32:1679-1685.
11. Lowley PD, Brookes P.: Molecular mechanisms of the cytotoxic action of difunctional alkylating agents and of resistance to these actions. *Nature.* 1965; 206: 480-483.
12. Alvarado CS, Boat TF, Newman TJ.: Late onset pulmonary fibrosis and chest deformity in two children treated with cyclophosphamide. *J Pediatr.* 1978; 92: 443-446.
13. Cox PJ.: Cyclophosphamide cystitis. Identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol.* 1979; 28: 2045-2049.
14. Sikic BI: Anticancer drug discovery.: *J Nat Cancer Inst.* 1991;83:738-740.
15. Hartwell JL.: Plants against cancer. A survey. *Lloydia.* 1971; 34: 386-438.
16. Morris S.: Recent Advances in the Chemistry of Tumor inhibitors of Plant Origin. University of Wisconsin. Madison. Wisconsin. Transactions New York Academy of Sciences 1970; 32: 85-112.
17. López A, Ana M, Nidia M, Rojas F, Jiménez C.: Extracts from plants with cytostatic properties growing in Cuba. *Rev Cubana Med. Trop.* 1979; 31:105-107.
18. Morris S.: The Isolation and Structural Elucidation of Two Novel Sesquiterpenoid Tumour Inhibitors from *Elephantopus elatus*. *J Am Chem Soc,* 1996; 88:15-18.
19. Liou T, Hall I, Lee K, Williams W, Chaney S.: Investigation of Sesquiterpene Lactones as Protein Synthesis Inhibitors of p388 Lymphocytic Leukaemia Cells *Bioch Bioph Acta.* 1983; 739: 190-195.

20. Takashi T, Hamuri L, Shigeru T, Yoshio S.: Overcoming of Vincristine resistance in P-388 Leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil. *Cancer Res.* 1981;41:1967-1972.
21. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM.: Natural Products in Drug Discovery and Development. *J Nat Prod.* 1997; 60: 52-60
22. Sakagami H, Kamazoe Y, Komatsu N, Simpson A, Nonoyama M, Konno K, Yoshida T, Kuroima Y, Tanuma S.: Antitumoral, Antiviral and Immunopotentiating Activities of Pine Cone Extracts. Potential Medicinal Efficacy of Natural and Synthetic Lignin-Related Materials (Review). *Anticancer Res.* 1991;11:881-891.
23. Bianchi E, Sheth K, Cole JR.: Antitumor Agents from *Bursera fagaroides* (Burseraceae) (β -Peltatin-A-Methylether and 5- Desmethoxy- β -Peltatin-A-Methylether) *Tetrahedron Let.* 1969; 32:2759-2762.
24. Cole JR, Bianchi E, Trumbull R.: Antitumor Agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) II. Isolation of a New Lignan-Burseran. *J Pharm Sci* 1969;58:175-177.
25. Trumbull ER, Cole JR. Antitumor Agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) III. Synthesis of Burseran. *J Pharm Sci.* 1969;58:176178.
26. Mc Doniel PB, Cole JR.: Antitumor Activity of *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae): Isolation and Structure Determination of Two New Lignans. *J Pharm Sci.* 1972;61:1992-1993.
27. Jolad SD, Wiedhopf RM, Cole JR.: Cytotoxic Agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: Isolation of Sapelins A and B. *J Pharm Sci* 1977;66:889-891.

28. Jolad SD, Wiedhopf RM, Cole JR.: Cytotoxic Agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): Deoxypodophyllotoxin and a New Lignan, 5'-Desmethoxydeoxypodophyllotoxin. J of Pharm Sc.1977; 66: 892-893.
29. Wickramaratne BM, Mar W, Chai H, Castillo JJ, Fanrnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD.: Cytotoxic Constituents of *Bursera permollis*. Planta Med. 1995; 61: 80-81
30. Huacuja RL, Delgado NM, Carranco A, Reyes RL, Rosado GA.: Actividad aglutinante e inmovilizante del extracto etanólico de *Bursera fagaroides* sobre espermatozoides de humano y otros mamíferos. Arch Invest Méd. (Méx). 1990; 21: 393-398.
31. Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ.: Phase I Clinical and pharmacokinetic study of taxol -I. Cancer Res. 1987; 47: 2486-2493.
32. Li YH, Guo SF, Zhou FY.: Combined harringtonine or homoharringtonine chemotherapy for acute nonlymphocytic leukemia in 25 children. Chung-hua Y Hsueh Tsa Chin (English de.) 1983; 96: 303-305
33. Ajani JA, Dimery I, Chawaia PJ.: Phase II studies of homoharringtonine in patients with advanced malignant melanoma, sarcoma, and head and neck, breast and colorectal carcinomas. Cancer Res.1986; 70: 375-379.
34. Legha SS, Keating M, Picket S.: Phase I clinical investigation of homoharringtonine Cancer Treat. Repts. 1984; 68: 1085- 1091.
35. Neidart IA, Young DC, Kraut E.: Phase I trial of homoharringtonine administered by prolonged continuous infusion. Cancer Res. 1986; 46:967-969.

36. Hsu B, Yang JL.: Hydroxy camptothecin as an antitumor agent. In: Advances in Chinese Medicinal Materials Research, HM Chang, HW Yeung, WW Tso, A Koo (eds), World Scientific Press, Philadelphia.1984; pp 377-389.
- 37.. Legha SS, Keating M, Picket S.:Teniposide in squamous cell carcinoma of the cervix: A phase II trial of the Gynecological Oncology Group. Cancer Treat Repts.1987; 71: 873-874.
38. Han J: Traditional Chinese Medicine and the search for new antineoplastic drugs. J Ethnopharmacol. 1988; 24: 1-17.
39. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenchein NB.: Taxol: A unique antineoplastic agent with significant activity in advanced epithelial neoplas. Ann Intern Med. 1989; 111: 273-279.
40. Rowinsky EK, Donehower RC.: Taxol: Twenty Years Later, the Story Unfolds. J Nat Cancer Inst. 1991. 83: 1778-1781.
41. Holmes FA., Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Bazdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN. : Phase II of Taxol, an Active Drug in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. J Natl Cancer Inst. 1991 ; 83 : 1797-1805
42. Eisenhauer EA, Vermorken JB. : The Taxoids. Comparative Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential. Drugs 1998 ;55 :5-30.
43. Reichling J.: La producción de medicamentos herbolarios (Fitofármacos modernos). Simposio IMSS FARMASA SCHWABE 1. Fitofármacos/ed. Xavier Lozoya y Enrique Gómez- México: IMSS, 1997.pp 3-16.

44. Ziauddin M, Phansalkar N, Patki P, Diwanay S, Patwardhan B.: Studies on Immunomodulatory effects of Ashwagandha. *J Ethnopharmacology*. 1996; 50: 69-76.
45. Isibasi A.: Perspectives in Immunoregulation. The phytopharmaceuticals of the next century. Symposium IMSS-Farmasa Schwabe 3 / Xavier Lozoya, Enrique Gómez, Maggie Brunner (eds.) México: IMSS, 1999.pp 129-141
46. Fearon Dt, Locksley RM.: The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996; 272:60-66
47. Carrol MC, Prodeus P.: Linkage of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 19: 31-40
48. Gatele MK, Rezetti LM, et al.: The interleukin 12/interleukin-12 receptor system: role in normal and pathological immune response. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 495-521.
49. Puren AJ, Razheghi P, et al. Interleukin-19 enhances lipopolysaccharide-induced interferon- in human whole blood cultures. *J infect dis* 1998;178:1830-1834
50. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*. 1998; 179 (Supp 2): 294-304
51. Letreiro JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 137 -161.
52. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*. 1994; 8: 6-12
53. De Petre G. The concept of type-1 and type-2 helper T cell and their cytokine in humans. *Int Rev Immunol*. 1998; 16 (8-4):427-255.

54. Boon T, Cerottini J, Vanden EB, Vander BP, Van Pel A. Tumor antigen recognized by T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 1994; 12: 337-366.
55. Pardoll D. Cancer vaccines. *Trends in Pharm Sci.* 1993;14, 202-208
56. Rosenberg S. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncology.* 1992; 10: 180-199.
57. Rosenberg S. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunology Today.* 1997;18:175-182.
58. Labro MT.: Immunomodulation by Antibacterial Agents. Is it Clinically Relevant? *Drugs* 1993;45:319-328.
59. Wagner H.: Immunostimulants and Adaptogens from Plants. *Phytochemistry of Medicinal Plants.* Volume 29. Plenum Press. New York and London. 1995. pp 1-19.
60. Drews J.: The experimental and clinical use of immune-modulating drugs in the prophylaxis and treatment of infections. *Infection.* 1984; 12:157-166.
61. Salmon S E, Sartorelli A C.: Quimioterapia del cáncer. En *Farmacología Básica y Clínica de Katzung B G. Manual Moderno* 1996. 1005-1045 pp.
62. Wagner H, Farnsworth NR.: *Economic and Plant Research, Volume 6.* Academic Press Limited. 1994: 189-226.
63. Courreges MC, Benencia F, Massouh EJ, Coulombie FC. In vitro antiphagocytic effect of *Melia azedarach* leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells. *J. Ethnopharm* 1994; 43:135-140.
64. Baranov AI. Medicinal uses of *ginseng* and related plants in the Sovietic Union: recent trends in the Soviet literature. *J. Ethnopharm.* 1982;6:358-363.

65. Beuscher N, Scheit KH, Bodinet C, Kopanski L. Immunologisch aktive Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria*. *Planta Med* 1989; 55:358-363.
66. Xiao P-G, Xing S-T, Wang L-W. Immunological aspects of Chinese medicinal plants as antiageing drugs. *J Ethopharm.* 1993;38:167-175
67. Gabius HJ, Gabius S, Joshi SS, Koch B, Schroeder M, Manzke WM, 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
68. Ottendorfer D, Frevert J, Kaufman R, Beuscher N, Bodinet C, Msonthi JD, Marston A, Hostettman K. Enhancement of *in vitro* nonspecific immune functions by African plant extracts. *Phytother Res* 1994;8:383-390.
69. Zúñiga G, Huacuja L, Carranco A, Merchant H, Guzmán A. Effects of *Sedum oxipetalum* ethanol extracts on human/mice epididimal sperm: Motility, viability and structural changes. *Adv. Cont Deliv. Syst.* 1992; 8:221-231.
70. Domínguez XA. Techniques for flavonoids analysis *Phytochemistry Methods Frontiers.. Rev Latinoamer. De Quími. Spec. Supplem.* 1990; 90-131.
71. Gómez H, Acosta R, Ramos M, Alpuche J, González R, Rayón F. Radiosensibilidad de las células del linfoma murino L5178Y. *Arch. Invest Med. (Mex)* 1979;10:187.
72. Ramos M, Gómez H, Hernández J, Tapia G, Feria A. Ubicación de los antígenos tumorales en las células del linfoma murino L5178Y. *Arch Invest Med. (Mex)* 1980; 11:425.

73. Daneri N A, Del Toro A A, García V JC, Del Toro A S, Orbach A S, Bravo CA.: L5178Y lymphoma associated immunosuppression in Balb/c mice. *Biom Pharmacother* 1995; 49: 39-44.
74. Geran IR, Greengerg N H, Mc Donald MN, Schumacher AM, Abbot BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumours and other biological systems. *Can Chemother.Rep.*1972 Part 3 (2).
75. Villarreal ML, Alonso-Cortes D. Cytotoxic activity of some mexican plants used in tradicional medicine. *Fitoterapia* 1992; 63. 518-522.
76. Stossel TP.: Phagocytosis.. *N Eng J Med* 1974; 290:717.
77. Nayne FP, Bucana C, Sauder N, DeFabo CE. Mechanism of systemic immune suppression by UV irradiation in-vivo. *J Immunol* 1984;132:2408.
78. Naine SJ. Tolerance or hipersensitivity to 2,4-dinitrofluorobenzene. *J Invest Dermatol.* 1980;74:319.
79. Toews GB, Bergstresser PR, Wayne S, Sullivan S. Epidermal Langergans Cell Density Determines Wether Contact Hypersensitivity or unresponsiveness follows Skin Paiting With DNFB. *Immunol* 1980; 124:445.
80. Miller LE, Ludke HR, Peacock JE, Thomas RD. Lymphocyte Quantitation and Function. *Manual of Laboratory Immunology Second Editation.* (Eds) Lea & Febeger. Philadelphia, USA, 1991 p.p 75-96.
81. Nowell P C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*1960;20:462-467.

82. Hostettman K, Wolfender J-L, Rodríguez S. Rapid Detection and Subsequent Isolation of Bioactive Constituents of Crude Plant Extracts. *Review. Planta Med.* 1997;63:2-10.
83. Pathak D, Pathak K, Singla AK.: Flavonoids as medicinal agents- Recent advances. *Fitoterapia* 1991; 5:371-389.
85. Bader G, Plohmann B, Hiller K, Franz G.: Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells *in vitro* and hemolytical index. *Pharmazie.* 1996;6:414-417.
85. Bomford R, Stapleton M, Winsor S, Beesley JE, Jessup EA, Price KR, Fenwick GR. : Adjuvanticity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. *Vaccine* 1992 ; 10 : 572-577.
86. Tadokoro CE, Macedo MS, Abrahamsohn IA. : Saponin adjuvant primes for a dominant interleukin-10 production to ovalbumina and to *Trypanosoma cruzi* antigen. *Immunology* 1996 ; 89 : 368-374.
87. Puebla AM, Huacuja L, Rodríguez G, Villaseñor MM, Miranda ML, Celis A, Sandoval L.: Cytotoxic and Antitumour Activity from *Bursera fagaroides* Ethanol Extrac in Mice with L5178Y Lymphoma. *Phytotherapy Res.* 1998;12:545-548.
88. Orozco A, Zaitseva G, Chavez A, Arceta V, Puebla AM, Alfaro F, Zimina IV, Arion VY. Modulation of Immune Response of BALB/Mice Bearing Lymphoma L5178Y Treated with Bitter Yellow Juice of Aloe vera (L) *in vivo*. *Russian J of Immunology* 1999; 1: 44-50

89. Calabresi P y Chabner BA.: Agentes antineoplásicos. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica de Goodman y Gilman. Ed Med Panamericana 1991. 8ª Ed. Capítulo XII. 1197-1222 pp.

90. Handschumacher RE.: Farmacos Usados Para Producir Inmunosupresión. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica de Goodman y Gilman. Editorial Médica Panamericana 8ª Ed.1991. Capítulo XIII.1229-1230pp.

91. Aliprantis AO, Diez-Roux G, Mulder L CF, Zychling A, Lang RA.:Do macrophages kill through apoptosis? Immunol Today Review.1996; 17: 573-576.

BIBLIOTECA CUORA