XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

3769

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

"ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CINCO PLANTAS UTILIZADAS EN MÉXICO PARA EL TRATAMIENTO DE ALTERACIONES PROLIFERATIVAS DE LA MÉDULA ÓSEA"

TESIS QUE PRESENTA:
RODOLFO VELASCO LEZAMA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIÓLOGICAS

Comité Tutorial:
Cotutor: Dr. J. Miguel Betancourt Rule
Cotutora: Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez

Asesor: Dr. Rubén Román Ramos

Julio de 2003.

"El Doctorado en Ciencias Biológicas

de la Universidad Autónoma Metropolitana

pertenece al Padrónde Posgrados de Excelencia del CONACyT

y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo,

con el convenio PFP-20-93"

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Rodolfo Velasco Lezama

El día 28 de julio del año 2003

Jurado:

Cotutores:

Dr. J. Miguel Betancourt Rule .....

Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez .....

Asesor:

Dr. Rubén Román Ramos .....

Sinodales:

Dra. Mariana Meckes Fischer .....

Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega .....

Dedicatorias

A mis padres por haberme educado en un ambiente de amor, respeto y libertad, particularmente a mi madre por enseñarme vividamente el significado de la justicia y solidaridad.

A mi hermana, sobrinos y primos por su calidad humana.

A la memoria de mi hermana Malena y mi primo Ricardo, ausencias siempre presentes en mi vida.

A mis amigos.

A mis compañeros de la UAM, especialmente a los del Laboratorio del Hematología Experimental.

A mis alumnos y a los jóvenes en general por sus enseñanzas involuntarias.

A los amores que se han de mi vida o de la vida

Agradecimientos

A los miembros del jurado por su desinteresada y comprometida revisión de la tesis, lo que contribuyó a mejorar la presentación del trabajo.

Al Dr. Alexander Nakeff de la Universidad Estatal de Wayne en Detroit, Michigan por sus valiosas enseñanzas y amistad.

A la Maestra Diana Garza por contribuir diligentemente a mi formación profesional.

RESUMEN

En la medicina tradicional mexicana las especies vegetales *Solanum torvum, Smilax aristolochiafolia, Plantago major, Anemopsis californica* y *Amphypterigyum adstringens* se utilizan empíricamente como agentes antitumorales, antimicrobianos y antianémicos. Para el presente trabajo se obtuvieron los extractos de las plantas con agua, metanol, cloroformo y hexano mediante calentamiento a temperatura de reflujo durante 3 horas. Alícuotas de 0.1 ml de las diluciones de 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 g/mL de los extractos se adicionaron a cultivos de células de médula ósea y de bazo de ratones macho de la cepa CD_1 de 8 a 12 semanas de edad. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 horas. El número de células fue determinado en hemocitómetro. Las dosis de 0.4, 0.2 y 0.05 g/mL del extracto acuoso de cada planta y el extracto metanólico de *S. aristolochiaefolia* fueron administrados oralmente a sendos grupos de 10 ratones (una dosis diaria durante tres días consecutivos), se utilizó un grupo control que recibió solución salina fisiológica. Después de 48 horas se contaron los eritrocitos, leucocitos, plaquetas y células nucleadas de la médula ósea femoral. Simultáneamente, se estableció un modelo para la inducción experimental de anemia aplástica en ratones mediante la inyección de benceno por vía subcutánea. Se emplearon ratones CD_1 de 8 a 12 semanas de edad distribuidos en los grupos A1, B1, C1 y D1, A2, B2, C2 y D2 con 15 ratones cada uno. A los grupos A1, B1 y C1 se les inyectó benceno (2 ml/kg) diluido V/V)/ con aceite de maíz. El benceno se administró diariamente de lunes a viernes (primer esquema de

inducción) hasta completar 10, 15 y 20 dosis, respectivamente. A los ratones de los grupos A2, B2 y C2 se les inyectó el benceno tres días alternados con dos de descanso a la semana (segundo esquema de inducción) hasta llegar a las 10, 15 y 20 dosis, respectiva-mente. Los grupos D1 y D2 fueron testigos y recibieron por la misma vía y calendario el aceite de maíz. Dos días después de la última inoculación, los ratones se sangraron y sacrificaron y se les realizó una citometría hemática. También se analizó la celularidad de la médula ósea y la histopatología del bazo.

Todos los extractos acuosos estimularon la proliferación de células de médula ósea y del bazo incrementando la concentración celular de 1.43 a 2.9 y de 1.6 a 8.6 veces, respectivamente ($p<0.001$). Los extractos metanólicos de *P. mayor, S. torvum* y *S. aristolochiaefolia* presentaron actividad hematopoyética similar o igual a sus correspondientes extractos acuosos. Los extractos metanólicos de *A. californica* y de *A. adstringens* no estimularon la proliferación de células de la médula ósea, sin embargo presentaron la mayor actividad hematopoyética en cultivo de células de bazo, incrementando 4.8 y 8.8 veces la cuenta de células, respectivamente. La concentración de 0.2 g/mL de los extractos clorofórmico y hexánico de *S. torvum* incrementó 3.0 y 4.0 veces la concentración de células de médula ósea, respectiva-mente. En los ensayos *in vivo* sólo se observó incremento en el número leucocitos con las dosis de 0.4, 0.2 y 0.05 g/mL de *S. torvum* y 0.2 g/mL de *A. adstringens* ($p<0.005$). Por otra parte, 70% de los ratones tratados con 0.05 g/mL del extracto acuoso de *A. californica* murieron antes de concluir el experimento, los ratones

sobrevivientes presentaron incremento en el número de plaquetas ($p<0.05$) y reducción aguda en la cuenta de células nucleadas de la médula ósea ($p<0.001$).

En la inducción de anemia aplástica, los ratones C1 y C2 presentaron baja en la concentración de eritrocitos y hemoglobina. Las cuentas de leucocitos y de células de la médula ósea disminuyeron 80% y 50% (C1) y 62% y 48% (C2), respectivamente y sólo el grupo C2 presentó trombocitopenia severa.

Ambos esquemas de tratamiento con benceno causaron anemia aplástica. Sin embargo, en los ratones tratados mediante el esquema uno, la anemia fue enmascarada por la toxicidad del bazo (grupo 1B). El esquema 2 permitió la sobrevivencia de los ratones y no produjo efectos secundarios que enmascaran el cuadro de la AA inducida.

SUMMARY

In Mexican traditional medical practice, the plant species *Solanum torvum, Smilax aristolochiaefolia, Plantago major, Anemopsis californica* and *Amphypterigyum adstringens* are empirically used as antitumoral, antimicrobial and antianemic agents. We obtained water, methanol, chloroform and hexane extracts of these plants by heating for 3 hours at reflux temperature. Dilutions of 0.4, 0.2, 0.1 and 0.05 g/mL were prepared and 0.1ml added to bone marrow and spleen cells of CD_1 strain male mice aged 8 to 12 weeks. Cell cultures were incubated at 37°C for 72 hours, and cells were counted using an hemocytometer. Aqueous extracts of each plant and methanolic extracts of *S. aristolochiaefolia* were administered orally at a single daily dosage of 0.4, 0.2 or 0.05 g/mL to groups of 10 mice. A control group received saline solution only. Forty eight hours after the last dose was administered, erythrocytes, leukocytes, platelets and nucleated bone marrow cells (femoral) were counted.

Simultaneously, an experimental model to induce aplastic anemia (AA) by benzene injection was established in CD_1 mice aged 8 to 12 weeks. Groups of 15 mice each were subjected two different AA induction schemes: 1) First scheme: 2 ml/kg benzene diluted in corn oil (V/V) was administered subcutaneously daily from Monday to Friday until a total of 10 (Group A1), 15 (Group B1) and 20 doses (Group C1) were completed; 2) Second induction scheme: 2 mg/kg benzene were administered by subcutaneous injection 3 days a week (Mo-Wed-Fri) until a total of

10 (Group A2), 15 (Group B2) and 20 doses (Group C2) were completed. Control groups (D1 and D2) received only corn oil using the route and schedule described for induction schemes 1 and 2, respectively. Two days after the last benzene dose was administered, the mice were bled and sacrificed. Blood cell counts, bone marrow cellularity and spleen histopathology studies were performed.

All aqueous extracts stimulated bone marrow and spleen cell proliferation, increasing cell concentrations from 1.43 to 2.9 and from 1.6 to 8.6 fold, respectively ($p<0.001$). *P. major, S. torvum* and *S. aristolochiaefolia* methanol extracts showed hematopoietic activitiy similar to that of their corresponding aqueous extracts. *A. californica* and *A. adstringens* methanol extracts did not stimulate bone marrow cell proliferation, but showed greater hematopoietic activity in spleen cells cultures, increasing cell counts 4.8 and 8.8 fold, respectively. Chloroform and hexane extracts of *S. torvum* (0.2 g/mL) increased the concentration of bone marrow cells 3.0 and 4.0 fold, respectively.

In vivo assays showed that only WBC counts increased with 0.4, 0.2 and 0.05 g/mL *S. torvum* and 0.2 g/mL. *A. adstringens* treatments ($p<0.05$). Moreover, 70% of the mice treated with 0.05 g/mL *A. californica* aqueous extract died before the experiment concluded, and surviving mice showed increased platelet counts ($p<0.05$) and an acute decrease of nucleated bone marrow cell counts ($p<0.001$).

.

In the AA-induction models, groups C1 and C2 showed lower erythrocyte and hemoglobin concentrations. C1 mice showed 80% and 50% decreases of leukocyte and bone marrow cell counts, respectively, while C2 mice showed 62% and 48% decreases, respectively. Severe thrombocytopenia was observed in group C2.

Both benzene treatment schemes induced AA. However, spleen toxicity masked the anemia in mice treated with scheme 1 (group 1B). Scheme 2 allowed mice survival, and caused no side effects.

CONTENIDO Página

INTRODUCCIÓN

Origen de las células hematopoyéticas 1

Características generales de la célula tallo hematopoyética 3

Diferenciación de la célula tallo hematopoyética y factores que regulan la hematopoyesis 5

Hematopoyesis normal y patológica 12

Anemia aplástica 12

Agentes etiológicos de la anemia aplástica 13

Patogenia 14

Tratamiento de la anemia aplástica 16

Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento de la anemia y de otras alteraciones hematológicas 20

Características generales de *Solanum torvum* Sw. 24

Características generales de *Smilax aristolochiaefolia* Miller. 26

Características generales de *Plantago major* L. 28

Características generales de *Anemopsis californica* Nutt. 30

Características generales de *Amphypterygium adstringens* Schl. 31

JUSTIFICACIÓN 34

HIPÓTESIS 37

OBJETIVO GENERAL 38

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39

DISEÑO EXPERIMENTAL 40

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta del material biológico 41

Preparación de los extractos 42

Ensayos *in vitro*

Cultivo de médula ósea de ratón 44

Cultivo de bazo de ratón 46

Ensayos *in vivo*

Determinación de las dosis tóxicas, dosis de trabajo
y esquemas de tratamiento 48

Evaluación de la actividad hematopoyética de las plantas *in vivo* 48

Inducción de anemia aplástica en ratones mediante la administración subcutánea de benceno.....50

RESULTADOS

Actividad hematopoyética de *Solanum torvum* Sw. *in vitro* 52

Determinación de las dosis tóxicas y de trabajo *in vivo* 56

Actividad hematopoyética de *Solanum torvum* Sw. *in vivo* 57

Actividad hematopoyética de *Smilax aristolochiaefolia* M. *in vitro* 59

Actividad hematopoyética de *Smilax aristolochiaefolia* M. *in vivo* 61

Actividad hematopoyética de *Plantago major* L. *in vitro*.....65

Actividad hematopoyética de *Plantago major* L. *in vivo*.....67

Actividad hematopoyética de *Anemopsis californica* N. *in vitro* 69

Actividad hematopoyética de *Anemopsis californica* N. *in vivo*.....72

Actividad hematopoyética de *Amphypterygium adstringens* Schl. *in vitro* 73

Actividad hematopoyética de *Amphypterygium adstringens* Schl. *in vivo* 76

Inducción de anemia aplástica en ratones mediante la administración subcutánea de benceno

Variación de peso corporal y de peso esplénico 78

Concentración de eritrocitos 79

Concentración de plaquetas 82

Concentración de leucocitos 83

Cuenta diferencial de leucocitos 84

Concentración de células nucleadas de la médula ósea 86

DISCUSIÓN 88

CONCLUSIONES 99

PERSPECTIVAS 101

BIBLIOGRAFÍA 102

Índice de figuras **Página**

1. Etapas de la hematopoyesis en el hombre y en algunas especies de roedores 10

2. Principales factores estimulantes de la hematopoyesis 11

3. Fotografía de las hojas y flores de *Solanum torvum* Sw 25

4. Fotografía de las hojas y frutos de *Smilax aristolochiaefolia* M 27

5. Fotografía de las hojas y espigas de *Plantago major* L 28

6. Fotografía de la flor y hojas de *Anemopsis californica* N 30

7. Fotografía de la corteza de *Amphypterygium adstringens* Schl 32

8. Diseño experimental 40

9. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. torvum* en cultivo de médula ósea de ratón 52

10. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de *S. torvum* en cultivo de médula ósea de ratón 53

11. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. torvum* en cultivo de bazo de ratón 54

12. Actividad hematopoyética de los extractos de *S. torvum* disueltos en aceite de maíz 56

13. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de médula ósea de ratón 59

14. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de médula ósea de ratón 60

15. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de bazo de ratón 61

16. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* sobre la producción de leucocitos *in vivo* 63

17. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* sobre la concentración de plaquetas 64

18. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *P. major* en cultivo de médula ósea de ratón 65

19. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de *P. major* en cultivo de médula ósea de ratón 66

20. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *P. major* en cultivo de bazo de ratón 67

21. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. californica* en cultivo de médula ósea de ratón 69

22. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de *A. californica* en cultivo de médula ósea de ratón 70

23. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. californica* en cultivo de bazo de ratón 71

24. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. adstringens* en cultivo de médula ósea de ratón 74

25 Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de *A. adstringens* en cultivo de médula ósea de ratón 74

26. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. adstringens* en cultivo de bazo de ratón 75

27. Concentración de eritrocitos en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración 79

28. Concentración de plaquetas en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración 82

29. Concentración de leucocitos en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración 83

30. Concentración de células nucleadas en la médula ósea de ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración 86

Índice de tablas **Página**

1. Propiedades biológicas de los factores de crecimiento y citocinas que regulan humoralmente la hematopoyesis 9

2. Valores de la citometría hemática en pacientes con anemia aplástica grave 15

3. Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento de la anemia aplástica y de otras alteraciones hematológicas 20

4. Partes de las plantas utilizadas en la preparación de los extractos ..42

5. Concentración de eritrocitos y de otros parámetros eritroides en ratones tratados con el extracto acuoso de *S. torvum* Sw 57

6. Efecto del extracto acuoso de *S. torvum* Sw. sobre la producción de plaquetas, leucocitos y células mieloides en ratones sanos 58

7. Concentración de eritrocitos, hemoglobina y hematócrito en ratones tratados con los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* 62

8. Efecto del extracto acuoso de *P. major* sobre la hematopoyesis de de ratón *in vivo* 68

9. Efecto del extracto acuoso de *A. californica* sobre la hematopoyesis de ratón *in vivo* 73

10. Efecto del extracto acuosos de *A. adstringens* sobre la hematopoyesis de ratón *in vivo* 76

11. Efecto de la administración subcutánea de benceno sobre la concentración de hemoglobina y de otros parámetros eritroides 81

12. Cuenta diferencial de ratones tratados con benceno mediante el esquema uno 84

13. Cuenta diferencial de ratones tratados con benceno mediante el esquema dos 85

ABREVIATURAS

AA	Anemia Aplástica
BHI	Infusión de Cerebro y Corazón
CD	Designación de Grupo (antígeno)
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EPO	Eritropoyetina
FECT	Factor Estimulante de Células Tallo
FEC-G	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
FEC-M	Factor Estimulante de Colonias de monocitos/ macrófagos
FEC-G/M	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
GFA	Glucoforina
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
IL	Interleucina
MEM	Medio Mínimo Esencial
SSF	Solución Salina Fisiológica
TPO	Trombopoyetina
UFCB-E/Meg.	Unidad Formadora de Colonias de Células en Brote de Eritrocitos y Megacariocitos
UFC-E	Unidad Formadora de Colonias de Eritrocitos
UFC-GEMM	Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Macrófagos y Megacariocitos
UFCT	Unidad Formadora de Colonias de Células Tallo

¡QUE PENA!

¡Que pena si este camino fuera de muchísimas leguas
y siempre se repitieran los mismos pueblos, las mismas
ventas, los mismos rebaños, las mismas recuas!

¡Que pena si esta vida tuviera, esta vida nuestra,
mil años de existencia!

¿Quién la haría hasta el fin llevadera?

¿Quién la soportaría toda sin protesta?

¿Quién lee diez siglos en la historia y no la cierra
al ver las mismas cosas siempre con distinta fecha?

Los mismos hombres, las mismas guerras,
los mismos tiranos, las mismas cadenas,
los mismos farsantes, las mismas sectas
¡y los mismos, los mismos poetas!

¡Que pena que sea así todo siempre,
siempre así de la misma manera!

León Felipe

INTRODUCCIÓN

Origen de las células hematopoyéticas

La hematopoyesis es el proceso complejo y dinámico que da origen a las células sanguíneas a partir de la célula precursora totipotencial llamada célula tallo (stem). Debido a la vida media relativamente corta de las células sanguíneas, este sistema requiere de renovación continua para mantener constante la concentración de las células y plaquetas de la sangre a lo largo de la vida del individuo (1).

En el hombre la hematopoyesis se inicia en las primeras semanas del desarrollo embrionario, las células tallo se localizan inicialmente en sitios mesodérmicos dentro del embrión (región de la aorta dorsal y placa lateral del mesénquima) y fuera del embrión (el saco vitelino), en éste, las células tallo se diferencian en eritrocitos nucleados con hemoglobina embrionaria y colonias primitivas de granulocitos-macrófagos. A partir del primer mes de gestación y hasta el noveno, las células tallo hematopoyéticas migran al hígado fetal a través del sistema vascular en desarrollo; entre el segundo y el séptimo mes, la hematopoyesis se desplaza al bazo en donde se amplifica la capacidad de expresión de la célula tallo. En el bazo se encuentran por primera vez las células precursoras de todas las estirpes de la sangre circulante (2).

Finalmente, las células tallo se establecen en la médula ósea, la cual se mantiene como el órgano hematopoyético primario en la vida postnatal, principalmente en los huesos largos, esternón, costillas, cresta ilíaca y vértebras (3). Con el crecimiento del individuo la hematopoyesis en los huesos largos queda restringida a las epífisis, ya que en el resto del hueso la médula ósea hematopoyética (médula roja) es substituida por tejido graso denominado médula amarilla, mientras que los otros sitios se mantienen como productores activos de células hematopoyéticas (4).

La médula ósea provee un estroma celular compuesto por células no hematopoyéticas; fibroblastos, endoteliales, osteoblastos y osteoclastos, células dendríticas, adipocitos, etc, que junto con productos como las citocinas, factores de crecimiento, colágena, fibronectina, trombospondina, homeonectina y moléculas de adhesión constituyen el microambiente de la médula ósea que apoya la proliferación y diferenciación de la célula tallo hematopoyética pluripotencial (5).

Morrison y colaboradores (6) sugieren que las células tallo pluripotenciales se autorreplican en un microambiente primario para perpetuar su especie, después las réplicas lo abandonan mediante la interacción con células del estroma y moléculas de adhesión y llegan a un segundo microambiente en donde maduran gradualmente, pierden capacidad de autorreplicación, pero adquieren receptores membranales que les permiten responder a factores estimulantes de colonias y otras citocinas y se diferencian en precursores linfoides y mieloides. En el ambiente primario se forma

una célula precursora linfoide conocida como Unidad Formadora de Colonias de Linfocitos (UFC-L), que abandona la médula ósea para establecerse en órganos linfoides primarios (timo) y secundarios como el bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer, etc, donde se producen los linfocitos T y B.

Las células tallo que al diferenciarse se mantienen en la médula ósea, forman una estirpe denominada Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y Megacariocitos (UFC-GEMMeg.), la cual mediante la interacción con factores estimulantes de colonias, interleucinas y poyetinas específicas, se diferencia y madura para formar eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y plaquetas (7,8).

Características generales de la célula tallo hematopoyética

Se ha estimado que la concentración de las células tallo hematopoyéticas en condiciones estables (steady-state) es de una célula tallo por cada 10,000 células nucleadas de la médula ósea, lo cual en los primeros años de estudio dificultó su aislamiento e identificación (9).

Esta célula de apariencia linfoide es indistinguible morfológicamente de otras células de la médula ósea (10), sin embargo, mediante ensayos *in vivo* se ha puesto de manifiesto su existencia y multipotencialidad, como lo demostraron Till y McCulloch (11) al transplantar la médula ósea de ratones sanos a ratones irradiados

letalmente con rayos X. Estos autores reportaron que los ratones sobrevivientes desarrollaron placas blancas en el bazo 12 días después del transplante. La disección de dichas placas mostró que estaban constituidas por dos tipos predominantes de colonias celulares. El primero estaba formado por células hematopoyéticas diferenciadas hacia los distintos tipos celulares de la sangre y el segundo contenía cientos de células de un solo tipo, no relacionadas citoquímicamente con aquellas de la sangre y sus precursoras inmediatas. Schofield y Lajtha (12), Hasthorpe y Hodgson (13), demostraron que las células del segundo tipo de colonias al ser transplantadas en ratones irradiados, formaban a su vez los dos tipos de colonias mencionados anteriormente. De esta manera se estableció que la célula que da origen a estas colonias es la Unidad Formadora de Colonias (CFU-S) en el bazo y que cumple con los requerimientos de ser una célula tallo con capacidad de autorrenovación y diferenciación produciendo, por lo tanto, colonias de células diferenciadas y de células no diferenciadas con multipotencialidad (14).

Mediante ensayos de replicación con timidina tritiada y de radio-protección, se descubrió que a diferencia de otras células de la médula ósea, la mayoría de las células tallo hematopoyéticas parecen estar en la fase Go del ciclo celular, por lo que se las llamó células quiescentes o en reposo (15,16). Sin embargo, recientemente se ha descrito que su ciclo celular es tan prolongado que semejan estar en fase Go, y sólo el 33% de estas células se replican en un tiempo más corto (18 horas), que es similar al ciclo celular promedio (20 horas) de otras células animales (17).

Con base en la duración del ciclo celular, la población de células tallo hematopoyéticas parece estar formada por al menos dos grupos principales. Uno con un periodo de replicación prolongado, con alta tasa de clonación, multipotencialidad, capacidad de diferenciación restringida, resistente a radiaciones y agentes quimio-terapéuticos y que al multiplicarse y repoblar la médula ósea, provoca las recaídas de los pacientes con leucemia (18). El segundo grupo lo forman células con características opuestas, son sensibles a los factores estimulantes de colonias y citocinas que las comprometen o reclutan para formar las células precursoras más primitivas de eritrocitos, granulocitos y plaquetas, son las células tallo responsables de mantener constante la concentración de células sanguíneas (19).

Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que las células tallo hematopoyéticas (CFU-S) humanas o de roedores, para la autorreplicación dependen del factor estimulante de células tallo (FECT), o steel factor, conocido también como *ligando c-kit,* el cual es producido por los fibroblastos y células del estroma medular (20).

Diferenciación de la célula tallo hematopoyética y factores humorales que regulan la hematopoyesis

Utilizando el sistema de geles plasmáticos y otros sistemas semisólidos, Nakeff y Daniels-McQueen (21), Burgess y colaboradores (22), Nakeff y Velasco (23), Metcalf (24) y otros investigadores cultivaron médula ósea completa estimulada con el suero o la orina de pacientes anémicos o de animales con anemia inducida, y

lograron la diferenciación de la célula tallo hacia las líneas de eritrocitos, granulocitos macrófagos o de megacariocitos, lo que permitió conocer las etapas de maduración de cada estirpe celular, así como los factores humorales que estimulan específicamente a cada línea celular. A las substancias responsables de la actividad hematopoyética de estos fluidos se les llamó Factor o Actividad Estimulante de Colonias (FEC), mismos que después fueron aislados y caracterizados del sobrenadante (medio condicionado) del cultivo primario de linfocitos (25,26), de líneas celulares normales o transformadas de origen humano o animal (27,28,29,30).

In vivo la proliferación de la célula tallo hematopoyética y de las células precursoras (comisionadas) es controlada por moléculas de tipo hormonal que inducen el desarrollo y diferenciación. Estas moléculas son producidas por células estromales del microambiente de la médula ósea y por células hematopoyéticas, y pueden actuar localmente o sistemáticamente a través de la circulación (31).

Los factores de crecimiento hematopoyético son glicoproteínas que además de estar involucradas en la autorrenovación, diferenciación y proliferación de células comisionadas, también afectan la función de las células maduras. Son responsables del incremento de leucocitos en respuesta a una infección, de los eritrocitos en casos de anemia y de plaquetas después de una trombocitopenia. Varios de ellos son conocidos como **Factores Estimulantes de Colonias** (FEC), ya que *in vitro* estimulan la formación de colonias de células progenitoras. Se les añade la letra inicial del nombre de la línea celular que estimulan por ejemplo, FEC-G para la de

granulocitos, FEC-E para la de eritrocitos, etc; algunos de ellos estimulan más de una línea celular como el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (32,33). Actualmente, se conoce que algunos de ellos tienen un intervalo de acción tan amplio que se sobreponen con la actividad de otros.

La trombopoyetina (TPO, o ligando c-Mpl) es una glicoproteína con alguna homología a la eritropoyetina (EPO), estimula la proliferación de megacariocitos, incrementa marcadamente la producción de plaquetas, (34,35) y en condiciones de hipoxia aguda u otra condición de estrés estimula también a los eritrocitos. En contraposición, la EPO que estimula específicamente la producción de eritrocitos, también promueve, en forma secundaria, la producción de plaquetas (36,37).

En ensayos *in vitro* se descubrió que las líneas eritroide y megacariocítica tienen dos tipos de células precursoras formadoras de colonias. La primera que se desarrolla entre los 2 y 7 días de cultivo para las colonias de eritrocitos y de megacariocitos (UFC-E, UFC-Meg.), respectivamente, cuyas colonias están formadas por grupos de 1 a 50 células grandes, identificables morfológica y citoquímicamente (38). El segundo tipo de células progenitoras es conocido como Unidad Formadora de Colonias de Células en Brote (UFCB). Son células que tienen un ciclo celular más prolongado que la UFC, pero con mayor capacidad de multiplicación; las colonias se desarrollan a los 14 días de incubación y están constituidas por grupos de 50-500 células pequeñas, identificables inmunológicamente por sus marcadores membranales (39,40).

Otro grupo de glicoproteínas que participan en la regulación humoral de la hematopoyesis son las citocinas conocidas genéricamente como interleucinas (IL), las cuales actúan en forma sinérgica con los factores estimulantes de colonias, potenciándose la actividad de ambos (41,42,43,44).

En la tabla 1 se muestran la fuente de producción, células blanco y efecto sobre la hematopoyesis y en las figuras 1 y 2 las etapas de autorreplicación, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas y los factores humorales que regulan la hematopoyesis.

TABLA 1

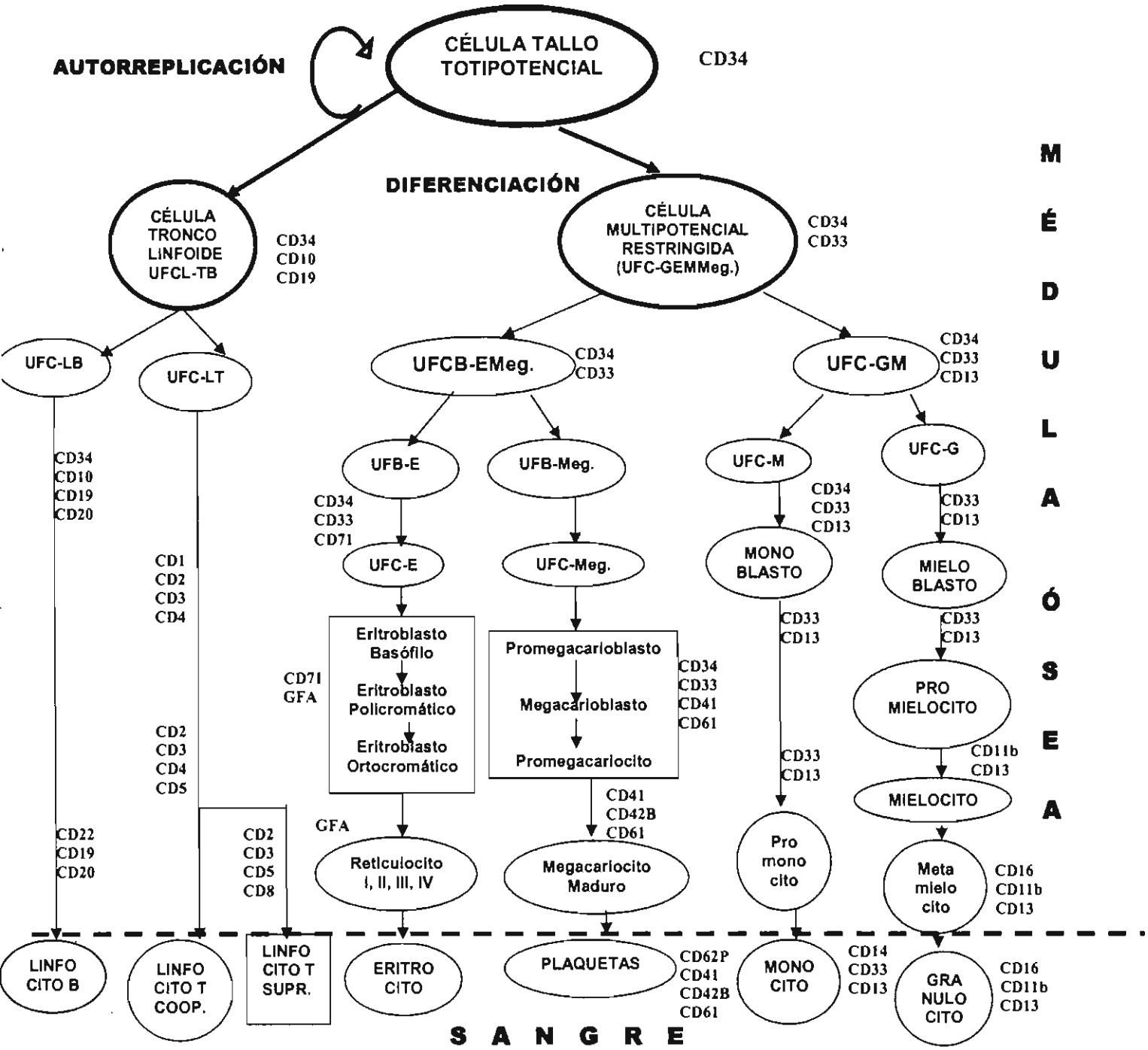
Propiedades biológicas de los factores de crecimiento y citocinas que regulan humoralmente la hematopoyesis

Factor o Citocina	Peso Molecular (Daltones)	Células Productoras	Células Blanco	Funciones Principales
FECT	20,000-35,000	Células estromales, hepáticas y fibroblastos	Tallo multipotenciales, mieloides, linfoides y precursoras eritroides	Proliferación de células tallo, linfocitos tempranos, mastocitos y precursores mieloides
FEC-GM	14,000-35,000	Células estromales, linfocitos T, mastocitos	Precursoras hematopoyéticas, granulocitos maduros y monocitos	Hematopoyesis temprana, granulopoyesis, formación y función de monocitos
FEC-G	18,000	Células estromales, macrófagos, monocitos	Precursores granulocíticos y granulocitos maduros.	Hematopoyesis temprana, producción y función de granulocitos
FEC-M	40,000-70,000	Células estromales, macrófagos, monocitos	Precursores monocíticos y monocitos	Producción y función de monocitos
EPO	34,000-39,000	Hígado, riñón	Precursores eritroides (UFCB-E, UFC-E), etapas de eritroblasto a reticulocitos	Factor de crecimiento para eritrocitos
TPO	35,000	Hígado, riñón	Células tallo, UFCB-E, megacariocitos	Desarrollo de megacariocitos y plaquetas
IL-2	15,000	Linfocitos T	Linfocitos T y B	Factor de crecimiento de linfocitos T
IL-3	28,000	Linfocitos T	Células tallo y células comisionadas	Factor de crecimiento hematopoyético
IL-5	40,000-50,000	Células T y mastocitos	Eosinófilos	Crecimiento y diferenciación de eosinófilos
IL-6	21,000-28,000	Fibroblastos, células T, macrófagos, células somáticas	Linfocitos B, megacariocitos	Producción de inmunoglobulinas y de proteínas plaquetarias
FNTα	17.500	Macrófagos, células somáticas, linfocitos T y B	Muchos tipos de células	Producción secundaria de citocinas por las células estromales

FECT = Factor Estimulante de Células Tallo Hematopoyéticas; FEC-M = Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos; FEC-G = Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos; FEC-GM Factor estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos; EPO = Eritropoyetina; TPO = Trombopoyetina; IL = Interleucina; FNT = Factor de Necrosis Tumoral

Figura 1

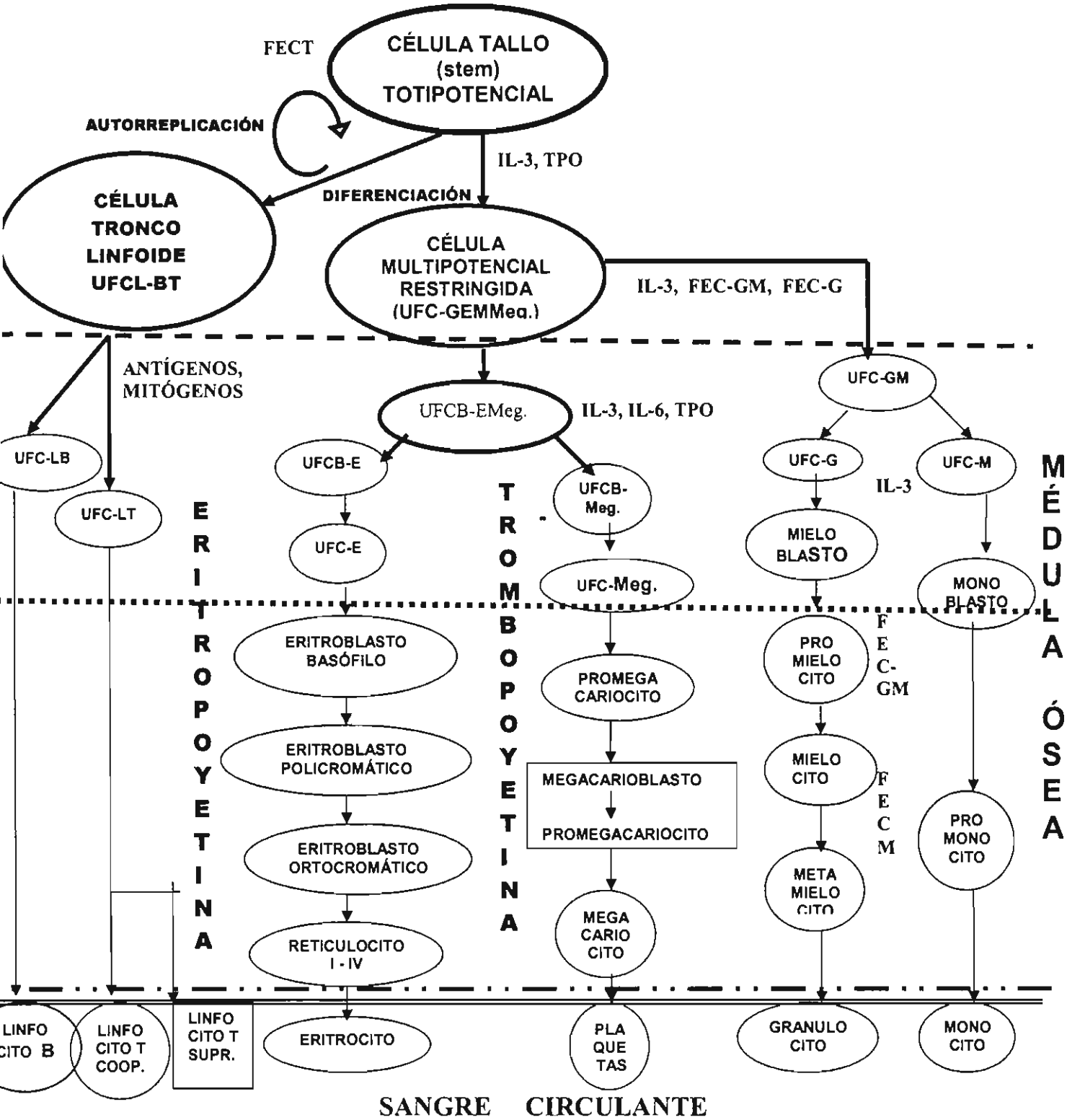
ETAPAS DE LA HEMATOPOYESIS EN EL HOMBRE Y EN ALGUNAS ESPECIES DE ROEDORES



UFCB = Unidad Formadora de Colonias de Células en Brote; UFC = Unidad Formadora de Colonias; CD = Designación de Grupo (cluster designation) es un marcador de diferenciación celular; GFA = Glucoforina A; Coop. = Cooperador; Supr. = Supresor.

Figura 2

PRINCIPALES FACTORES ESTIMULANTES DE LA HEMATOPOYESIS



UFCB = Unidad Formadora de Colonias de Células en Brote; UFC = Unidad Formadora de Colonias; FECT = Factor Estimulante de Células Tallo; FEC = Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos (GM); Monocitos (M);Granulocitos (G); IL= Interleucina; EPO = Eritropoyetina; TPO = Trombopoyetina.

Poza de células multipotenciales con tasa de replicación limitada

Poza de células comprometidas o comisionadas altamente replicativas

Poza de células madurantes sin potencialidad y con capacidad de replicación limitada

Hematopoyesis normal y patológica

Las células hematopoyéticas de la médula ósea se ubican en tres grandes pozas (Figura 1), la primera constituida por células pluripotenciales con capacidad de autorreplicación o de diferenciación, la segunda poza contiene células comprometidas con una o más líneas celulares con amplia capacidad de multiplicación y la tercera poza con células en vías de maduración, sin capacidad replicativa. Este sistema complejo (Figura 2) puede ser modificado en sus diferentes niveles de producción (pozas celulares) por agentes infecciosos, físicos y químicos, estos últimos como resultado del control o uso inadecuado de substancias tóxicas o potencialmente tóxicas para la médula ósea, lo que provoca alteraciones proliferativas graves como la anemia aplástica o la alteración opuesta -la leucemia- descrita como una enfermedad maligna del tejido hematopoyético y caracterizada por el reemplazamiento de elementos normales de la médula ósea por células anormales (neoplásicas) en la sangre (45,46).

Anemia Aplástica

La anemia aplástica (AA) se manifiesta como una baja generalizada en la concentración de células sanguíneas (pancitopenia), causada por hipoplasia de la médula ósea en ausencia de enfermedad maligna mieloproliferativa. En la mayoría

de los casos, la actividad hematopoyética queda restringida a pequeños islotes sanguíneos limitados por tejido adiposo (47), causando una disminución acentuada en la concentración de células en sangre y consecuentemente, deficiencia en los mecanismos de defensa inmunitarios específicos e inespecíficos del individuo, lo que hace al paciente susceptible al desarrollo de infecciones o neoplasias que pueden causarle la muerte. No obstante que la incidencia de esta enfermedad es baja, su importancia estriba en que es de pronóstico fatal *per se* y porque puede derivar en leucemia aguda no linfoide (48).

Agentes etiológicos de la anemia aplástica

La AA puede ser congénita o adquirida, en la mitad de los casos de la forma adquirida no se le puede relacionar con una causa desencadenante específica, aunque en el 33% del total de los pacientes parece estar ligada a la exposición de las células tallo hematopoyéticas a drogas o toxinas. Clínicamente se ha demostrado que el desarrollo de anemia aplástica en el hombre está asociado con la utilización de cloranfenicol, fenilbutazona, oxibutazona, atebrina, sulfonamidas, algunos anticonvulsivantes, insecticidas (49,50,51) y benceno (52). Experimentalmente, se ha demostrado que el benceno causa anemia aplástica en diferentes especies animales de laboratorio, aunque se desconoce con precisión el mecanismo y nivel de acción de dicho compuesto (53,54). Las drogas citotóxicas como la ciclofosfamida y el busulfán únicamente causan anemia aplástica en individuos altamente sensibles, mientras que en los menos sensibles sólo inducen neutropenia o trombocitopenia

selectivas (55). La AA también es causada por radiaciones o infecciones, particularmente la hepatitis viral A y la hepatitis viral C (56).

Patogenia

Las alteraciones que desencadena la AA pueden ser resultado de anormalidades en por lo menos cuatro niveles distintos de funcionamiento de las células tallo pluripotenciales del tejido hematopoyético (57).

1. Disminución en el número de células tallo, alargamiento o detenimiento del ciclo celular o aumento en la tasa de muerte celular programada (apoptosis).

2. Irregularidades en el microambiente de la médula ósea que sirve de soporte para la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

3. Función inadecuada de los reguladores celulares de la hematopoyesis (linfocitos T y sus linfocinas).

4. Inhibición inmunológica de la hematopoyesis, debida a alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune que reconoce lo propio como ajeno.

Considerando la celularidad de la médula ósea, el grupo internacional para el estudio de la anemia aplástica ha clasificado esta enfermedad como grave, moderada o leve (58), siendo la primera forma la más frecuente y la más agresiva. En la tabla 2 se presenta la cuenta de células sanguíneas representativa de los pacientes con AA grave versus los valores de referencia en adultos sanos (59,60).

Tabla 2

Valores de la citometría hemática en pacientes con AA grave

Determinación	Anemia Aplástica	*Valores de Referencia Mujeres	Hombres
Hemoglobina (Hb) g/dL	6.2	12-16	14-18
Eritrocitos X 10^{12}/L	2.0	4.2-5.4	4.5-6.2
Hematócrito %	22	38-46	42-54
Vol. Corpuscular Medio fL	110	84-99	
Conc. Media de Hb Corpuscular pg	31	26-32	
Reticulocitos %	0.1	0.5-2	
Leucocitos X10^9/L	0.9	4.5-10.5	
Neutrófilos %	13	47-77	
Eosinófilos %	0	0-7	
Basófilos %	0	0-2	
Monocitos %	21	0-9	
Linfocitos %	66	16-44	
Plaquetas X10^9/L	5	15-45	

***Valores de referencia a 760 mmHg**

La AA adquirida puede presentarse a cualquier edad, pero con mayor incidencia alrededor de los 30 años, con ligero predominio en el varón, se manifiesta

en forma aguda o insidiosa como anemia, neutropenia o trombocitopenia. El paciente puede presentar hematomas, epistaxis, gingivorragias, púrpura cutánea, sangrados a nivel digestivo, urinario, muscular y del sistema nervioso central, siendo este último el de mayor gravedad y el que más frecuentemente acaba con la vida del paciente (61). Como consecuencia de la leucopenia (neutropenia), los pacientes presentan infecciones en la faringe, pulmones, recto, vías urinarias y piel, causadas principalmente por bacterias gram negativas y hongos oportunistas (62).

Tratamiento de la anemia aplástica

Con el propósito de restablecer la hematopoyesis, en la medicina moderna el tratamiento de la AA se centra en tres objetivos principales:

1. **Identificación, evaluación y eliminación de los agentes etiológicos**

   En los casos moderados o leves la hematopoyesis puede restaurarse después de eliminar la exposición al agente desencadenante.

2. **Terapia de apoyo**

   Se aplica cuando los signos y complicaciones de la enfermedad se correlacionan con la baja en el número de eritrocitos, plaquetas o leucocitos en la sangre periférica. El manejo es mediante la transfusión de paquetes de sangre total o de concentrados celulares específicos. Este tratamiento no es curativo, pero permite al paciente atacar las infecciones y evitar los sangrados que podrían

incluso causarle la muerte. Esta terapia tiene efectos secundarios, ya que el sistema inmune del paciente se sensibiliza y después de varias transfusiones puede presentar rechazo inmunológico a las células transfundidas o de éstas a las del paciente (63).

3. Restauración de la hematopoyesis normal

La sobreviviencia de los pacientes con AA depende de su capacidad para restablecer la hematopoyesis mediante terapias más específicas, que promueven el funcionamiento normal de la médula ósea. Para tal propósito se dan los siguientes tratamientos (64):

Globulina anti-linfocito (GAL)

Ciclosporina

Glucocorticoides

Andrógenos

Factores de crecimiento hematopoyético;

FEC-GM, FEC-G (65),

IL-3 (66,67),

EPO, TPO (68)

Ninguno de estos tratamientos ofrece por si sólo una alternativa para la regeneración definitiva de la hematopoyesis, por lo que en la mayoría de los casos

se emplea la combinación de medicamentos con resultados alentadores, pero con algunos efectos colaterales. En los casos de AA con mayor resistencia a los tratamientos se recurre a la esplenectomía, quimioterapia, radioterapia y más recientemente al transplante de médula ósea (50).

Transplante de médula ósea

El transplante de médula ósea está indicado en pacientes jóvenes (menores de 20 años) y es aplicado en casos de AA severa con concentración de neutrófilos menor a 0.2 X 10^9/L que han presentado infecciones recurrentes, ya que ambas condiciones amenazan su vida. El transplante de médula puede ser singénico, alogénico y autólogo. El transplante singénico se realiza en pacientes cuyo donador es gemelo idéntico, con alta similitud en los antígenos HLA (Human Leukocyte Antigens) de las clases I y II. En el transplante de médula ósea alogénico el donador puede ser un pariente (hermano, padre, madre, primo) por su similitud en los antígenos HLA, en estos casos la sobrevivencia es del 70 al 80% (69).

Para el transplante autólogo se administran al paciente drogas citotóxicas que matan a las células mieloides y sanguíneas, obligando la salida de las células tallo de la médula ósea a la sangre circulante (movilización) de donde son recolectadas, cultivadas y después reinfundidas al paciente, con lo que se elimina el rechazo inmunológico y las complicaciones que se presentan en los otros tipos de transplante (70,71).

Recientemente se ha utilizado la sangre del cordón umbilical como fuente de células tallo por ser rico en células hematopoyéticas indiferenciadas (72,73,74,75). Sin embargo, a pesar del avance en el tratamiento la AA en México y en los demás países en desarrollo, el transplante de médula ósea por su tecnología y alto costo es inaccesible para la mayoría de los enfermos, por lo que la anemia aplástica aún hoy en nuestro país es causa de muerte en los adultos que la padecen.

Como una alternativa de uso popular para tratar estos padecimientos, la población mexicana utiliza plantas con posibilidades curativas para la anemia aplástica. Este recurso aún no se ha explorado en forma dirigida como fuente potencial de agentes hematopoyéticos.

Para el presente trabajo se consultaron libros que recogen el conocimiento popular de medicina herbolaria, mediante entrevistas con curanderos y médicos tradicionales. En algunos libros se mencionan compuestos aislados de las plantas y sus propiedades farmacológicas determinadas experimentalmente. En la tabla siguiente se muestran las plantas que de acuerdo con estas fuentes bibliográficas, se emplean en México para tratar la anemia, para purificar y para engrosar la sangre, algunas son mencionadas para combatir el cáncer y la leucemia. Sin embargo, es importante advertir que los conceptos de anemia y cáncer que se manejan en la medicina popular, no necesariamente corresponden con los que se emplean en la medicina moderna.

TABLA 3

ALGUNAS PLANTAS UTILIZADAS EN MÉXICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ANEMIA Y DE OTRAS ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE (S) COMÚN (ES)	USOS	PREPARACIÓN/ VÍA DE ADMÓN.	REF.
Agave salmiana	Maguey	Anemia, cáncer	Agua miel/ Oral	76,82
Amphypterygium adstringens	Cuachalalate, cuachalalá volador	Cáncer de estómago e intestino, úlcera gástrica, purificar la sangre, escoriaciones bucales	Corteza cocida o remojada/ Oral	77,78, 81
Anagallis arvensis	Cenicilla, hierba de la hinchazón, ojo de gallo	Purificar la sangre, mal de orín, dolor de estómago	Cocimiento de flores, hojas o tallos/ Oral	77,82
Anemopsis californica	Yerba mansa, hierba del manso	Anemia, cáncer	Infusión de Hojas/ Oral	77
Bacopa chamaedryoides	Chotete, quina, malva de quebranto	Anemia, malaria, dolor de estómago	No se indica	82
Beta vulgaris	Betabel	Anemia	Raíz licuada/ oral	77
Bidens alba	Mozote	Aumentar la sangre	Sin indicar	77,82
Bocconia frutescens	Gordolobo, llorasangre	Anemia	Decocción de hojas/ Oral	77
Brickellia lanata	Sanguinaria	Purificar la sangre	Cocción de toda la planta/ Oral	77
Buettneria aculeata .	Arrendador, varilla prieta, zarza, Xtesak	Depurativo como la zarzaparrilla	Raíz/ sin especificar	78
Calea zacatechichi	Prodigiosa, hierba amarga	Engrosar la sangre	Ramas hervidas/ Oral	77

Casimiroa edulis	Zapote blanco	Anemia	Hojas hervidas/ Oral	77
Castilleja arvensis	Garañona, jilotillo	Fertilidad, purificar la sangre	Sin especificar	77
Ceanothus buxifolius	Guasapol, su´ dalgan	Engrosar la sangre	Cocimiento de la raíz/ Oral	77
Croton drago	Sangre grado, sangre de grado	Purificar la sangre	Látex/ sin especificar	77
Curatella americana	Rasca la vieja, raspa viejo, tlachicón, cacaito	Purificar la sangre	Corteza macerada	78
Cuscuta sp	Zacapol, sopita de fideo, zacapole	Anemia	Toda la planta/ sin especificar	77
Equisetum robustum	Cola de caballo, carricillo	Anemia	Infusión de hojas/ Oral	77
Euphorbia sp	Hierba de la golondrina, riñonina	Anemia, flujo menstrual, hemostático	Infusión de hojas/ Oral	77,82
Gaultería trichocalycina	Olivo, tepeizque, aj-te-es (totzil)	Aumentar la sangre	Ramas hervidas/ Oral	77
Haematoxylum brasiletto	Palo Brasil, palo campeche	Regular la circulación sanguínea, renovar la sangre	Tecata remojada/ Oral	77,81
Justicia spicigera	Muitle, muicle, muitl	Cáncer, anemia	Cocimiento de las hojas o de toda la planta	77

Karwinskia latifolia	Margarita	Purificar la sangre	Cocimiento de hojas/ Oral	78
Marrubium vulgare	Manrrubio	Diabetes, purificar la sangre, cólicos, tónico	Cocimiento de las hojas o de toda la planta/ Oral	77,82
Microgramma nitida	Lengua de ciervo	Purificar la sangre, hígado	Hojas y ramas hervidas/ Oral	77
Momordica charantia	Amargosa, cundeamor	Anemia, debilidad, fortalecer la sangre	Sin indicar	77
Pilea pubescens	Chichicastle, mala mujer	Cáncer, anemia	Cocción de toda la planta para cáncer, fresca para la anemia	77
Pityrogramma polylepsis	Lengua de ciervo, caliguala	Fortalecer la sangre, gonorrea	Decocción del rizoma/ Oral y lavados	77
Plantago major	Lantén, antén, llantén, lante sábila	Cáncer, diabetes, antipirético, infección intestinal, purificar la sangre, cicatrizante, astringente, hemostático, principios de cáncer, quemaduras	Infusión o cocimiento de hojas o de las partes aéreas/ Oral o emplasto de la hoja para cicatrizar y en quemaduras	76,77, 82
Polygonum aviculare	Sanguinaria, sangrilla	Producción de sangre	Cocimiento de la planta/ Oral	77
Polypodium lanceolatum	Lengua de ciervo, manenepeli	Purificar la sangre	Cocimiento de las frondas	78
Portulaca sp	Sanguinaria	Enfermedades de la sangre	Cocimiento de la planta/ Oral	78
Rhus microphylla	Agritos	Leucemia	La infusión de la planta para el tratamiento de leucemia/ Oral	79

Serjania racemosa	Bejuco de tres corazones, nueve hojas	Diabetes, purificar la sangre	Bejuco hervido/ Oral	77
Smilax aristolochiaefolia	Zarzaparrilla, mecapatli, ko-keb-ak.	Purificar la sangre, depurativa en lepra, eczema, ronchas, sudorífero	Decocción de la raíz/ Oral	78,81, 82
Solanum nigrum	Hierba mora, quelite	Anemia, depurativo	Hojas hervidas/ Oral	77,82
Solanum torvum	Hierba sosa	Cáncer, leucemia, linfoma	Hojas en cocimiento/ Oral	80
Sonchus oleraceus	Lechuguilla, chicoria	Anemia, sangrados	Infusión de ramas/ Oral	77

Con base en la bibliografía consultada, incluyendo los bancos de datos de DUKE y el NAPRALERT de la Universidad de Illinois en Chicago, se seleccionaron para la realización del trabajo: *Solanum torvum*, *Smilax aristolochiaefolia, Plantago major*, *Anemopsis californica* y *Amphypterygium adstringens*; por ser plantas frecuentemente citadas y utilizadas popularmente en México para el tratamiento de la anemia y porque no existen antecedentes de su estudio científico en relación con sus propiedades hematopoyéticas. De la entrevista con los colectores y usuarios de las planta seleccionadas se conoce que algunas de ellas son efectivas para combatir la anemia.

El criterio para seleccionar las plantas por estudiar, fue que en la medicina popular se utilizaran para "engrosar la sangre, renovar o fortalecer la sangre", se

excluyeron las plantas descritas como desintoxicantes o clarificadoras de la sangre, ya que estos términos están asociados más con sus propiedades diuréticas que hematopoyéticas de las plantas.

Características generales de *Solanum torvum Sw.*

Es un arbusto silvestre espinoso de la familia Solanaceae, es originario de México, Centroamérica y Norte de Sudamérica, alcanza hasta cuatro metros de altura, presenta hojas con espinas en el haz y en el envés, característica que lo diferencia de otras especies del género *Solanum*; muestra además flores blancas y frutos globosos amarillos. En México esta planta habita en climas cálidos y semicálidos, principalmente en los estados de Chiapas, Morelos, Oaxaca, Veracruz y San Luis Potosí. Popularmente se le conoce como berenjena, lavaplatos, hierba sosa, berenjena con espinas, lampazo y sosa morada.

La infusión o el cocimiento de la raíz se usa por vía oral contra el mal de orín y reumatismo, y en forma de baños para tratar infecciones y heridas en la piel. Las hojas tostadas se colocan sobre la piel quemada y para resolver granos (Veracruz). La infusión de las hojas se recomienda contra el dolor de cabeza, de muelas o del estómago, también se ingiere para recuperar la sangre cuando se presenta hemorragia vaginal fuera del ciclo menstrual (83).

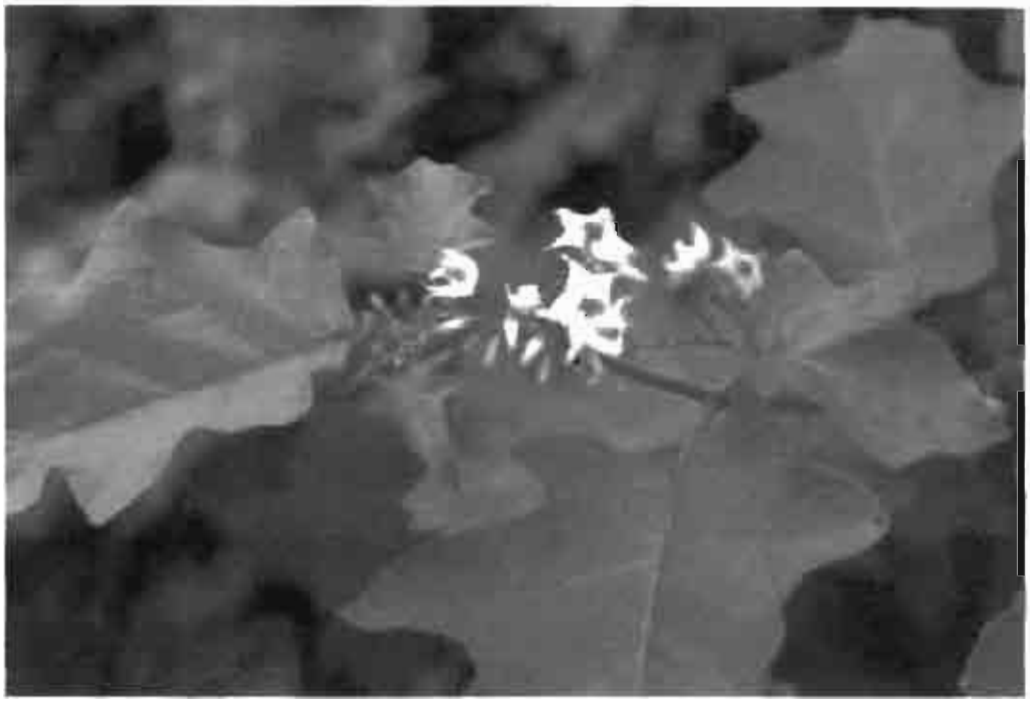


Figura 3. Fotografía de las Hojas y flores de *Solanun torvum* (Hierba Sosa)

Experimentalmente, se ha demostrado que una preparación etanólica de las partes aéreas tiene efecto antiespasmódico en íleon de cobayo, es anticonvulsivante y depresora del sistema nervioso central en los ratones (84).

Los estudios químicos indican que las hojas de la planta contienen torvuninas A y B (sapogeninas) y estigmasterol. En la raíz se ha detectado el alcaloide cuscohigrina y la sapogenina hecogenina. En el tallo se han encontrado los alcaloides esteroidales solasodina y solasodieno (85). En estudios realizados con extractos metanol-agua de las hojas, tallos y flores de *S. torvum* Nakanishi y

colaboradores detectaron compuestos fenólicos, aminoácidos, azúcares reductores, sustancias ácidas y básicas (86). A su vez Mahmood y colaboradores obtuvieron a partir de un extracto hexánico de los frutos los compuestos a) 2,3,4-trimetil-triacontano, b) triacontanato de octanósido y c) 5-hexatriacontanona. También identificaron 3-triacontanol, esterol, estigmasterol y ácido tetratriacontanóico (87).

Por otra parte, Domínguez y colaboradores han reportado la presencia de alcaloides en un extracto metanólico de la raíz (83). Los reportes acerca de la presencia de alcaloides en la raíz o en otras partes de la planta han sido inconsistentes. En cambio, se ha documentado ampliamente la presencia de saponinas y sapogeninas en cantidades abundantes en todas las estructuras de la planta (88), por lo que es posible que algunas de las actividades terapéuticas de la planta estén asociadas con la acción de las saponinas.

Características generales de *Smilax aristolochiaefolia* Miller

Es una planta trepadora de la familia Liliaceae, es originaria desde México hasta Honduras, tiene tallo de base cuadrangular, rizoma cuadrangular y delgado, hojas alternas ovales u oblongas y frutos globosos. Comúnmente se le conoce como zarzaparilla, alambrilla, raíz de zarzaparrilla, cocolmeca, etc.

pEn México la especie se localiza en los estados de Guerrero, Yucatán, San Luis Potosí, Campeche, Oaxaca, Sinaloa, Veracruz, Hidalgo y Nuevo León. Empíricamente se usa como diurético, pero la forma más comúnmente empleada es el cocimiento de la raíz como agua de uso contra la hinchazón, la úlcera gástrica, como sudorífero, depurativa en lepra, eczema y para purificar y fortalecer la sangre (89).

Figura 4. Fotografía de las hojas y frutos de *S. aristolochiaefolia* (Zarzaparrilla)

De los estudios fitoquímicos de *S. aristolochiaefolia* realizados se conoce que contiene, entre otros compuestos, esteroides: sarsapogenina, esmilagenina, sitosterol, estigmasterol y saponinas: sarsaponina, y smilasaponina (90). De la raíz se han aislado las saponinas parrillina, sarsaparrillósido y sarsapoquina entre algunos de sus componentes (91).

Característica generales de *Plantago major* L.

Es una planta anual o perenne de 10 a 30 cm de altura, tiene hojas ovales que surgen desde el nivel del suelo y forman una roseta que envuelve al tallo. Presenta flores blancas pequeñas en la parte apical de una espiga delgada y sus semillas son de color café. Pertenece a la familia Plantaginaceae y es originaria del norte de Europa y centro de Asia, pero fue introducida al continente americano por los conquistadores españoles. En México esta planta es conocida popularmente como llantén, antén (Guanajuato), cancerina (Puebla), lanté (Chiapas, Morelos, Tabasco). Crece en forma silvestre en clima cálido, semicálido y templado (92).

Figura 5. Fotografía de las partes aéreas (hojas y espigas) de *P. major* (Llantén)

P. major L es una planta ampliamente utilizada en Europa, la infusión de las hojas se usa en Alemania y España como depurativo, diurético y vulnerario, las hojas se emplean como hemostático (93).

En México, se usa la decocción de las hojas contra la diarrea y las hojas se aplican en emplastos sobre heridas y mordeduras de animales venenosos como cicatrizante. La infusión de las semillas se toma para eliminar parásitos y contra el estreñimiento. La decocción de las partes aéreas (hojas y espigas) es aplicada en fomentos contra la inflamación, granos, llagas con pus, se ingiere para combatir el cáncer, infecciones gastrointestinales producidas por bacterias o parásitos y para purificar la sangre (94).

En la medicina popular también se le atribuyen propiedades antitumorales. Sin embargo, los ensayos *in vitro*, arrojan resultados contradictorios. Estévez y colaboradores reportaron que el extracto metanólico de las hojas administrado a ratones por vía intraperitoneal elimina el sarcoma después de cinco días de tratamiento, también mencionan que el mismo tratamiento no es eficaz para combatir el sarcoma en ratas (95).

En las hojas se han detectado flavonoides, plantaglucósidos y siringinina. Las semillas contienen taninos, ácidos grasos, dos alcaloides monoterpénicos la plantagonina y la indicaina (96).

Características generales de *Anemopsis californica* Nutt.

Es una hierba originaria desde el estado de Colorado en los Estados Unidos de América hasta la zona media del norte de México; tiene tallo corto, áspero y pelúcido, hojas radicales arregladas en forma parecida a los pétalos de las rosas; presenta una sola flor blanca y frutos en forma de cápsulas que tienen una abertura en la punta; la raíz es tuberosa, cilíndrica y central de color café amarillento (97). En México esta planta de la familia Saururaceae también crece en el Valle de México, Puebla, Jalisco, Hidalgo y Guerrero, donde se le conoce popularmente como yerba del manso, hierba mansa. En Durango se hace un cocimiento de la planta completa para lavar heridas, también se usa en emplastos para sacar la ponzoña del piquete de alacrán o de araña. El cocimiento de la raíz se usa contra la disentería (77).

Figura 6. Fotografía de la flor y hojas de *A. californica* (Hierba del Manso)

Las infusiones de la raíz y el rizoma de *A californica* han sido usadas por los indios norteamericanos como antitusivo, desinfectante de heridas, analgésico, antipirético, antirreumático, antiespasmódico (98) y para purificar la sangre (99). La etnia de los Pai pai en Ensenada, Baja California utiliza un té de la raíz para el resfriado y purificar la sangre (100). Sin embargo, experimentalmente sólo se han evaluado sus efectos antiespasmódico (101) y antibacteriano (102).

Las actividades biológicas demostradas se han asociado con los aceites esenciales de la raíz y del rizoma, entre cuyos componentes destacan los terpenoides metileugenol (55%), timol (13%) y piperitona (8%) (103). Posteriormente, se detectaron el timolmetiléter (2.96%), linalol, p-cimeno, 1,8-cineol, β-pineno y canfeno en concentraciones menores al 1% (104). Casi todos estos compuestos tienen propiedades expectorantes, bactericidas y carminativas, por lo que son utilizados en la elaboración de medicamentos, cosméticos y como aromatizantes en la industria alimentaria (105).

Característica generales de *Amphypterygium adstringens* Schl.

Es un árbol de 10 metros de altura, de tronco torcido y corteza agrietada café grisácea. Sus hojas están agrupadas de 3 a 5 en las puntas de las ramas, presenta flores solitarias o en ramillete, los frutos son nueces abultadas y alargadas, habita en

clima cálido, semicálido y templado. En México se le encuentra en los estados de Puebla, Oaxaca, Jalisco, Morelos y Michoacán (106).

Este árbol de la familia Julianaceae es conocido popularmente como cuachalalate, cuachalá, ráscate la vieja, etc. La parte más empleada con propósitos medicinales es la corteza, la cual se usa para endurecer las encías, es aplicada localmente para curar heridas, hemorroides, llagas. La decocción es tomada como agua de uso contra la úlcera gástrica, colelitiasis, cáncer del tracto intestinal, el tifo y la tifoidea. También se emplea como hipocolesterolemiante y en problemas relacionados con la sangre y su circulación, para purificarla o desintoxicarla (107,108).

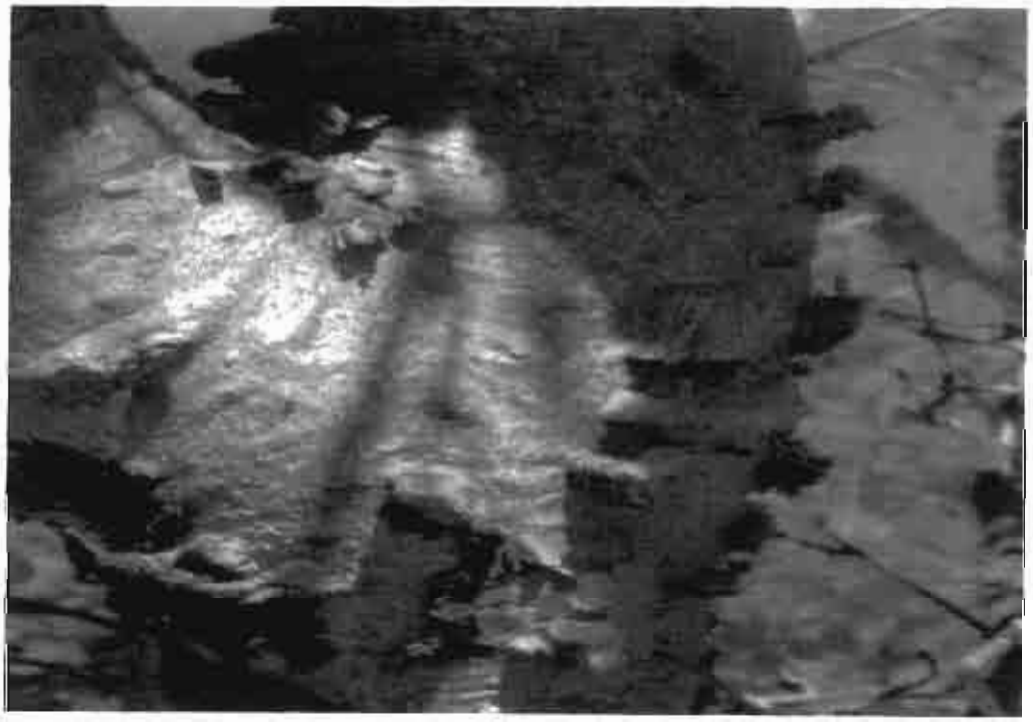


Figura 7. Fotografía de la corteza de *Amphypterygium adstringens* (cuachalalate)

En los estudios químicos de la planta se ha reportado la presencia de los ácidos masticadienóico (varios isómeros), instipolinácico, cuachalálico y alquil-anacárdicos entre otros (109,110,111). Además se han aislado β-sitosterol y una saponina (112). Los ácidos instipolinácico y cuachalálico se han relacionado con la actividad antiulcerosa e hipocolesterolemiante de la planta, actividades que se han demostrado experimentalmente (108).

JUSTIFICACIÓN

La hematopoyesis puede ser modificada por la exposición del individuo a agentes infecciosos, físicos, químicos tóxicos o potencialmente tóxicos para la médula ósea, provocando enfermedades hematológicas graves como la leucemia o la anemia aplástica que en nuestro país provocan la muerte a la mayoría de los adultos que las padecen (113). El desarrollo de anemia aplástica está asociado a la inhalación de vapores de benceno producidos por el manejo, combustión y almacenaje de gasolina, por el humo del tabaco, la evaporación del disolvente a partir de agentes utilizados para limpiar y restaurar muebles y en la vaporización de cementos industriales (114).

Está ampliamente demostrado que la inhalación voluntaria o involuntaria de los vapores del cemento adhesivo puede causar daño al hígado, riñones y médula ósea. En ésta última provoca hipoplasia que deriva en AA, la cual se manifiesta como pancitopenia (disminución en el número de todas las células de la sangre) y causa baja en el número de las células responsables de la defensa inmunológica del paciente, lo que motiva que se desarrollen infecciones recurrentes o neoplasias que pueden causar la muerte (115).

Como se sabe, entre los distintos tipos de fármacodependencia la inhalación de disolventes (cemento) va en aumento y se ha transformado en un grave problema

social y de salud. Actividad, que por ser practicada principalmente por niños y jóvenes en situación de calle, impide conocer con precisión el número de casos de AA (116). No obstante que se ha relacionado esta enfermedad con la inhalación del benceno, no existen reportes abundantes en la literatura científica al respecto. Por este motivo, en el presente trabajo se desarrolló un modelo experimental para la inducción de AA con benceno que permita conocer las fases de la enfermedad y las manifestaciones hematológicas asociadas con cada una, así como su posible manejo con extractos vegetales en trabajos posteriores.

En la actualidad, el tratamiento más exitoso de la AA en la medicina moderna es el transplante de médula ósea, proceso que asegura la sobrevivencia libre de la enfermedad en el 85% de los casos (117). Sin embargo, este proceso por su costo es inaccesible para la gran mayoría de los pacientes, ante ello se utilizan como una alternativa terapéutica plantas con propiedades medicinales, lo que supone un tratamiento de bajo costo económico, respaldado por el conocimiento y tradición popular. Sin embargo, no existen estudios científicos *in vitro* o *in vivo* que apoyen las propiedades hematopoyéticas de las plantas utilizadas en el presente estudio, las cuales se seleccionaron con base en su frecuencia de uso y efectividad terapéutica referida por los usuarios de las mismas.

A nivel mundial, sólo se registra el empleo de la infusión de jixueteng, una mezcla de 10 plantas cuyos componentes constantes son especies de los géneros *Milletia, Spatholobus y Mucura*, que preparada con diferentes formulaciones ha

probado incrementar la cuenta de células sanguíneas y de plaquetas en pacientes con anemia o sometidos a radioterapia (118). En la medicina oriental (china, malaya y filipina), esta infusión se recomienda como hemostático, para enriquecer y acelerar la circulación de la sangre y activar los meridianos que controlan la energía corporal (119). Sin embargo, se desconocen los principios activos responsables de los efectos terapéuticos de la preparación.

Con el presente trabajo se inicia un estudio sistemático de algunas plantas utilizadas tradicionalmente en México, para el tratamiento de la anemia. El propósito es conocer la capacidad que tienen estas especies para estimular la proliferación de las células hematopoyéticas de ratón *in vivo* e *in vitro*.

HIPÓTESIS

Considerando que *Solanum torvum Sw, Smilax aristolochiaefolia* Miller; *Plantago major L*, *Anemopsis californica Nutt* y *Amphypterygium adstringens Schl*, son plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana contra la anemia, es posible que las especies actúen estimulando la formación de células sanguíneas; por lo que los extractos adicionados a los cultivos de células de médula ósea o de bazo podrían estimular la proliferación celular e incrementar la concentración de las células en los cultivos y en la sangre de los animales tratados previamente con los extractos de las plantas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en ratones y cultivo de células hematopoyéticas de ratón, la capacidad de *Solanum torvum Sw, Smilax aristolochiaefolia* M, *Plantago major* L, *Anemopsis californica* Nutt *y Amphypterygium adstringens* Schl. para estimular la proliferación de células hematopoyéticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de las diferentes partes de las plantas seleccionadas.

2. Evaluar la actividad hematopoyética de los extractos de cada planta en cultivos de células de la médula ósea y del bazo de ratones sanos CD_1.

3. Establecer una curva dosis-respuesta en ratones administrando vía oral los extractos que presenten actividad hematopoyética *in vitro*.

4. Establecer un modelo para la inducción de anemia aplástica en ratones mediante la administración de benceno por vía subcutánea, que permita en una siguiente etapa evaluar la actividad hematopoyética de los extractos vegetales.

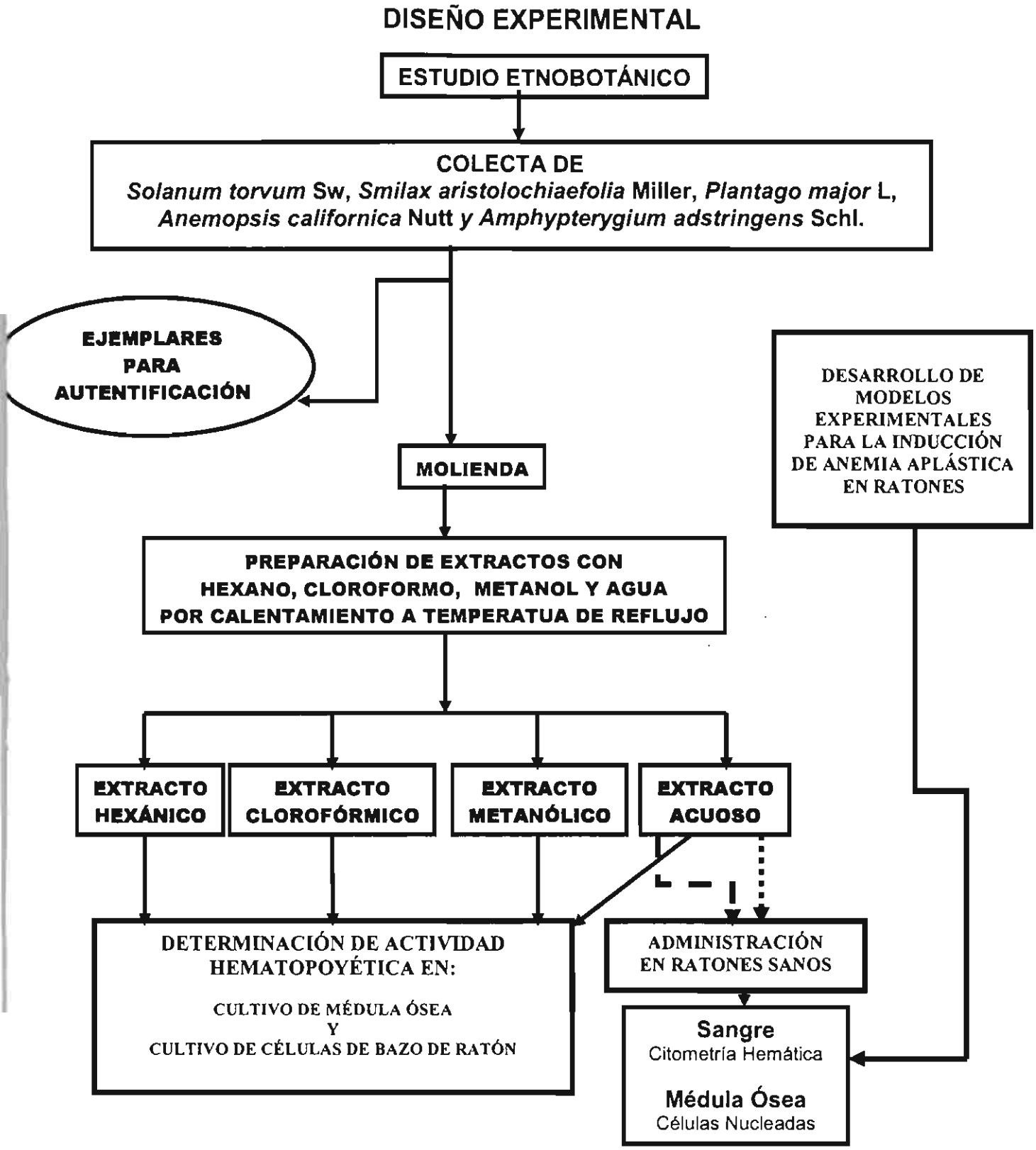


Figura 8. Diseño experimental

MÉTODOS

Material biológico

Las plantas se colectaron o adquirieron de octubre de 1995 a agosto de 1997. *Solanum torvum* Sw. se colectó en octubre de 1995 y enero de 1996 en una finca de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas y fue autentificada en el herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. *Plantago major* L se colectó en el valle de San Pablo Pahuatlán, Puebla en marzo de 1996 y fue autentificada por el M. en C. Jorge Santana del Herbario Metropolitano "Ramón Riba" de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, asignándole al voucher el No. 52718. *Smilax aristolochiaefolia* M se adquirió en el Mercado de Zumpango, Estado de México en noviembre de 1995 y mayo de 1996. *Anemopsis californica* Nutt *y Amphypterigium adstringens* Schl, proceden del estado de Guerrero, fueron autentificadas en la Universidad Autónoma de Chapingo, México en marzo de 1996.

Las especies se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente y se molieron hasta obtener un polvo fino. La selección de las partes de las plantas empleadas para desarrollar el presente trabajo fue con base en sus usos empíricos. En la tabla 4 se muestran las partes utilizadas de cada planta.

Tabla 4
Partes utilizadas de las plantas en la preparación de los extractos

PLANTA	PARTES
Solanum torvum Sw. (Hierba Sosa)	Hojas
Smilax aristolochiaefolia Miller (Zarzaparrilla)	Raíz
Plantago major L. (Llantén)	Hojas y espigas
Anemopsis californica Nutt (Hierba del Manso)	Raíz
Amphypterygium adstringens Schl. (Cuachalalate)	Corteza

Preparación de los extractos

En un matraz balón de 10 litros se colocaron 500 g de la planta seca y molida y 3 litros de hexano, cloroformo, metanol o agua. La mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante tres horas, después se dejó enfriar, se filtró con papel Whatman del No. 42 y el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida. En el caso del extracto acuoso, el agua se eliminó por liofilización.

Preparación de las diluciones de los extractos de prueba

Los extractos acuoso y metanólico se disolvieron en medio Alfa-MEM complementado con 10% de suero de caballo inactivado. Los extractos clorofómico y hexánico se disolvieron en suero de caballo para preparar diluciones de 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0125 g/mL. Debido a que el extracto hexánico de *S. torvum* se disolvió parcialmente con suero de caballo, en un segundo grupo de experimentos los cuatro extractos de *S. torvum* se disolvieron en aceite de maíz. Todas las disoluciones se esterilizaron por filtración en membranas Millipore de 0.45 y 0.22 μm y se verificó la esterilidad de las mismas sembrando por separado alícuotas de 0.5 ml en tubos con Caldo de Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y en medio Alfa MEM pH de 7.2 y se incubaron 48 horas a 37°C.

Estos extractos se utilizaron para determinar la actividad hematopoyética *in vitro*. El extracto acuoso de cada planta se utilizó en los ensayos *in vivo*, en el caso de *S. aristolochiaefolia* se evaluaron los extractos acuoso y metanólico. La selección de las concentraciones de trabajo fue con base en los estudios preliminares sobre los efectos de *S. torvum* Sw (120).

ENSAYOS *in vitro*

Cultivo de médula ósea de ratón

Un ratón macho CD_1 de 8-12 semanas de edad se sacrificó por dislocación cervical. El fémur se separó en condiciones de esterilidad y se inyectó a través del canal medular 1 ml de medio de Leibovitz (L-15) complementado con 10% de suero de caballo. Las células se recibieron en un tubo de plástico, la suspensión celular se homogeneizó mediante pipeteo y con ella se llenaron pipetas de Thomas hasta la marca de 0.5 y se llevó hasta la marca de 11 con solución de Turk (dilución 1:20). Las pipetas se agitaron mecánicamente tres minutos y se llenaron ambos lados de un hemocitómetro, después de 10 minutos se contaron las células nucleadas por microscopía de luz en campo claro. Además, se determinó la viabilidad celular con azul de tripano al 0.2% (121).

La concentración celular se ajustó a 4.0 X 10^6/mL con Solución Salina Fisiológica (SSF) y 0.1 ml de esta suspensión se adicionó a una mezcla de 0.6 ml de medio de Leibovitz, 0.2 ml de suero de caballo y 0.1 ml del extracto de prueba. Posteriormente, 0.5 ml de la mezcla anterior se depositaron en placas multipozos (Nunc) de 132 X 88 mm e incubaron durante tres días a 37°C en una incubadora con humedad relativa de 90% y 5% de CO_2.

Las células se recolectaron mediante pipetas pasteur y se colocaron en un tubo de plástico, las placas se lavaron mediante pipeteo con 1 ml de medio L-15, este volumen se adicionó al tubo que contenía las células, el cual se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con 0.5 ml de medio L-15 para cuantificar las células en hemocitómetro por microscopía de luz en campo claro (122). En todos los casos se incluyeron cultivos testigos libres de extracto. En los ensayos de los extractos de *S. torvum* disueltos en aceite de maíz se usaron además otros testigos: A) Extracto de *Phytolacca americana*, (GIBCO) que contiene una lectina empleada comúnmente en la concentración 1:320 para estimular la proliferación de células de médula ósea y de bazo de ratón en cultivo. B) Medio condicionado (sobrenadante) de células de bazo estimuladas con *Phytolacca americana*, C) aceite de maíz.

Cada muestra se evaluó al menos en seis ocasiones con su correspondiente duplicado. El cultivo testigo libre de extracto fue considerado como el 100 % de proliferación y contra él se compararon los cultivos de prueba. Los resultados se expresaron como la concentración celular media ± el error estándar. Para conocer la significancia estadística se aplicó la prueba de t de Student para pares de datos no agrupados, considerando como significativos los valores de $p<0.05$ (123). En las figuras sólo se destacan los resultados con significancia estadística.

Cultivo de bazo de ratón

Un ratón macho CD_1 de 8-12 semanas de edad se sacrificó por dislocación cervical, se aplicó etanol en la región media superior izquierda, se abrió la región abdominal con un bisturí estéril, se extrajo el bazo y se colocó en una malla metálica estéril colocada sobre un recipiente de boca ancha. El tejido se disgregó mecánicamente y se lavó con medio Alfa-MOPS (pH 6.8/ 290 mOsm) frío, las células se recibieron en un tubo de plástico de 15 x 100 mm y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos.

El botón celular se resuspendió en 10 ml de medio Alfa-MOPS y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm durante 15 minutos. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio Alfa-MEM y se homogeneizó mediante pipeteo. Se llenó una pipeta de Thomas para leucocitos hasta la marca de 0.5 y se diluyó hasta la marca 11 con solución de Turk (dilución 1:20). Se agitó la pipeta mecánicamente durante tres minutos, posteriormente se llenó un hemocitómetro y se contaron las células nucleadas totales por microscopía de luz en campo claro.

La viabilidad celular se determinó con disolución de azul de tripano al 0.2% y se ajustó la concentración celular con medio Alfa-MEM a 4.0×10^6 células viables/mL y 0.1 ml de esta suspensión se adicionó a un sistema de cultivo que contenía 0.6 ml de medio Alfa-MEM, 0.2 ml de suero de caballo y 0.1 ml del extracto de prueba. Se

colocaron 0.5 ml de la mezcla anterior en placas multipozos Nunc de 132 X 88 mm e incubaron durante 48 horas a 37°C con humedad relativa de 90% y 5% de CO_2 (124).

Las células se recuperaron con una pipeta pasteur, se depositaron en un tubo de plástico y se lavaron los pozos con 1 ml de medio Alfa-MEM. El líquido se adicionó al tubo con las células y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. El botón celular se resuspendió en 0.5 ml de medio L-15 y se contaron las células en un hemocitómetro por microscopía de luz en campo claro.

Cada muestra se ensayó por duplicado al menos seis veces. La cuenta celular de los cultivos testigos se consideró como el 100% de proliferación y contra él se compararon los cultivos de prueba. Los resultados se expresaron como la media de la cuenta celular ± el error estándar. Para determinar la significancia estadística de los resultados se aplicó la prueba de t de Student para pares de datos no agrupados, considerando como significativos los valores de $p < 0.05$ (123). En las figuras sólo se señalan los resultados con significancia estadística.

ENSAYOS *in vivo*

Determinación de las dosis tóxicas, dosis de trabajo y esquemas de tratamiento

Con el extracto acuoso de *S. torvum* se prepararon diluciones de 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 g/mL en Solución Salina Fisiológica (SSF). Cada dosis contenida en un volumen correspondiente al 1% del peso corporal, se administró por vía oro-esofágica a sendos grupos de 10 ratones macho CD_1 de 8 a 12 semanas de edad y 24 horas después se determinó la tasa de mortalidad. A los ratones sobrevivientes se les administró una dosis diaria hasta acumular cinco dosis. Veinticuatro horas después de cada aplicación se sangraron 2 ratones por lote para cuantificar eritrocitos, leucocitos y plaquetas en sangre periférica. Posteriormente, se sacrificaron los animales y se aisló el fémur, se le inyectó 1 ml de SSF para contar las células nucleadas totales de la médula ósea. Simultáneamente, se utilizó un grupo de ratones testigo que recibió por la misma vía y esquema de tratamiento SSF. Estos ensayos se iniciaron con *S. torvum,* ya que de las plantas utilizadas es la única con propiedades tóxicas reportadas (125).

Evaluación de la actividad hematopoyética de las plantas *in vivo*

Se emplearon ratones macho, cepa CD_1 de 8-12 semanas y se mantuvieron con ingestión libre de agua y alimento hasta 8 horas antes de la administración oro-

esofágica de una dosis diaria de 0.4, 0.2, y 0.05 g/mL de extracto disuelto en SSF durante tres días consecutivos (primer esquema de tratamiento). A otro grupo de ratones se le administró una dosis diaria del extracto acuoso de *Solanum torvum* durante cinco días consecutivos (segundo esquema de tratamiento). Cada concentración del extracto se administró a sendos grupos de 10 ratones cada uno y se utilizó un grupo testigo de 10 ratones que recibió solo SSF. Cuarenta y ocho horas después de la última dosis todos los ratones se anestesiaron con éter y se sangraron por punción cardiaca. La sangre se colectó en tubos de plástico con EDTA al 0.1% y se realizó una citometría hemática. Los extractos de las otras plantas se administraron únicamente mediante el primer esquema de tratamiento.

Posteriormente, se aisló el fémur y se le inyectó 1 ml de SSF a través del canal medular; las células se colectaron en un tubo de plástico y se contaron las células nucleadas totales al microscopio de luz en campo claro con objetivo de 40X.

Los resultados se expresaron como la media aritmética de las determinaciones $\pm$ error estándar y se realizó la prueba de t de Student para pares de datos no agrupados, comparando cada grupo tratado contra su grupo testigo y se consideró significancia estadística cuando $p<0.05$.

Inducción de anemia aplástica en ratones mediante la administración subcutánea de benceno

Se emplearon 120 ratones macho CD_1, de 8 a 12 semanas de edad, los animales se pesaron y mantuvieron con ingestión libre de alimento y de agua filtrada con membranas Millipore de 0.22 μm. Los animales se distribuyeron en dos grupos de 60 ratones, divididos a su vez en cuatro subgrupos A1, B1, C1 y D1, A2, B2, C2, y D2 con 15 ratones cada uno. A los grupos A1, B1 y C1 se les inyectó por vía subcutánea benceno (2 ml/kg) diluido v/v con aceite de maíz. El benceno se administró diariamente de **lunes a viernes (primer esquema de inducción utilizado)** hasta completar 10, 15 y 20 dosis, respectivamente.

A los ratones de los grupos A2, B2 y C2 se les inyectó por vía subcutánea el benceno **tres días alternados de la semana con dos de descanso (segundo esquema de inducción)** hasta completar las 10, 15 y 20 dosis, respectivamente. Los grupos D1 y D2 fueron los testigos correspondientes y recibieron por la misma vía y calendario el aceite de maíz.

Dos días después de la última inoculación, 10, 15 ó 20 según el caso, los ratones se pesaron, se anestesiaron con cloroformo y se sangraron por punción cardiaca. La sangre se colectó en tubos con EDTA en polvo al 0.1 % y se les realizó una citometría hemática completa. Los animales se revisaron para determinar la

presencia de hematomas, sangrado de mucosas, lesiones cutáneas, se revisaron los órganos internos.

Para el recuento de células nucleadas totales y de megacariocitos de la médula ósea, se aisló el fémur y se inyectó 1 ml de disolución salina fisiológica por el canal medular. La suspensión celular se diluyó 1:20 con solución de Turk y se cuantificaron las células nucleadas en un hemocitómetro mediante microscopía de campo claro, los megacariocitos se contaron en cámara de Hatch.

Los resultados se expresaron como la media aritmética ± error estándar y la comparación de medias para pares de datos no agrupados. Se aplicaron las pruebas de ANOVA multivariada (R de Rao) y LSD de Fisher (123).

RESULTADOS

Actividad hematopoyética de *Solanum torvum* Sw. *in vitro*

El extracto acuoso incrementó 2.4, 2.3, 1.8, 2.4 veces la concentración de células en los cultivos de médula ósea expuestos a las concentraciones de 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 g/mL, respectivamente. Con estas mismas concentraciones, el extracto metanólico incrementó 3.9, 3.7, 3.9 y 3.8 veces la concentración celular, respectivamente. (Figura 9). Los aumentos en la cuenta de células con ambos extractos son estadísticamente significativos ($p<0.02$) respecto a los cultivos testigos. No se encontró diferencia entre la actividad hematopoyética con la concentración de 0.4 g/mL del extracto acuoso respecto a las otras dosis.

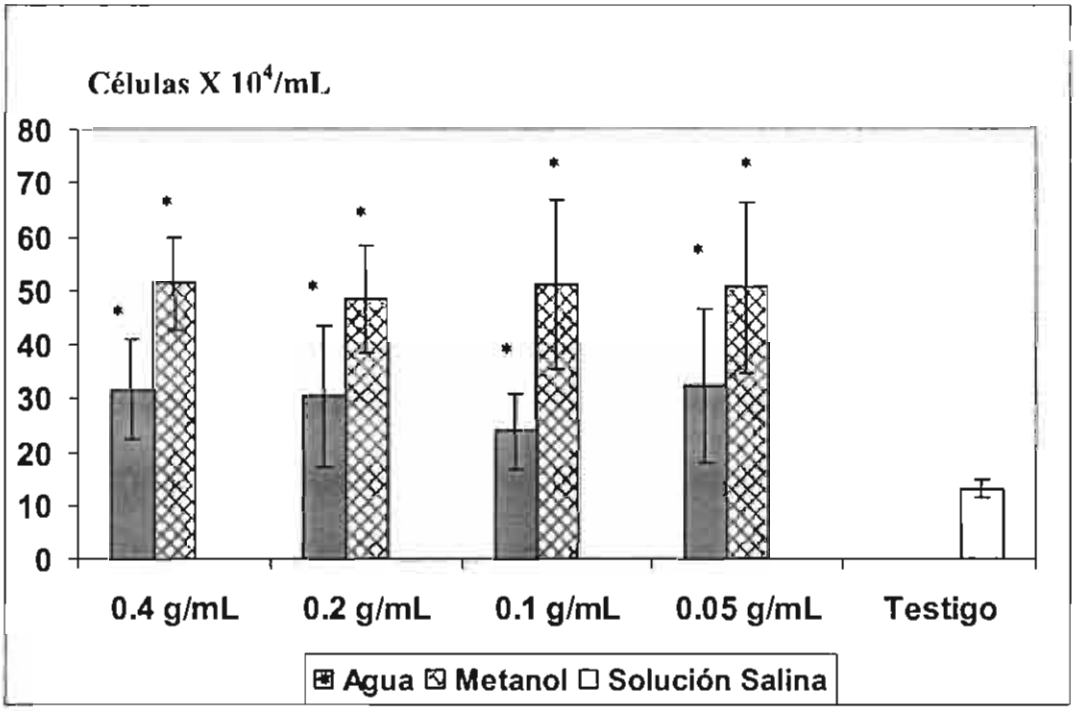


Figura 9. Actividad hematopoyética de *S. torvum* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=8).
***p<0.02 todos los extractos respecto al testigo.**

El extracto clorofómico estimuló la proliferación de células de médula ósea, a la concentración de 0.2 g/mL se incrementó 2.6 veces la concentración celular. Con esta misma concentración el extracto hexánico aumentó 3.5 veces la concentración celular respecto a los cultivos testigos (Figura 10).

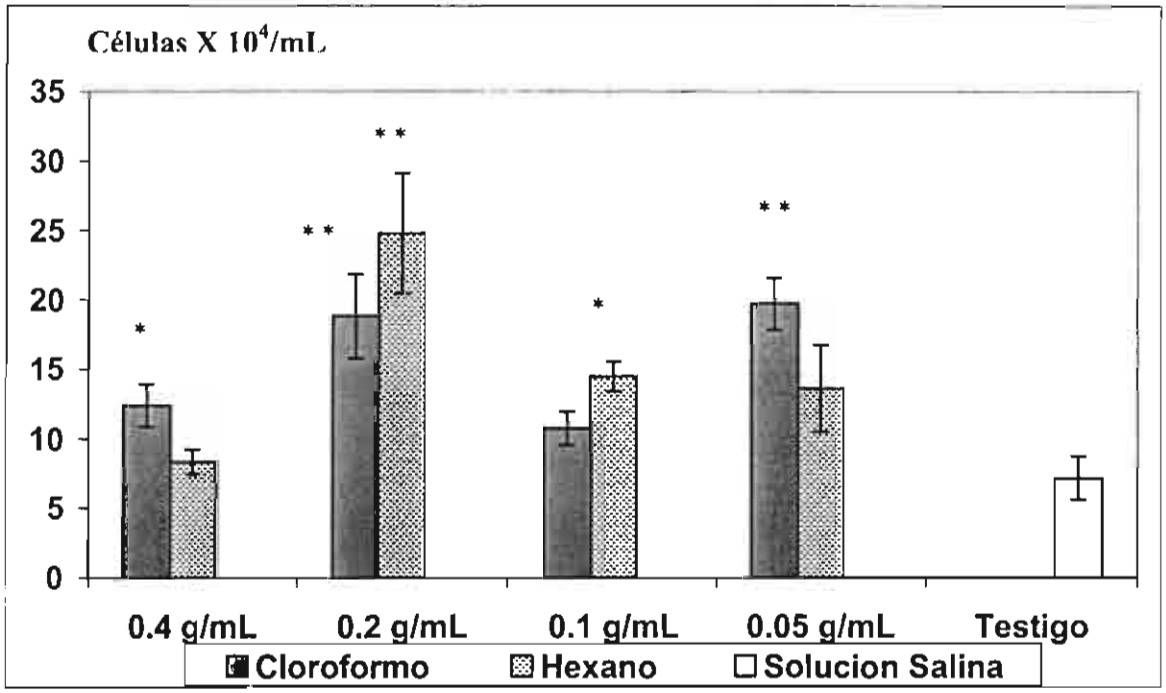


Figura 10. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *S. torvum* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=8). *p<0.01, **p<0.001 respecto al testigo.

El extracto acuoso estimuló la proliferación de las células de bazo en cultivo incrementando 4.2 y 2 veces la concentración celular a las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL, respectivamente (Figura 11), en tanto que, el extracto metanólico a esas mismas concentraciones incrementó 4 y 2.1 veces la concentración celular, respectivamente. Incrementos que son estadísticamente significativos ($p<0.01$) respecto a los cultivos testigos. A concentración de 0.4 g/mL de ambos extractos se

presentó mayor actividad hematopoyética que a dosis de 0.2 g/mL del mismo extracto ($p<0.001$).

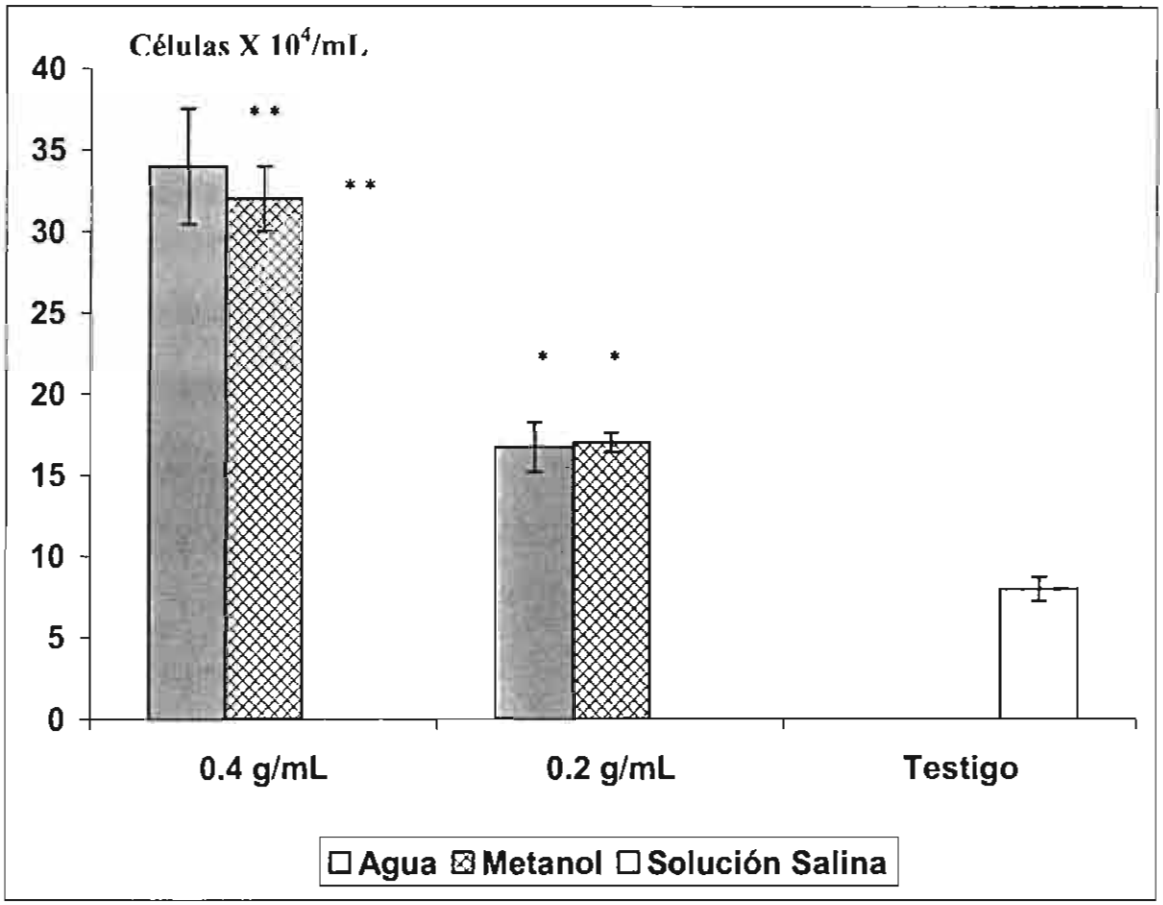


Figura 11. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. torvum* en cultivo de bazo de ratón. Media ± Error estándar, (n=8). *p<0.01, **p<0.001 respecto al testigo.

Respecto a los cultivos testigos libre de extracto o con extracto de *Phytolacca americana*, los extractos disueltos en el aceite de maíz, a la concentración de 0.4 g/mL no estimularon la proliferación de células de médula ósea (Figura 12). En esta serie de experimentos, se incluyó un segundo testigo para determinar la capacidad

mitogénica de los extractos de *S. torvum* respecto a *P. americana* que contiene un mitógeno ampliamente utilizado en el cultivo de células hematopoyéticas. A las concentraciones de 0.2, 0.1 y 0.025 g/mL los extractos acuoso, metanólico y clorofórmico, fueron francamente estimulantes en relación con los testigos mencionados anteriormente ($p<0.05$). A la concentración de 0.05 g/mL, únicamente el extracto metanólico presentó actividad hematopoyética, incrementando 2.6 veces la cuenta celular.

El aceite de maíz disolvió mejor los extractos clorofórmico y hexánico que el suero sanguíneo, sin embargo la actividad del extracto hexánico en aceite de maíz fue pobre con respecto al disuelto parcialmente con suero sanguíneo, excepto a la concentración de 0.2 g/mL (Figura 12).

En el cultivo testigo de aceite de maíz (disolvente), no se observó estimulación sobre la proliferación de células de médula ósea, de hecho la cuenta de células disminuyó 83% respecto al cultivo testigo libre de extracto (Figura 12).

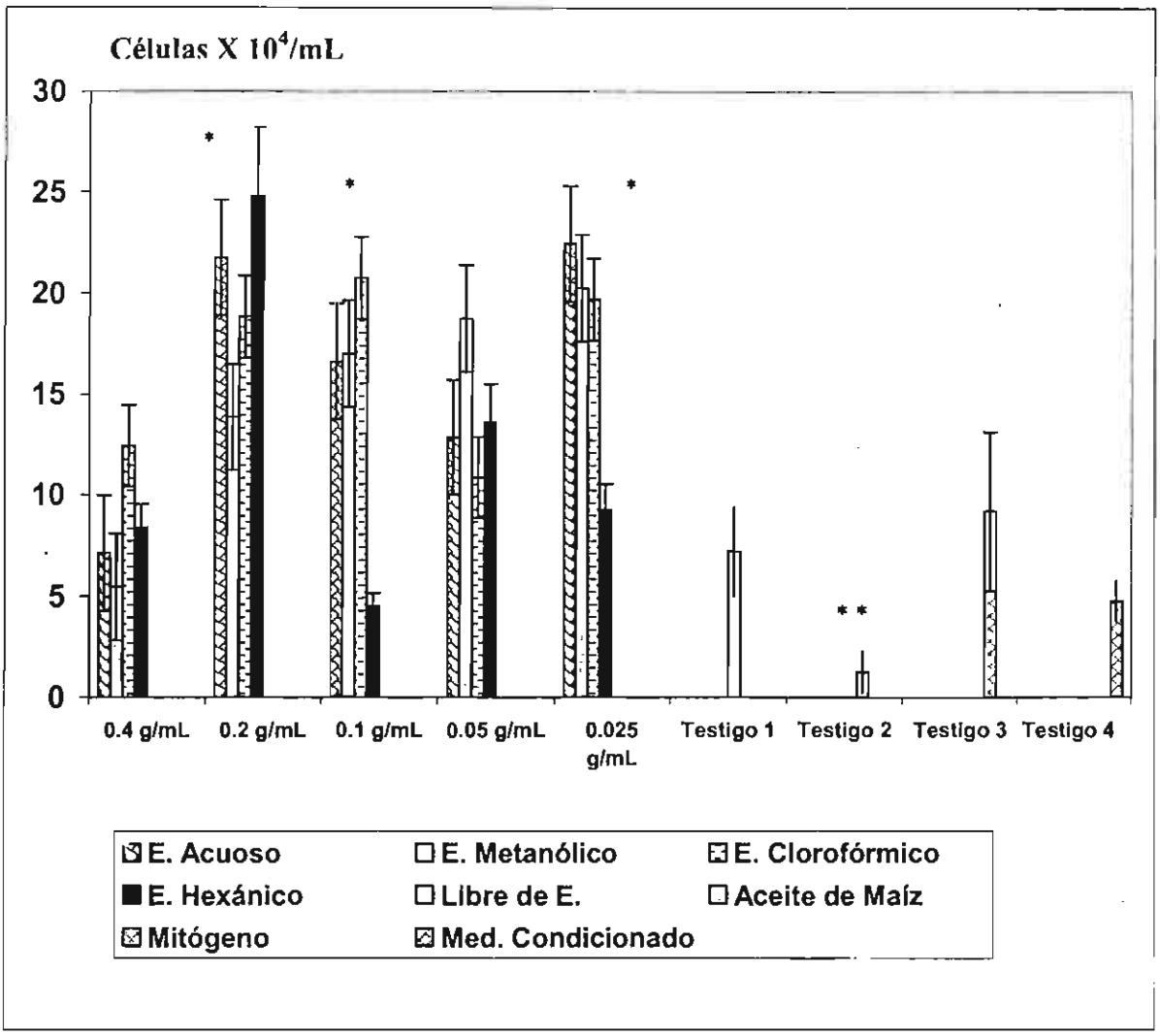


Figura 12. Actividad hematopoyética de los extractos de *S. torvun* disueltos en aceite de maíz. Media ± Error estándar, (n=5).

- ***p<0.05 respecto a los testigos 1 y 3**
- ****p<0.001 respecto a todos los extractos.**

ENSAYOS *IN VIVO*

Determinación de las dosis tóxicas y dosis de trabajo

Es importante mencionar que los ensayos de toxicidad se iniciaron con el extracto acuoso de *S. torvum*, debido a que de las plantas estudiadas, ésta es la única que es considerada tóxica para el hombre y algunas especies animales (125).

Del grupo de 10 ratones inoculados con 0.8 g/mL del extracto acuoso de *S. torvum*, 60% murieron antes de las 24 horas, 20% murió antes de las 48 horas y el 20 % restante sobrevivió hasta las 96 horas. En la necropsia de los animales que murieron antes de las 24 y 48 horas se observaron múltiples coágulos en hígado y bazo.

Actividad hematopoyética de *Solanum torvum* Sw *in vivo*

En la tabla 5 se puede observar que ninguna de las dosis usadas del extracto acuoso produjo variación en la concentración de eritrocitos, lo cual fue corroborado con los valores de hemoglobina y hematócrito en sangre. Sin embargo, se observó un incremento estadísticamente significativo en la cuenta de reticulocitos.

Tabla 5. Concentración de eritrocitos y de otros parámetros eritroides en ratones tratados con el extracto acuoso de *S. torvum*

Dosis g/mL	Eritrocitos $X10^{12}/L$	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Reticulocitos %
0.4	11.07 ± 0.22	16.06 ± 1.03	44.83 ± 1.89	4.25 ± 0.15*
0.2	11.59 ± 0.23	15.40 ± 0.44	51.06 ± 1.91	3.00 ± 0.20*
0.05	10.89 ± 0.28	15.46 ± 0.68	45.90 ± 2.65	2.42 ± 0.19*
Testigo	11.48 ± 0.25	15.89 ± 0.99	47.10 ± 1.89	1.62 ± 0.17

Media ± Error Estándar, (n=10). Reticulocitos *p<0.02 respecto al grupo testigo.

En la tabla 6 se puede observar que la concentración de plaquetas no varió en los ratones tratados con las diferentes dosis del extracto. Sin embargo, la concentración de leucocitos aumentó significativamente en los ratones tratados con las dosis de 0.4 y 0.2 g/mL.

Por otra parte, en la médula ósea no se observó modificación en la concentración de células nucleadas, ni de megacariocitos con ninguna de las dosis del extracto de *S. torvum* Sw.

Tabla 6. Efecto del extracto acuoso de *S. torvum* Sw sobre la producción de plaquetas, leucocitos y células mieloides en ratones sanos

Dosis g/mL	Plaquetas $X10^{12}/L$	Leucocitos $x10^{9}/L$	CNT $X10^{9}/L$	Megacariocitos µL
0.4	2.11 ± 0.10	19.31 ± 1.03*	12.31 ± 2.55	33 ± 5
0.2	2.11 ± 0.10	16.56 ± 1.37*	8.40 ± 0.90	44 ± 6
0.05	1.98 ± 0.13	17.52 ± 2.82	9.63 ± 1.41	28 ± 9
Testigo	1.76 ± 0.09	10.19 ± 0.90	11.16 ± 1.39	18 ± 4

CNT. Células Nucleadas Totales de la médula ósea. Media ± error estándar, (n=10). *p<0.05 respecto al grupo testigo.

Actividad hematopoyética de *Smilax aristolochiaefolia* M *in vitro*

Las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL del extracto acuoso incrementaron el número de células de médula ósea en cultivo 2 y 1.4 veces, respectivamente ($p<0.01$). El extracto metanólico a las concentraciones de 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 g/mL incrementó 2.5, 2.4, 1.8 y 1.5 veces el número de células en los cultivos de médula ósea, respectivamente. Los incrementos celulares obtenidos con este extracto fueron significativos estadísticamente ($p<0.01$) respecto a los cultivos testigos (Figura 13). Además, se puede observar que la actividad hematopoyética del extracto metanólico es mayor que la del extracto acuoso con todas las dosis empleadas.

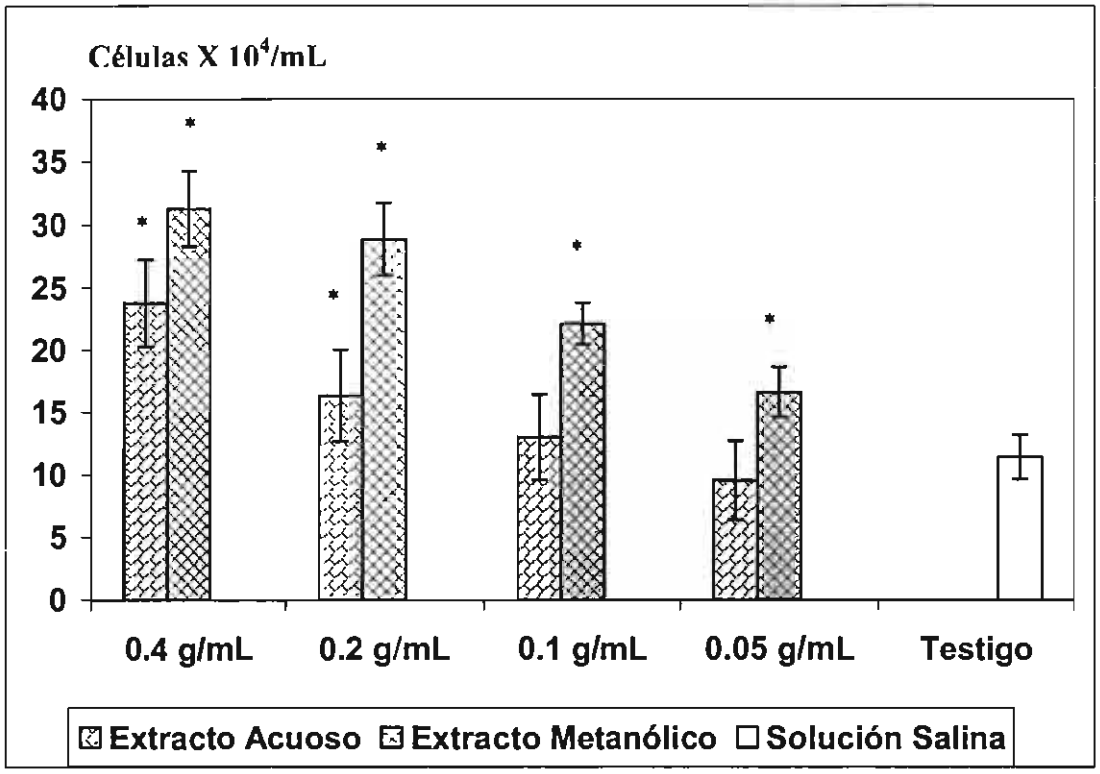


Figura 13. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=10). *p<0.01.

Los extractos clorofórmico y hexánico no indujeron incrementos estadísticamente significativos en la concentración de células de médula ósea en cultivo (Figura 14).

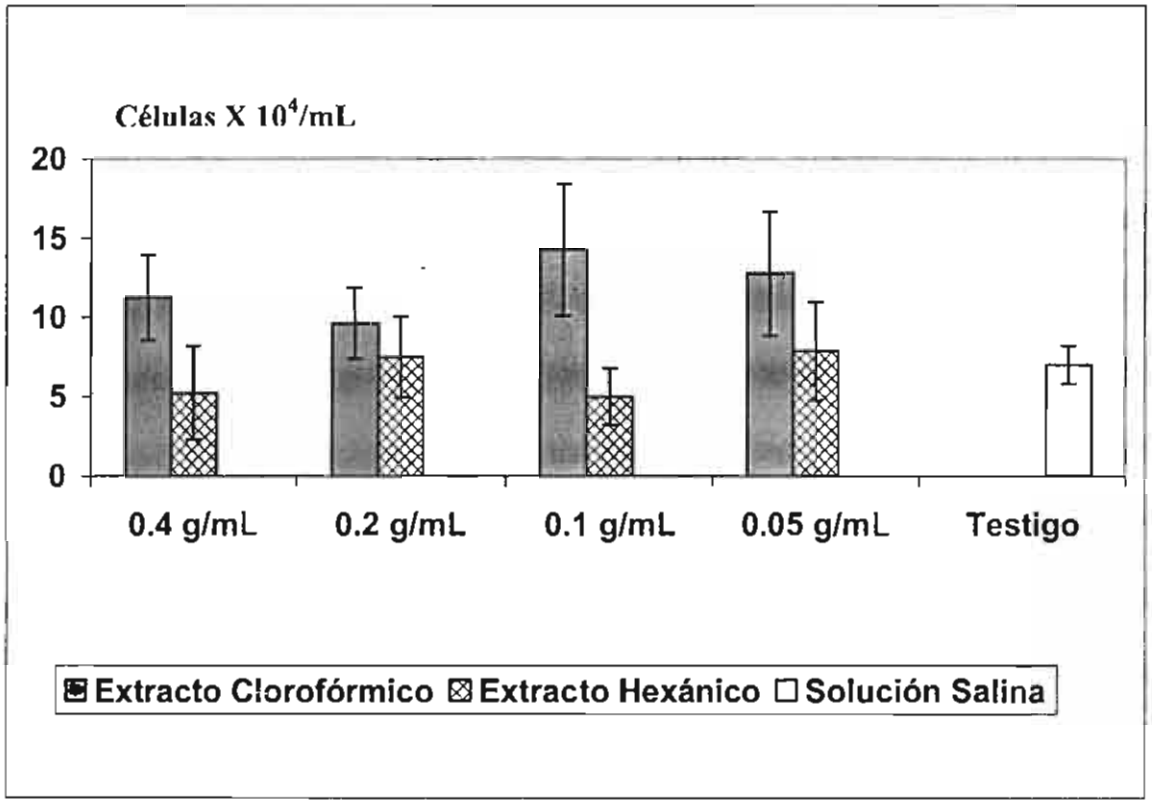


Figura 14. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=10).

A las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL del extracto acuoso se incrementó 3 y 1.9 veces el número de células de bazo en cultivo, a estas mismas concentraciones el extracto metanólico incrementó 5.7 y 5 veces la población celular del bazo en cultivo (Figura 15).

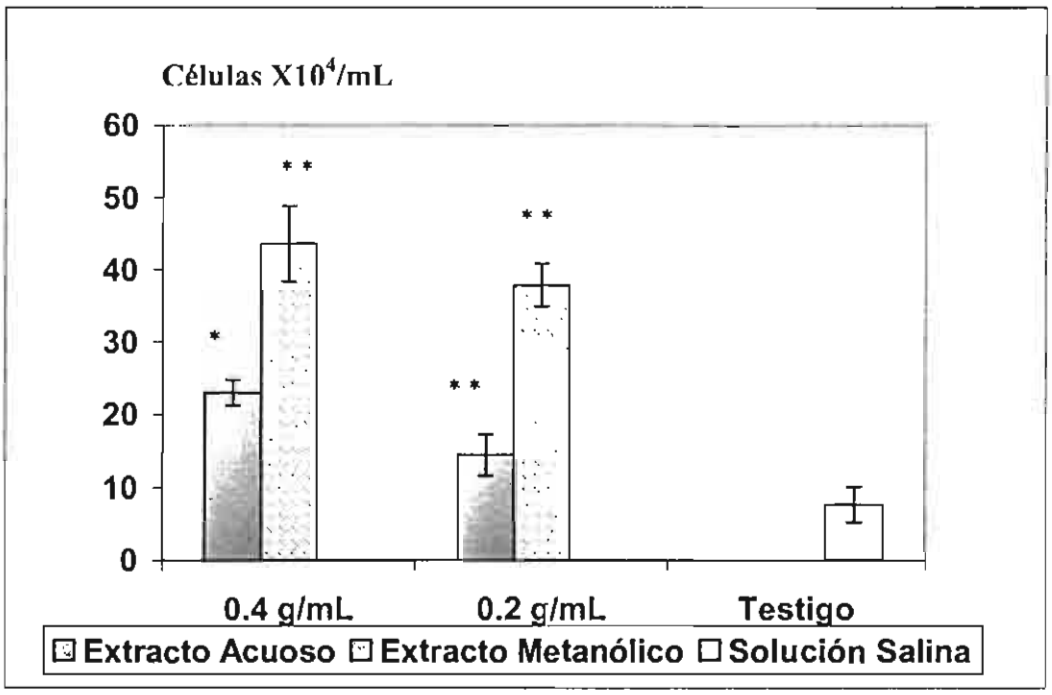


Figura 15. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de células de bazo de ratón. Media ± Error, (n=10). *p<0.01,p<0.001.**

En las figuras 13 y 15 puede observarse que el extracto metanólico presentó mayor actividad hematopoyética que el extracto acuoso tanto en el cultivo de médula ósea como en el cultivo de células de bazo, en este último, la proliferación celular es mayor en varios órdenes de magnitud.

Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *Smilax aristolochiaefolia* M. *in vivo*

Ninguna de las dosis del extracto acuoso de *S. aristolochiaefolia* produjo variación en la concentración de eritrocitos en los ratones tratados. Sin embargo, se

observaron incrementos significativos en la concentración total de hemoglobina y en el valor del hematócrito ($p<0.01$) con respecto al grupo testigo (Tabla 7).

Por otra parte, el extracto metanólico de esta planta no produjo variación alguna en la línea eritroide (Tabla 7), expresada como concentración total de eritrocitos, hemoglobina y hematócrito.

Tabla 7. Concentración de eritrocitos, hemoglobina y hematócrito en ratones tratados con los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia*

Dosis g/mL	Extracto Acuoso			Extracto Metanólico		
	Eritrocitos ($X10^{12}$/L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Eritrocitos ($X10^{12}$/L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
0.8	10.15 ± 0.63	12.29 ± 2.02*	37.87 ± 6.20*	11.60 ± 1.43	23.70 ± 2.20	54.59 ± 5.30
0.4	8.72 ± 0.63	13.65 ± 0.89*	44.12 ± 0.73*	11.70 ± 1.15	22.81 ± 1.11	42.85 ± 4.27
0.2	9.21 ± 0.97	13.90 ± 2.28*	41.82 ± 2.55*	12.50 ± 1.80	22.82 ± 0.92	43.12 ± 3.85
0.1	10.14 ± 1.14	15.07 ± 1.00*	43.85 ± 4.58*	12.60 ± 0.47	27.49 ± 2.30	46.11 ± 3.11
Testigo	10.20 ± 0.91	9.59 ± 1.10	30.31 ± 0.41	13.45 ± 0.36	26.72 ± 1.15	45.02 ± 5.10

Media ± Error estándar , (n=10). *p<0.01 respecto al grupo testigo

En la tabla 7 se puede observar que el extracto acuoso de *S. aristolochiaefolia* no modificó la concentración absoluta de los eritrocitos, pero indujo incrementos en los valores de hemoglobina y del hematócrito, lo que significa, que aunque no se produjeron nuevos eritrocitos, sí se estimuló la síntesis de hemoglobina e incrementó

el volumen celular, dando origen a eritrocitos de mayor tamaño y pigmentación conocidos como macrocitos hipercrómicos.

En los ratones tratados con 0.2 y 0.1 g/mL del extracto acuoso se observó reducción en la concentración total de leucocitos del 50 y 47%, respectivamente, variación estadísticamente significativa ($p<0.05$) respecto al grupo testigo (Figura 16).

En contrapartida, en los ratones tratados con 0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 g/mL del extracto metanólico de *S. aristolochiaefolia* se incrementó 1.64, 1.90, 1.8 y 2.37 veces la concentración de leucocitos, respectivamente (Figura 16).

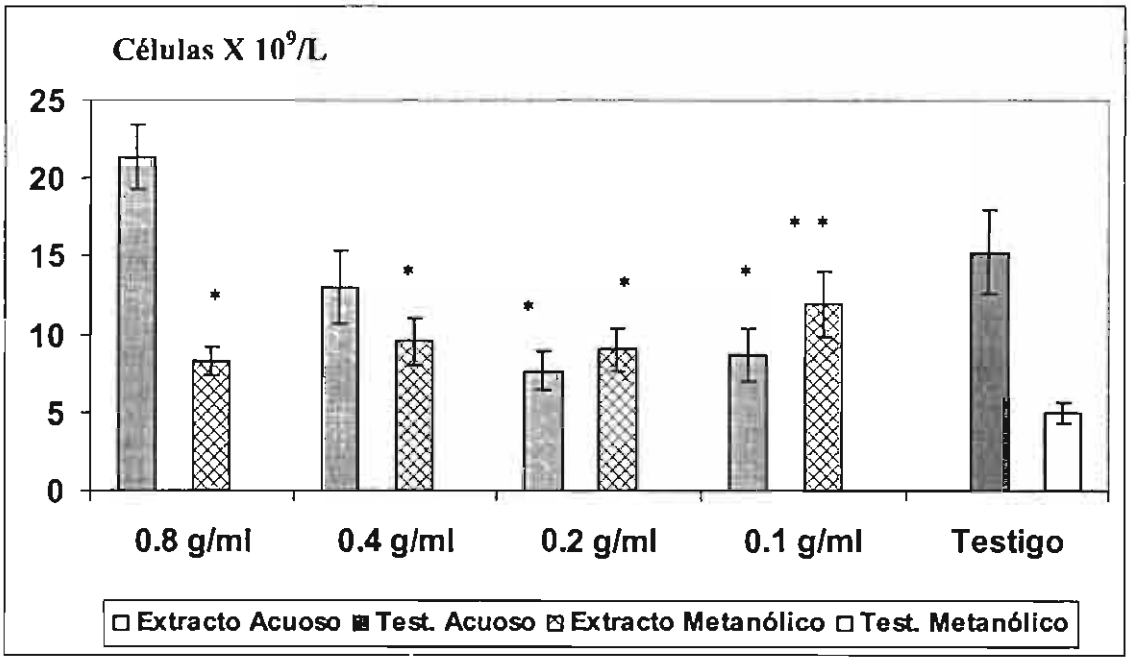


Figura 16. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de *S aristolochiaefolia* sobre la producción de leucocitos *in vivo*. Media ± Error estándar, (n=10). *p<0.05, **p<0.001 respecto al grupo testigo correspondiente.

Respecto a la concentración de plaquetas, ninguno de los grupos de ratones tratados con los extractos de *S. aristolochiaefolia* presentó variación en la concentración de plaquetas circulantes (Figura 17).

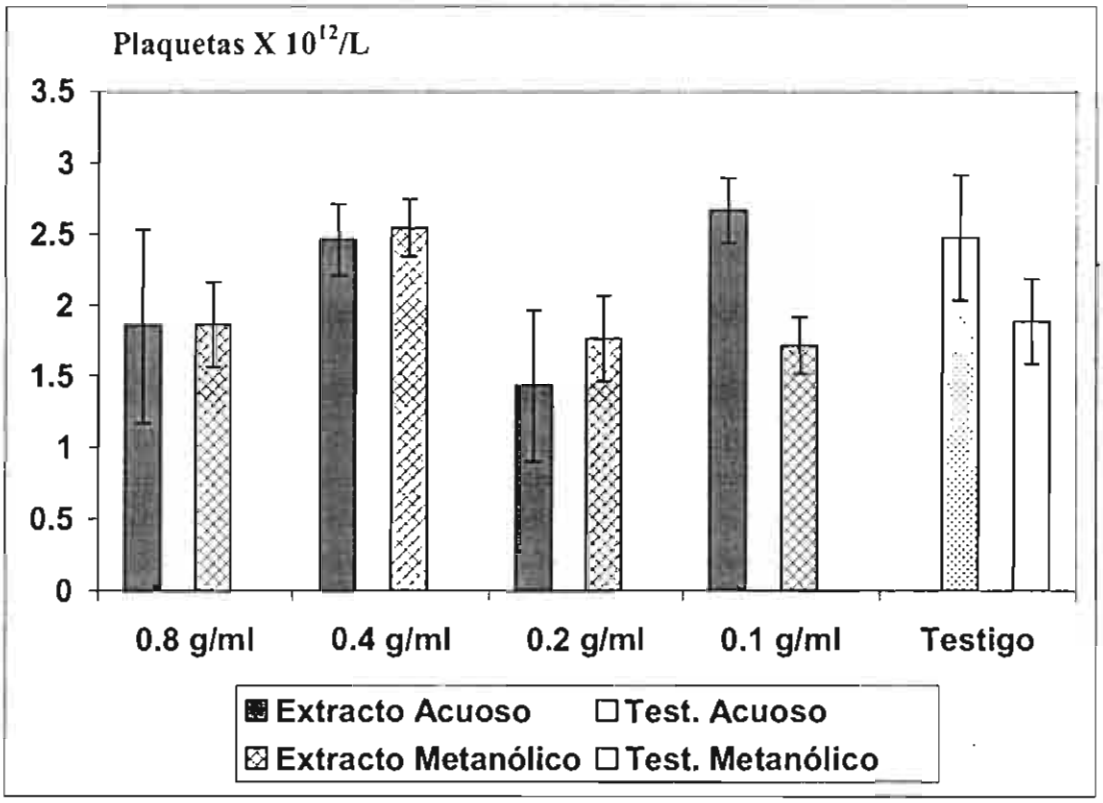


Figura 17. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* sobre la concentración de plaquetas. Media ± Error estándar, (n=10).

En estos grupos no se pudo realizar la cuenta de reticulocitos y de células nucleadas totales de la médula ósea, por lo que se desconoce el efecto mielopoyético de *S. aristolochiaefolia in vivo*.

Actividad hematopoyética de *Plantago major in vitro*

En la figura 18 se puede observar que los extractos acuoso y metanólico estimularon la proliferación de células de la médula ósea en todas las concentraciones ensayadas. La actividad hematopoyética de ambos extractos fue similar a concentraciones de 0.4, 0.2 y 0.1 g/mL, lográndose incrementos de 3.7 a 5 veces en la concentración celular respecto a los cultivos testigos. Sin embargo, a la dosis de 0.05 g/mL la actividad hematopoyética del extracto metanólico fue significativamente mayor que la del extracto acuoso ($p<0.05$).

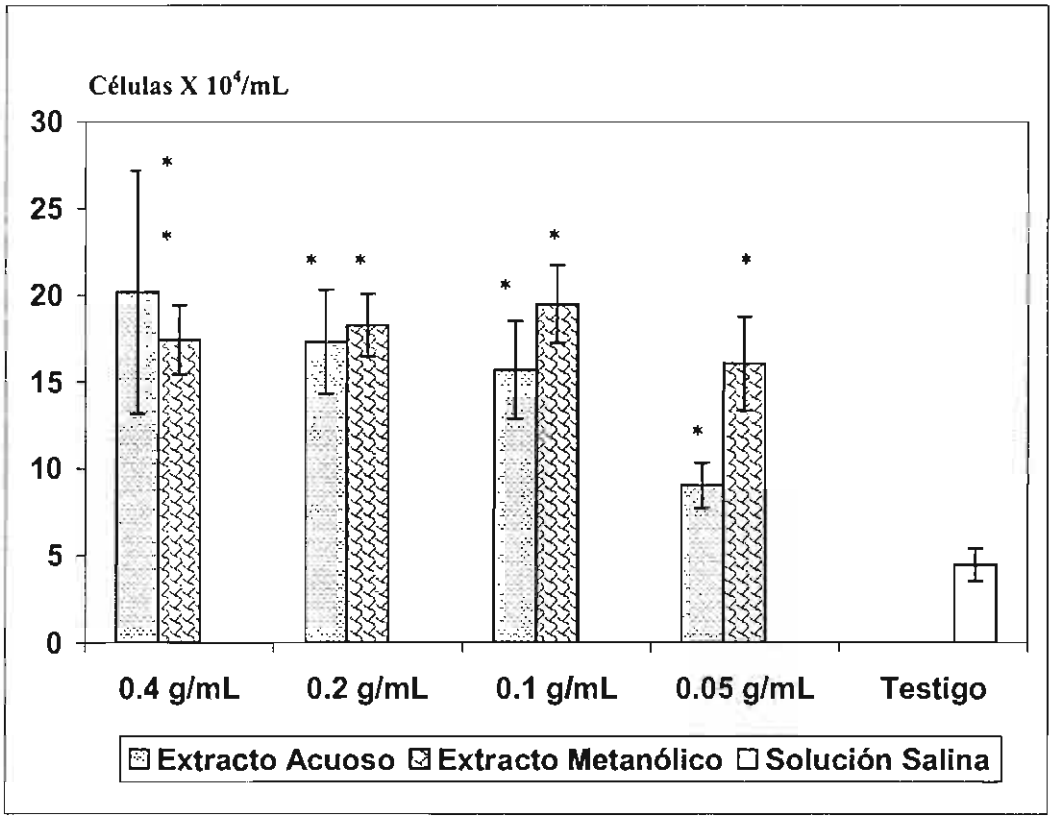


Figura 18. Actividad hematopoyética de *P. major* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=8). * $p<0.05$ respecto al cultivo testigo

Con los extractos clorofórmico y hexánico no se observó variación en la concentración celular respecto a los cultivos testigos. Más aún, con la concentración de 0.05 g/mL ambos extractos redujeron la concentración celular 55 y 53%, respectivamente (Figura 19).

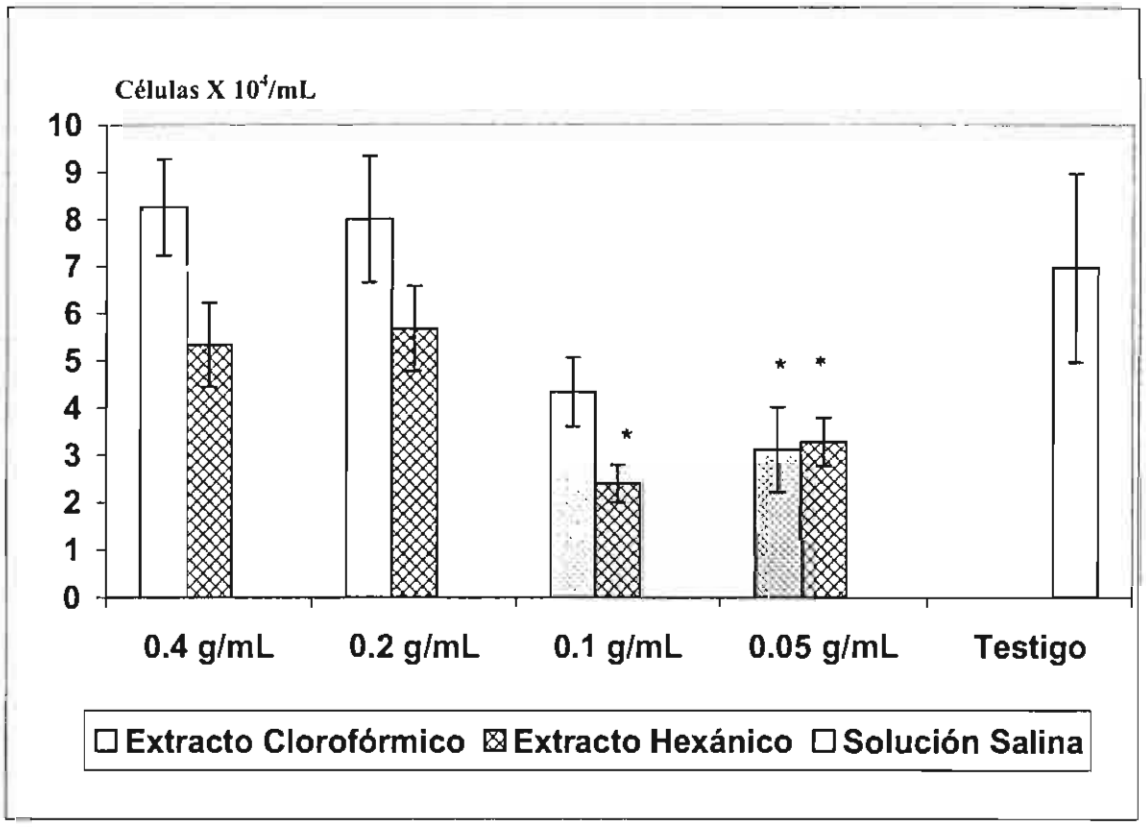


Figura 19. Actividad hematopoyética de *P. major* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=8). *p<0.05 respecto al testigo.

Las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL del extracto acuoso incrementaron 5.3 y 4.8 veces, respectivamente la población de células de bazo en cultivo; a esas concentraciones el extracto metanólico incrementó 6.7 y 3.8 veces, respectivamente

el número de células con relación al cultivo testigo (Figura 20). La concentración de 0.4 g/mL de ambos extractos presentó mayor actividad que la concentración 0.2 g/mL del extracto correspondiente ($p<0.001$).

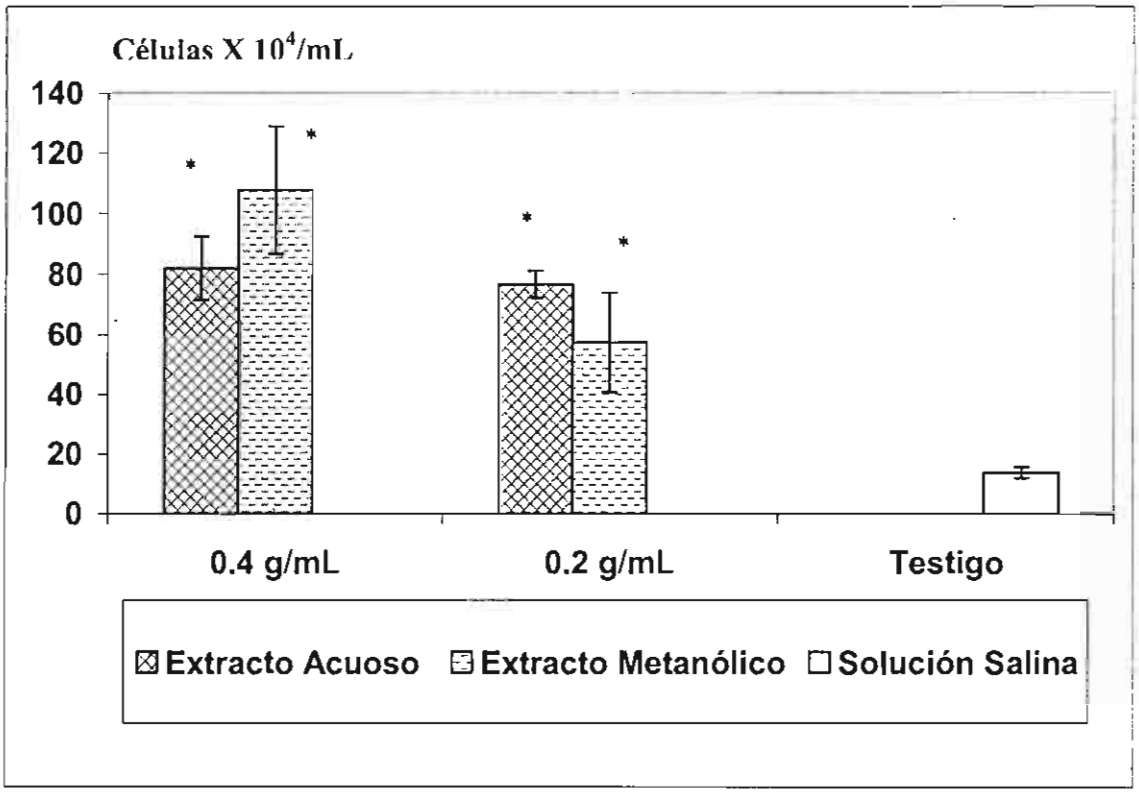


Figura 20. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *P. major* en cultivo de bazo de ratón. Media ± Error estándar, (n=8). *p<0.001 respecto al testigo.

Actividad hematopoyética de *Plantago major in vivo*

En los ratones tratados con el extracto acuoso de *P. major* no se observó variación en la concentración absoluta de eritrocitos, hemoglobina y de plaquetas (Tabla 8). En ninguno de los casos se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre los lotes tratados con las diferentes dosis del extracto y el grupo testigo.

Tabla 8. Efecto del extracto acuoso de *P. major* sobre la hematopoyesis de ratón *in vivo*

Dosis g/mL	Eritrocitos X 10^{12}/L	Hemoglobina (g/dL)	Leucocitos X 10^{9}/L	Plaquetas X 10^{12}/L
0.4	7.48 ± 1.01	47.45 ± 5.28	2.57 ± 0.77	2.60 ± 0.27
0.2	10.17 ± 1.57	44.83 ± 4.13	1.53 ± 0.15	3.03 ± 0.47
0.1	9.01 ± 1.20	42.77 ± 5.25	1.80 ± 0.36	3.22 ± 0.35
Testigo	10.61 ± 1.88	47.57 ± 8.79	1.27 ± 0.24	2.30 ± 0.47

Media ± Error estándar, (n=10). p>0.05, No significativa respecto al grupo testigo.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cuenta diferencial de leucocitos y reticulocitos entre los grupos tratados con el extracto acuoso y el grupo testigo. En estos experimentos no se obtuvo la médula ósea, por lo que se desconoce el efecto del extracto acuoso sobre la producción de células mieloides *in vivo.*

Actividad hematopoyética de *Anemopsis californica* Nutt *in vitro*

Los extractos acuoso y metanólico estimularon la proliferación de células de médula ósea en cultivo, con la concentración de 0.8 g/mL se incrementó 1.97 y 2.57 veces, respectivamente el número de células en comparación con los cultivos testigo (Figura 21).

El extracto metanólico presentó un efecto estimulante aparente. Sin embargo, debido a los valores amplios de la desviación estándar, las diferencias entre los cultivos tratados y los testigos no resultaron ser estadísticamente significativas (Figura 21).

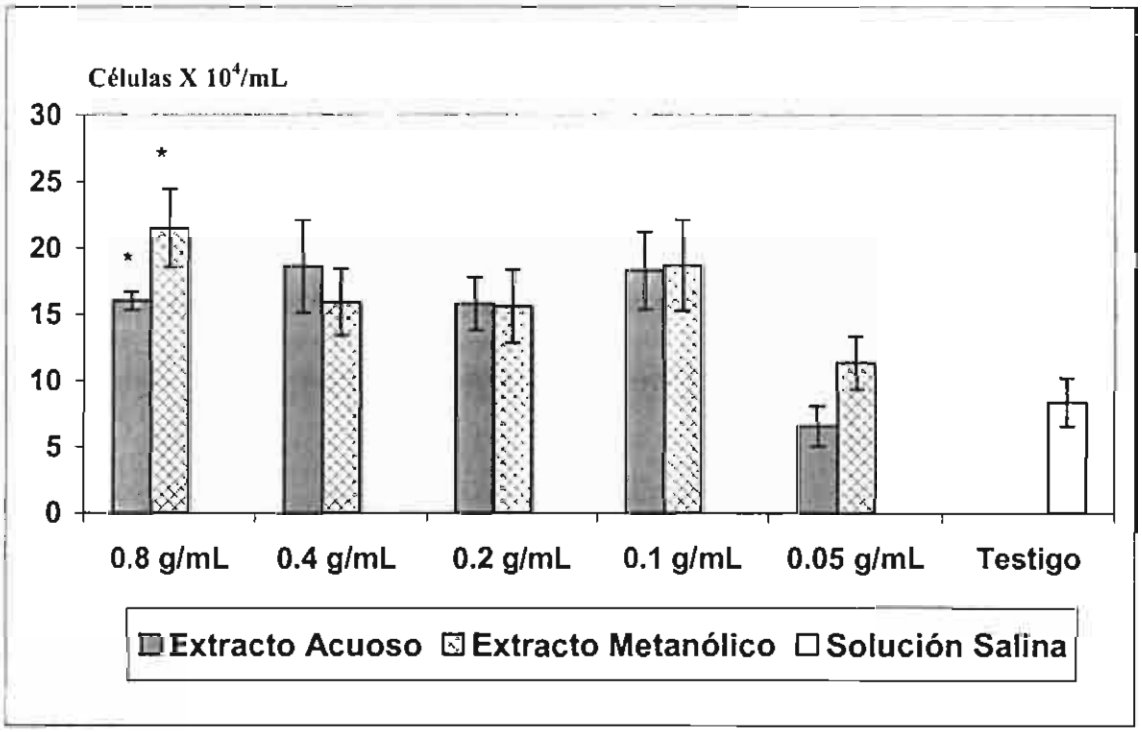


Figura 21. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. californica* en cultivo de médula ósea. Media ± Error estándar, (n=10). *p<0.05 respecto al testigo.

El extracto clorofórmico aumentó 1.6, 1.5 y 1.4 veces la concentración de células de médula ósea a las concentraciones de 0.4, 0.2 y 0.05 g/mL, respectivamente. En relación con los cultivos testigos, los incrementos obtenidos fueron estadísticamente significativos (Figura 22).

El extracto hexánico aumentó la cuenta celular 1.47, 1.44, 1.26 y 1.12 veces a las concentraciones de 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 g/mL, respectivamente. Con excepción de la concentración de 0.05 g/mL, los demás incrementos en la celularidad son estadísticamente significativos ($p<0.001$). En la figura 22 se observa que no existe diferencia en la actividad hematopoyética entre los extractos clorofórmico y hexánico con las concentraciones ensayadas.

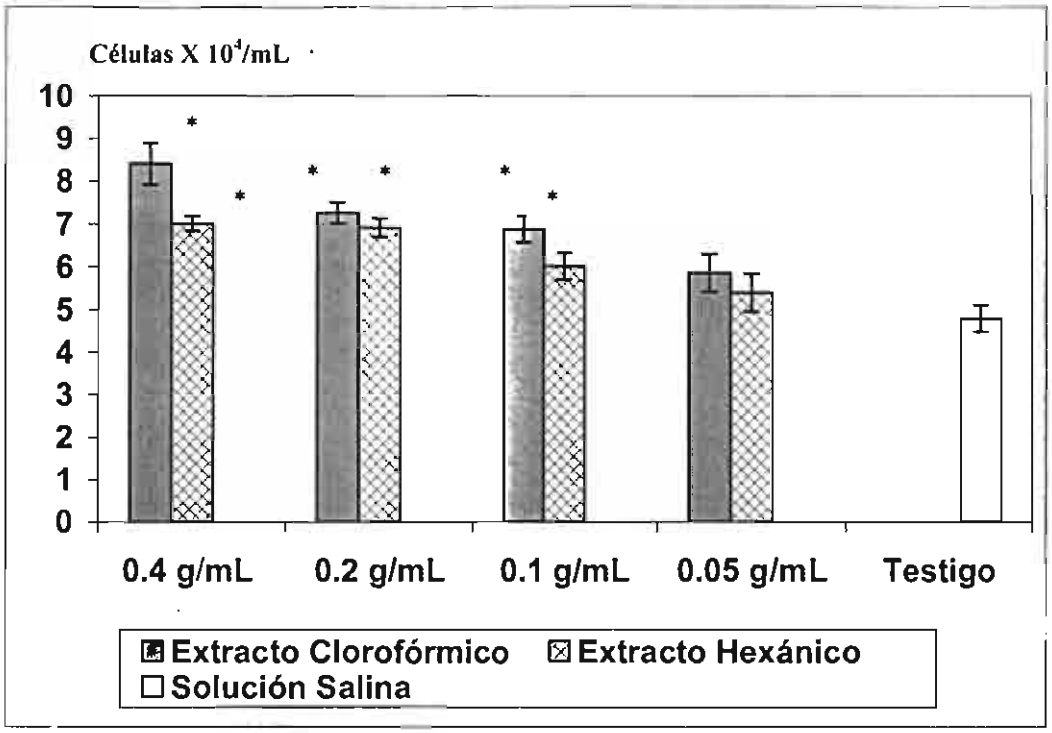


Figura 22. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de A. californica en cultivo de médula ósea de ratón Media ± Error estándar, (n=10). *p<0.001 respecto al testigo.

De los resultados presentados hasta ahora, únicamente los extractos clorofórmico y hexánico de *A. californica* y de *S. torvum*, presentaron actividad hematopoyética similar o mayor que los extractos acuoso y metanólico correspondientes.

Por otra parte, el extracto acuoso incrementó 7.3 y 7.8 veces la cuenta de células de bazo en cultivo a las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL, respectivamente, con sendos valores de $p<0.05$ y $p<0.025$, respectivamente (Figura 23).

En relación con los cultivos testigos, las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL del extracto metanólico incrementaron 9.0 y 7.3 veces, respectivamente, la concentración de células de bazo en cultivo (Figura 23).

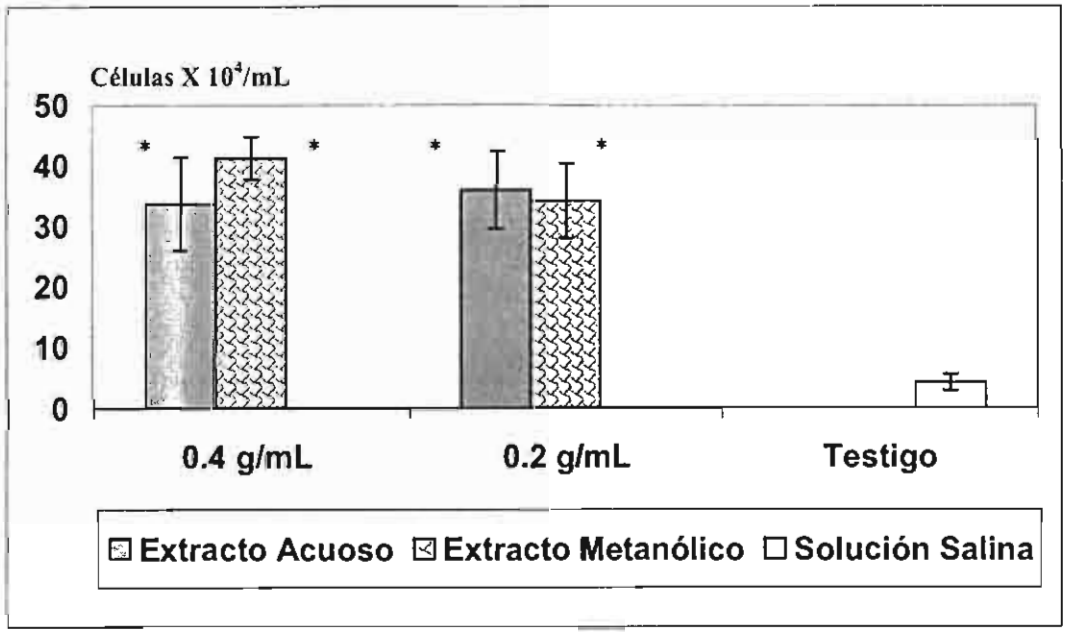


Figura 23. Actividad hematopoyética de *A. californica* en cultivo de células de bazo de ratón. Media ± Error estándar, (n=10).
***p<0.025, respecto al testigo.**

Actividad hematopoyética de *Anemopsis californica* Nutt *in vivo*

El extracto acuoso de *A. californica* no produjo variación en la concentración absoluta de eritrocitos y plaquetas con las dosis de 0.4 y 0.2 g/mL (Tabla 9). En este caso, las determinaciones se realizaron en forma automatizada en un contador de células Coulter Counter Z1, presentándose gran dispersión en los valores de la desviación estándar, por lo que al hacer el análisis estadístico no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con el extracto y el grupo testigo.

Tampoco se observó variación en la concentración de leucocitos en sangre periférica o de células nucleadas en la médula ósea (Tabla 9), lo que demuestra que no existe efecto hematopoyético de este extracto con las dosis de 0.4 y 0.2 g/mL.

Los ratones a los que se les administraron las dosis de 0.4 y 0.02 g/mL del extracto acuoso de *A. californica* no presentaron variaciones hematológicas. Sin embargo, la dosis más baja (0.05 g/mL) causó la muerte al 70% de los ratones tratados. Los ratones sobrevivientes no presentaron variación en la concentración absoluta de eritrocitos, pero se observaron incrementos significativos en la cuenta de leucocitos y plaquetas y disminución en la cuenta de células nucleadas de la médula ósea dando un cuadro de hipoplasia aguda.

Tabla 9. Efecto del extracto acuoso de *A. californica* sobre la hematopoyesis de ratón *in vivo*.

Dosis g/mL	Eritrocitos $X10^{11}$/L	Leucocitos $X10^{9}$/L	Plaquetas $X\ 10^{11}$/L	C.N.T. $X10^{9}$/L
0.4	2.0 ± 0.40	6.2 ± 1.07	12.6 ± 3.55	4.78 ± 0.70
0.2	1.9 ± 0.34	4.8 ± 0.67	16.7 ± 1.31	5.71 ± 1.05
0.05*	3.0 ± 1.20	9.6 ± 4.86*	19.4 ± 6.77*	2.96 ± 0.64*
Testigo	1.6 ± 0.55	5.0 ± 0.81	12.0 ± 0.93	7.04 ± 2.12

C.N.T. Células nucleadas totales de la médula ósea. Media ± error estándar, (n=3). * $p<0.05$ respecto al grupo testigo.

Actividad hematopoyética de *Amphypterygium adstringens* Schl. *in vitro*

El extracto acuoso estimuló la proliferación celular en el cultivo de médula ósea, provocando 2.3, 1.7, 3.1 y 2.9 aumentos en la cuenta final de células a la concentraciones de 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 g/mL, respectivamente (Figura 24) en todos los casos los incrementos en el número de células son estadísticamente significativos ($p<0.025$).

Con el extracto metanólico no se observó diferencia en la celularidad entre los cultivos tratados con las diferentes concentraciones del extracto y el cultivo testigo (Figura 24).

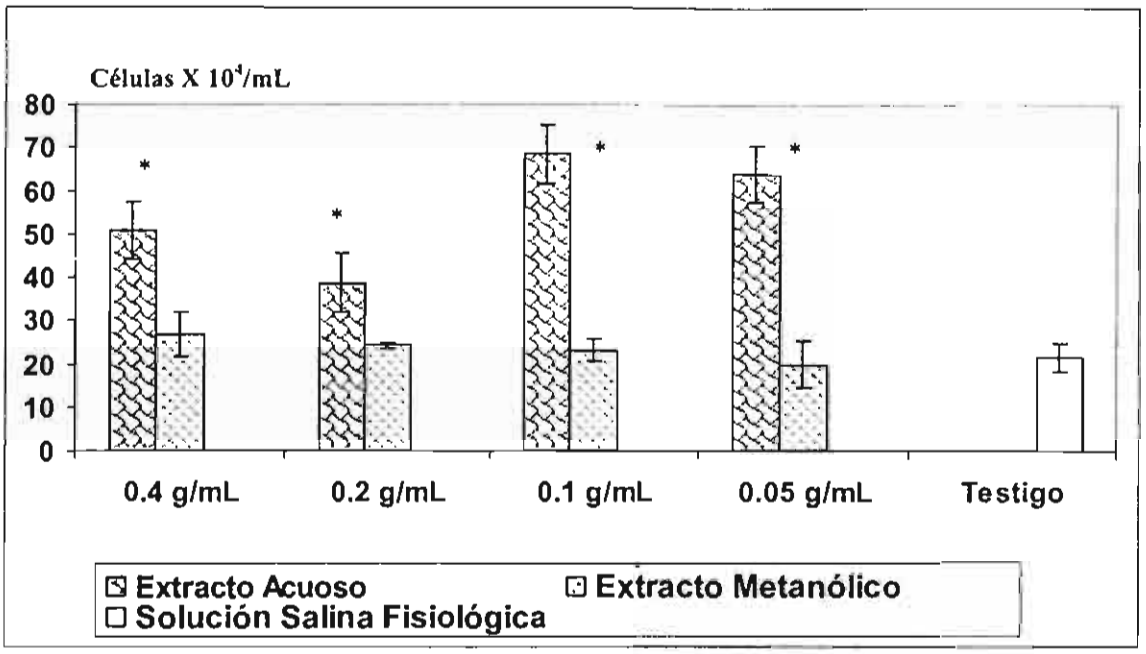


Figura 24. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. adstringens* en cultivo de médula. Media ± Error estándar, (n=10). *p<0.025 respecto al testigo.

En los cultivos de médula ósea tratados con los extractos clorofórmico y hexánico no se observó diferencia en la concentración celular con respecto a los cultivos testigos (Figura 25).

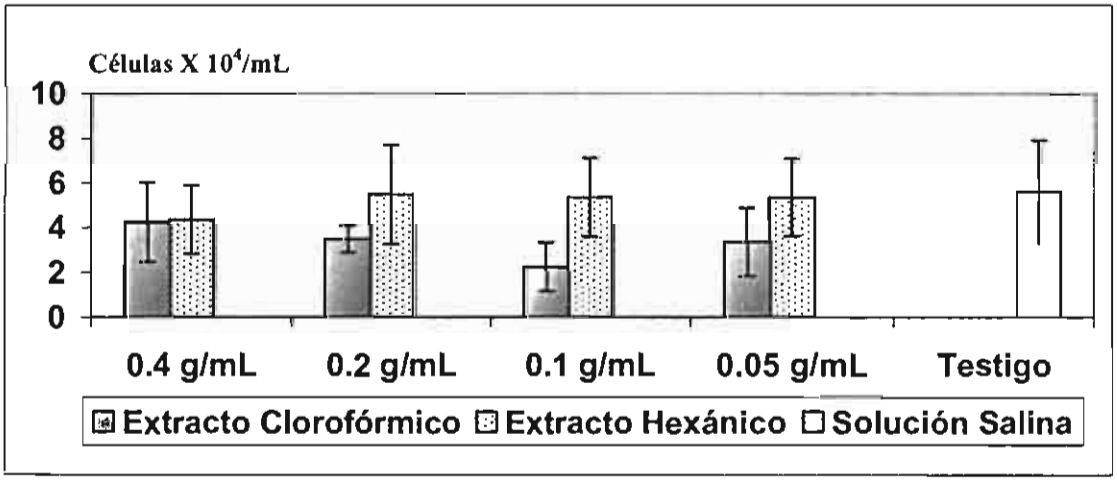


Figura 25. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *A. adstringens* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± error estándar, (n=10).

Por otra parte, los extractos acuso y metanólico estimularon la proliferación celular en el cultivo de células de bazo a las concentraciones de 0.4 y 0.2 g/mL (Figura 26), con la concentración de 0.4 g/mL el extracto acuoso incrementó 5.8 veces la cuenta celular, sin embargo, el extracto metanólico mostró menor efecto estimulante (2.26 veces), en cambio con la concentración de 0.2 g/mL la actividad hematopoyética de ambos extractos fue similar.

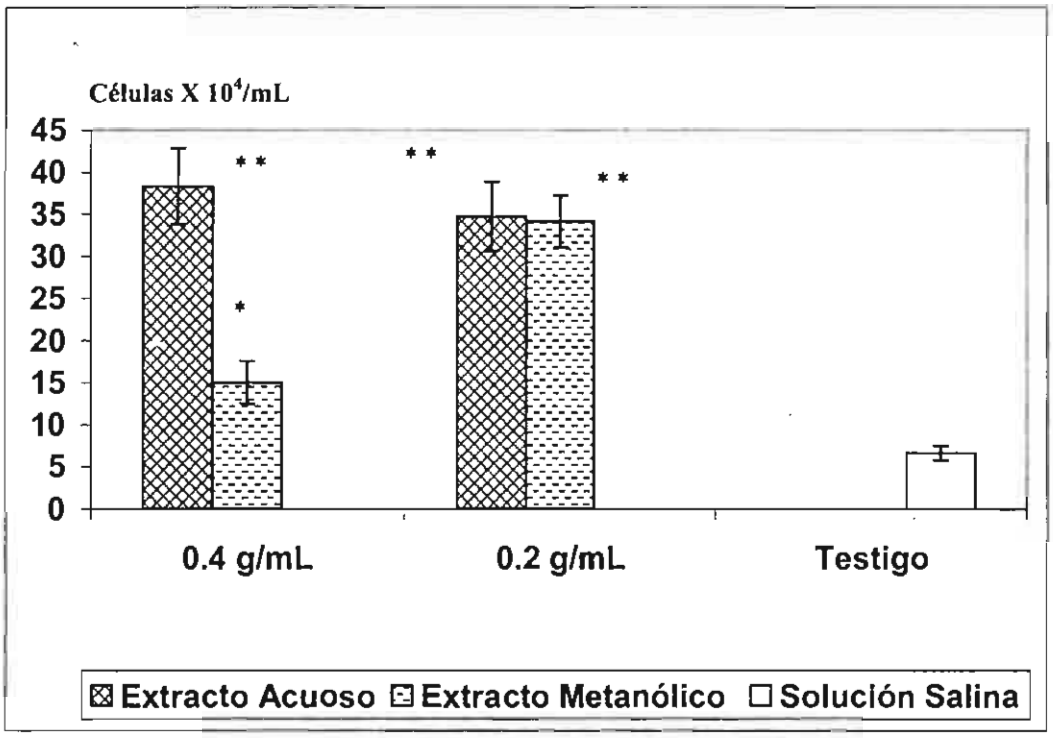


Figura 26. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. adstringens* en cultivo de células de bazo de ratón. Media ± Error estándar, (n=10). *p<0.025, **p<0.001 respecto al testigo.

Actividad hematopoyética de *Amphypterygium adstringens in vivo*

Los ratones inoculados con el extracto acuoso de *A. adstringens* no presentaron variación en la producción de la línea eritroide, evaluada por la concentración de eritrocitos, reticulocitos y el valor del hematócrito (Tabla 10). Sin embargo, a la dosis de 0.2 g/mL se incrementó significativamente la cuenta de leucocitos en relación con el grupo testigo o los grupos tratados con las dosis de 0.1 y 0.05 g/mL.

Respecto a las variaciones en la concentración de plaquetas, únicamente el grupo de ratones que recibió la dosis de 0.05 g/mL presentó un incremento estadísticamente significativo en la concentración de plaquetas (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto del extracto acuoso de *A. adstringens* sobre la hematopoyesis de ratón *in vivo*

Dosis g/mL	Eritrocitos $X10^{12}/L$	Hematócrito (%)	Reticulocitos (%)	Leucocitos $X10^{9}/L$	Plaquetas $X10^{12}/L$
0.2	11.9 ± 0.8	45 ± 4	0.59 ± 0.12	*19 ± 3	1.7 ± 0.32
0.1	12.4 ± 0.4	54 ± 6	0.60 ± 0.15	8 ± 6	1.5 ± 0.21
0.05	2.2 ± 0.6	48 ± 8	0.47 ± 0.05	16 ± 4	*1.9 ± 0.03
Test.	13.8 ± 0.4	56 ± 8	0.58 ± 0.13	12 ± 4	1.6 ± 0.20

Media ± Error Estándar, (n=8). *p<0.05 respecto al grupo testigo.

De los extractos probados de *A. adstringens*, sólo el extracto acuoso de la planta presentó actividad hematopoyética en cultivos de médula ósea. Dicha actividad fue mayor en los cultivos de células de bazo.

Con el propósito de conocer el efecto de estas plantas o sus extractos sobre la hematopoyesis patológica, esta tesis incluyó el diseño y estandarización del modelo de anemia aplástica inducida con benceno, mismo que se utilizará en estudios futuros para evaluar en el animal íntegro la actividad hematopoyética de las plantas aquí estudiadas y de otras especies utilizadas empíricamente para corregir las alteraciones en la producción de células sanguíneas o sus precursoras de la médula ósea. En la siguiente sección se presentan los resultados correspondientes a la inducción de anemia aplástica en ratones mediante la administración de benceno.

INDUCCIÓN DE ANEMIA APLÁSTICA EN RATONES MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE BENCENO

Peso corporal

Todos los ratones tratados con benceno mediante el esquema 1 (una dosis diaria de benceno durante tres días consecutivos), mostraron irritabilidad, alopecia de distintos grados, aletargamiento, adinamia, lesiones cutáneas y la pérdida promedio de 42% de peso corporal respecto al grupo testigo. En los ratones tratados mediante el esquema dos (una dosis de benceno en tres días alternados) la pérdida de peso corporal fue del 12% hasta llegar a las 20 dosis.

Peso esplénico

En el examen postmortem de los ratones tratados con los esquemas 1 y 2 no se observaron alteraciones en los órganos internos, excepto en el bazo cuya masa disminuyó 68% en los ratones del esquema 1 respecto a los controles ($p<0.001$). En el bazo se observaron áreas necróticas desde la zona media del ileo a la región caudal. En los ratones tratados mediante el esquema 2, el bazo perdió 48% de su masa respecto al grupo testigo y no se observaron zonas necróticas.

Concentración de eritrocitos

En los grupos tratados con 10 dosis de benceno no se observaron variaciones en la concentración de eritrocitos (Figura 27). Sin embargo, al llegar a las 15 dosis se observó una disminución del 26% ($p<0.001$) con respecto al grupo testigo, la cual se mantuvo hasta las 20 dosis. En los ratones tratados mediante el esquema 2 no hubo una disminución significativa en la concentración de eritrocitos respecto al grupo testigo, pero disminuyó 28 y 26 % al llegar a las 15 y 20 dosis, respectivamente (Figura 27).

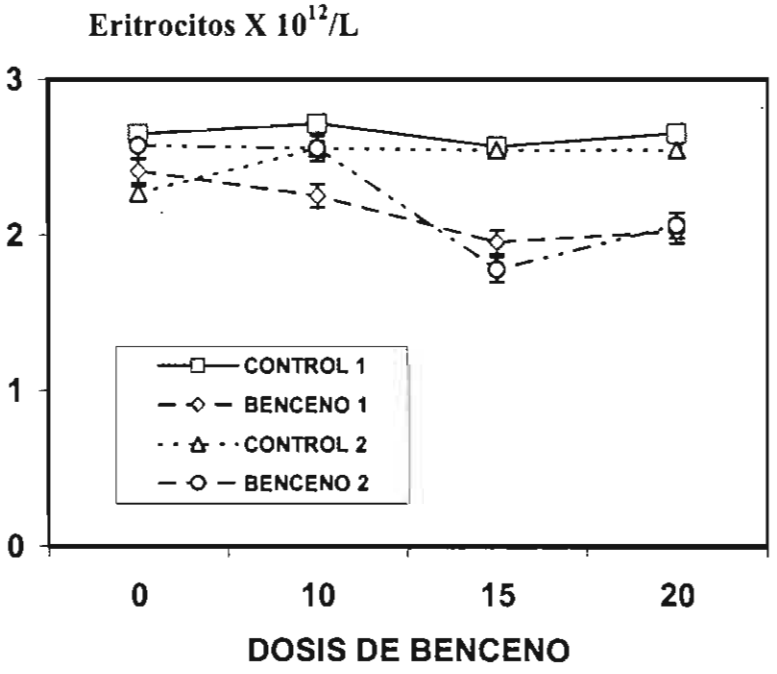


Figura 27. Concentración de eritrocitos en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración Media ± Error estándar , (n=15). $p<0.001$ respecto a los grupos testigos.

Además del cambio en la concentración total de eritrocitos, en los ratones tratados mediante el esquema 1, se observaron anormalidades morfológicas eritroides como poiquilocitosis, anisocitosis, equinocitosis e hipocromía, mientras que en los ratones tratados mediante el esquema 2 no se observaron estas alteraciones morfológicas.

En los ratones tratados con el esquema 1, la concentración media de hemoglobina corpuscular disminuyó 19 y 20% a las 15 y 20 dosis de benceno, respectivamente en comparación con los ratones del grupo testigo (Tabla 11). El valor medio del hematócrito disminuyó significativamente a las 15 y 20 dosis. En contraste, en los ratones tratados con benceno mediante el esquema 1, el volumen corpuscular medio no presentó variación respecto al grupo testigo. Sin embargo, en este mismo grupo la concentración de reticulocitos fue 3.4 veces mayor que en el grupo testigo (Tabla 11).

En los ratones tratados con benceno mediante el esquema 2, los grupos que recibieron 10, 15 y 20 dosis presentaron una disminución de hemoglobina a 21, 32 y 22 %, respectivamente. El hematócrito disminuyó 20% en los animales que recibieron 10 dosis, 43 y 36% en los grupos que recibieron 15 y 20 dosis, respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la administración subcutánea de benceno sobre la concentración de hemoglobin parámetros eritroides

		No. De DOSIS	CONTROL 1	BENCENO 1	CONTROL 2
HEMOGLOBINA		0	11.39 +/- 1.053	11.39 +/- 1.053	9.538 +/- 1.201
	(g / dL)	10	10.16 +/- 0.684	9.96 +/- 0.879	10.874 +/- 1.462
		15	9.91 +/- 0.742	9.31 +/- 0.481	10.853 +/- 1.301
		20	10.31 +/- 0.070	8.25 +/- 1.227*	10.751 +/- 1.068
HEMATÓCRITO		0	51.08 +/- 1.52	38.30 +/- 1.32*	43.98 +/- 2.81
	(%)	10	49.52 +/- 1.99	36.45 +/- 2.60*	40.48 +/- 2.27
		15	45.54 +/- 1.51	38.47 +/- 1.82*	39.27 +/- 2.10
		20	44.80 +/- 0.77	39.98 +/- 2.92*	45.30 +/-2.58
VOLUMEN		0	186.11 +/- 7.22	163.25 +/- 9.38	195.07 +/- 2.82
CORPUSCULAR		10	259.94 +/- 5.76	164.15 +/- 28.4	164.62 +/- 44.31
MEDIO	VCM	15	189.35 +/- 4.31	198.07 +/- 11.6	160.32 +/- 17.71
	(fL)	20	204.31 +/- 17.8	200.0 +/- 38.16	177.04 +/- 12.97
CONCENTRACIÓN	A	0	42.64 +/- 2.47	39.41 +/- 2.53	44.07 +/- 3.46
MEDIA DE HEMOGLOBINA		10	54.12 +/- 3.13	45.29 +/- 7.01	44.55 +/- 8.68
M.H.C.		15	41.07 +/- 2.61	48.11 +/- 5.55	44.30 +/- 3.51
	(pg)	20	46.88 +/- 9.19	40.77 +/- 7.61	53.88 +/- 1.10
HEMOGLOBINA		0	18.70 +/- 1.26	29.85 +/- 1.91	22.70 +/- 3.94
CORPUSCULAR MEDIA		10	20.86 +/- 2.60	27.29 +/- 5.51	27.41 +/- 1.64
		15	21.80 +/- 1.51	24.17 +/- 3.51	27.32 +/- 0.36
(M.C.H.C.) (%)		20	23.34 +/- 0.73	20.59 +/- 2.47	23.71 +/- 1.43
RETICULOCITOS		0	0.008 +/- 0.0002	0.019 +/- 0.0029	0.008 +/- 0.0003
	(%)	10	0.003 +/- 0.0005	0.028 +/- 0.0040	0.007 +/- 0.0003
		15	0.005 +/- 0.0002	0.013 +/- 0.0050	0.006 +/- 0.0002
		20	0.003 +/- 0.0005	0.007 +/- 0.0020	0.005 +/- 0.0002

Media ± Error estándar, (n=15). *p<0.05 respecto al grupo testigo correspondiente.

Plaquetas

En los ratones tratados con benceno mediante el esquema 1 la concentración de plaquetas disminuyó 20% a las 10 dosis. Sin embargo, al llegar a las 20 dosis la cuenta de plaquetas no sólo se recuperó sino que se incrementó 2.83 veces respecto al grupo testigo alcanzando una media de 4.35 X 10^{12}/L (Figura 28). En los ratones tratados con benceno mediante el esquema 2 la concentración de plaquetas se mantuvo sin variación de las 0 a las 10 dosis y disminuyó 55 y 59% a las 15 y 20 dosis, respectivamente, reducción que es altamente significativa respecto al control (Figura 28).

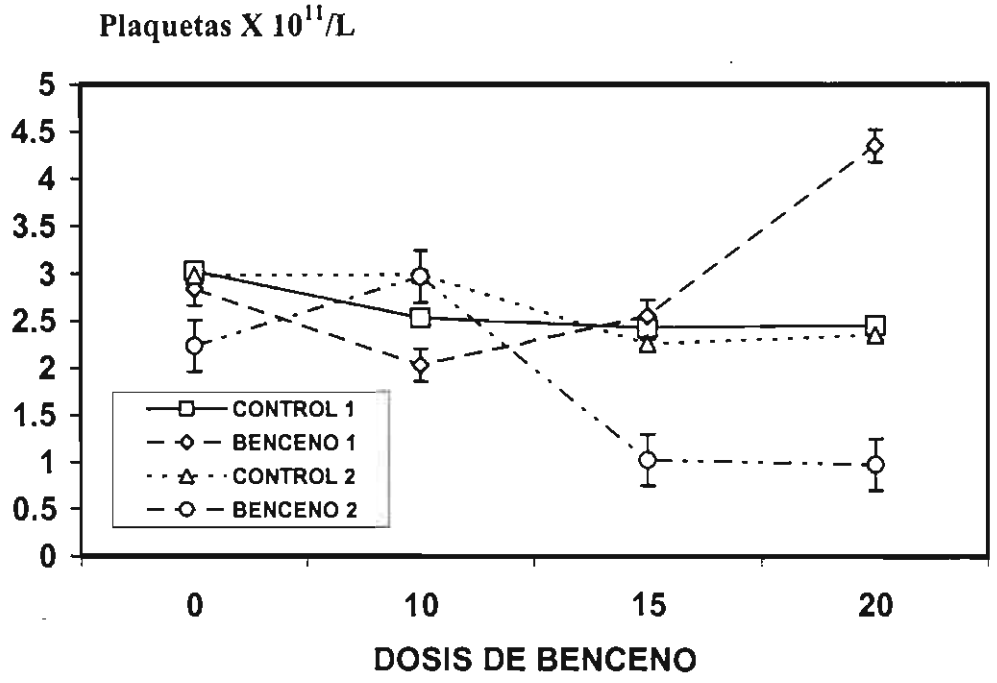


Figura 28. Concentración de plaquetas en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración. Media ± Error estándar, (n=15). p<0.001, a las 15 y 20 dosis respecto al grupo testigo.

Leucocitos

Como se muestra en la figura 29, la cuenta de leucocitos disminuyó significativa y proporcionalmente al número de las dosis administradas, hasta llegar a la dosis 20 donde se tiene la máxima reducción de 80% respecto al grupo testigo.

En los ratones tratados mediante el esquema 1 la concentración de leucocitos disminuyó 66% a las 10 dosis, se incrementó nuevamente a las 15 dosis sin alcanzar los valores normales de concentración y disminuyeron nueva-mente al 60% al llegar a las 20 dosis. La reducción en la cuenta de leucocitos totales en los ratones tratados con benceno fue altamente significativa respecto al grupo testigo (Figura 29).

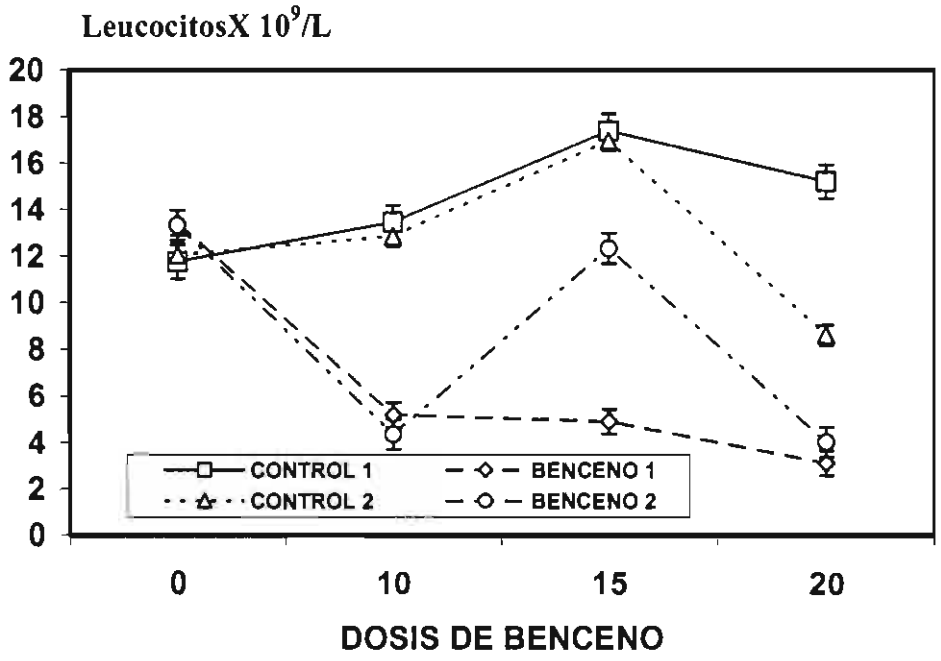


Figura 29. Concentración de leucocitos en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de inducción.
Media ± Error estándar, (n=15), p<0.001 respecto al grupo testigo a las 10, 15 y 20 dosis

Cuenta diferencial

En relación con el grupo testigo, en los ratones tratados con el esquema 1, la cuenta diferencial de leucocitos reportó reducción del 18% en la concentración relativa de linfocitos e incremento promedio del 54, 53 y 57% en la cuenta de neutrófilos, monocitos y eosinófilos, respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Cuenta diferencial de leucocitos de ratones tratados con benceno mediante el esquema uno.

LOTE TRATADO	DOSIS	DOSIS	DOSIS	DOSIS
Células (%)	0	10	15	20
BASÓFILOS	0	0.6	0.6	0
EOSINÓFILOS	0.8	1.4	0.8	1.2
MONOCITOS	1.8	2.9	2.5	2.5
NEUTRÓFILOS	19.9	34.0	48.2	29.7
LINFOCITOS	77.5	61.6	51.8	64.8
LOTE TESTIGO	DOSIS	DOSIS	DOSIS	DOSIS
Células (%)	0	10	15	20
BASÓFILOS	0	0	0	0
EOSINÓFILOS	0.3	0.8	0.8	0.8
MONOCITOS	1.5	1.5	1.1	1.8
NEUTRÓFILOS	21.4	25.3	21.3	19.9
LINFOCITOS	77.2	72.5	76.6	77.5

Cuenta de 500 células por frotis sanguíneo

En los ratones tratados mediante el esquema 2 la cuenta diferencial presentó una reducción del 26, 27 y 24 % en la cuenta de linfocitos a las 10, 15 y 20 dosis, respectivamente, en tanto que al llegar a la dosis 20, la concentración de neutrófilos, monocitos y eosinófilos se incrementó 84, 68 y 77%, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Cuenta diferencial de ratones tratados con benceno mediante el esquema dos.

LOTE TRATADO	DOSIS	DOSIS	DOSIS	DOSIS
Células (%)	0	10	15	20
BASÓFILOS	0	0.1	0.3	0
EOSINÓFILOS	0.3	3.1	3.2	4.6
MONOCITOS	0.7	4.14	2.9	4.4
NEUTRÓFILOS	20.8	35.5	37.6	32.2
LINFOCITOS	78.0	57.6	55.8	59.9
LOTE TESTIGO	DOSIS	DOSIS	DOSIS	DOSIS
Células (%)	0	10	15	20
BASÓFILOS	0	0	0	0
EOSINÓFILOS	0.7	1.2	0.6	0.6
MONOCITOS	1.3	1.7	1.4	1.4
NEUTRÓFILOS	21.7	19.4	21.5	18.4
LINFOCITOS	77.2	77.7	76.4	79.4

Cuenta de 500 células pro frotis sanguíneo

Concentración de células nucleadas de la médula ósea

Todos los ratones tratados con benceno presentaron reducción acentuada de las células nucleadas de la médula ósea femoral. Al comparar estos valores con los de los testigos correspondientes, la disminución fue del 47, 69 y 51 % al llegar a las 10, 15 y 20 dosis, respectivamente (Figura 30).

En los ratones del esquema 2, también se redujo la concentración de células nucleadas de la médula ósea femoral. Dicha reducción representó 42, 33 y 65% y se consiguió con las 10, 15 y 20 dosis, respectivamente (Figura 30).

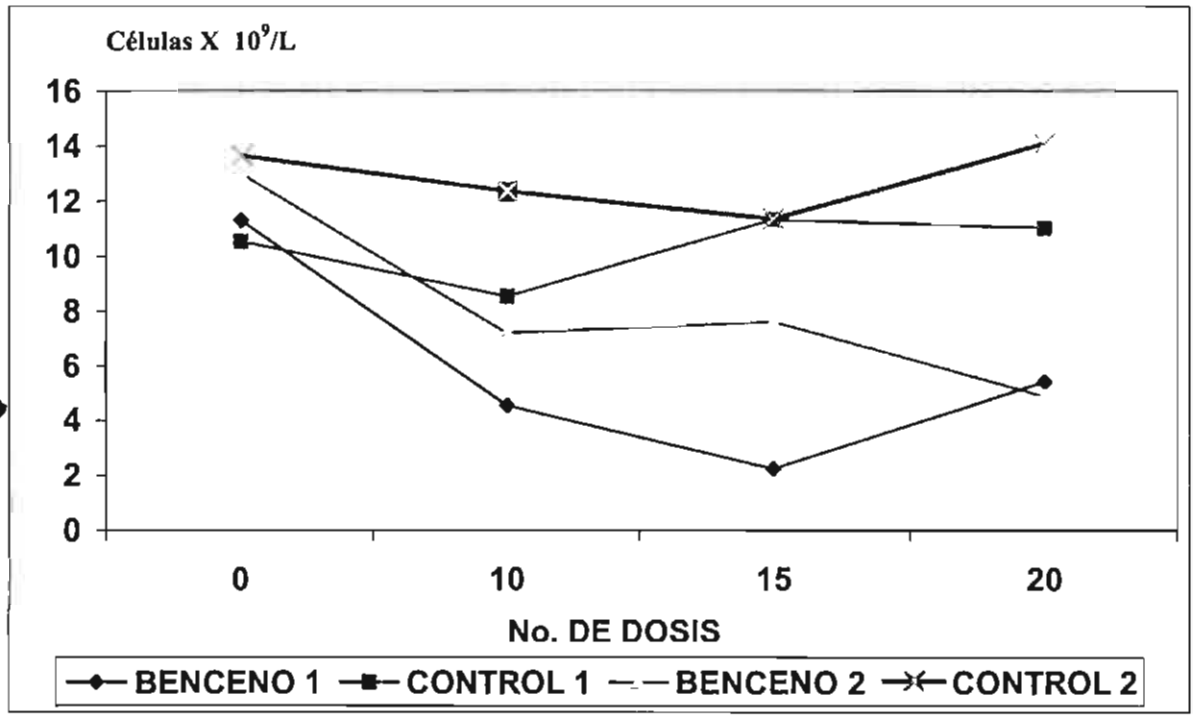


Figura 30. Concentración de células nucleadas en la médula ósea de ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de inducción. Media ± Error estándar, (n=15). $p<0.05$, respecto a los grupos testigos a las 10, 15 y 20 dosis.

En conjunto, los animales tratados con benceno presentaron los signos clásicos de intoxicación aguda por benceno, se observó que el cuadro fue más severo en los ratones tratados con benceno mediante el esquema 1. El análisis histopatológico del bazo de estos animales mostró zonas necróticas, las cuales no se desarrollaron en los ratones tratados mediante el esquema 2 (B2).

DISCUSIÓN

En la literatura científica y en el banco de datos NAPRALERT de la Universidad de Illinois en Chicago (126), no existen reportes respecto a la capacidad de las plantas estudiadas para estimular la producción de células sanguíneas o de sus precursoras mieloides o linfoides. Considerando que se trabajó con extractos crudos no es posible atribuir a ningún compuesto o grupo de compuestos la capacidad hematopoyética de la mayoría de los extractos *in vitro*. Sin embargo, al comparar la composición química reportada para cada una de las plantas(85,90,91,96,112), con excepción de *A californica*, el resto de las especies contienen saponinas.

S. torvum tiene además una serie de hidrocarburos de peso molecular elevado. *P. major,* tiene flavonoides, ácidos grasos, polisacáridos y terpenos, mientras que *A. californica* presenta gran variedad de aceites esenciales como componentes mayoritarios (90), el efecto hematopoyético que presentaron los extractos podría vincularse con la presencia de algunos de estos compuestos en las especies evaluadas.

Cualesquiera que sean los compuestos con actividad hematopoyética en los extractos evaluados y la forma en la que actúan, en las figuras en donde se presenta la actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico en cultivos de médula ósea y de bazo, se observa que en los segundos, el incremento en el número

de células al final del cultivo es varias veces mayor que en la médula ósea, no obstante que en ambos casos se sembró el mismo número de células. Esta diferencia podría atribuirse a que en la médula ósea sólo un 30 a 40% de la población total tienen capacidad de multiplicación, mientras que en el bazo el 70 a 80% de las células son linfocitos B y T con amplia capacidad de proliferación. En las células de la médula ósea el tiempo de duplicación es de 15 a 32 horas, en tanto que en las células del bazo es de 15 horas, mismo que en presencia de mitógenos o de antígenos puede reducirse a 6 horas (127,128). Esta diferencia en la capacidad de proliferación también se ha demostrado *in vivo,* al transplantar células de bazo y de médula ósea en sendos grupos de ratones irradiados letalmente con rayos X (Bentfeld-Barker y Shooley, 1981). Estos autores reportaron que el tiempo de recuperación de los ratones transplantados con células de bazo fue 2.5 veces menor que en los transplantados con médula ósea, lográndose además una celularidad 3 veces mayor (129).

Estos ensayos *in vivo* se correlacionan con nuestros resultados *in vitro*. En los cultivos de médula ósea la cuenta de células se incrementó de 1.6 a 3.10 veces con los extractos acuoso y metanólico, mientras que en los cultivos de bazo el incremento en el número de células fue de 2.25 a 8.5 veces, respectivamente. En los cultivos testigos también se observó diferencia entre la médula ósea y el bazo, la primera incrementó su población 1.7 veces respecto a la concentración inicial, mientras que en el bazo, dicho incremento fue de 4.1 veces. Estos resultados muestran que las condiciones para el desarrollo de ambos tipos de células fueron

adecuadas, ya que aún en ausencia de los extractos pudieron multiplicarse, pero lo hicieron mayormente en presencia de éstos.

En el presente trabajo, la mayoría de los extractos acuoso y metanólico estimularon la proliferación *in vitro* de las células de médula ósea y/o del bazo de ratones sanos, antecedente importante ya que las células proliferantes del bazo son principalmente los linfocitos B y T, estos últimos producen citocinas y otras moléculas que en conjunto estimulan la producción de células de los sistemas hematopoyético e inmune, lo que permite al individuo dar una respuesta inmune adecuada ante la presencia agentes agresores, bien sean microorganismos, células cancerosas, tóxicos químicos, etc, lo que abre la un campo de estudio acerca de los posibles efectos inmunoestimulantes de las plantas empleadas en este estudio.

El que el extracto la mayoría de los extractos acuosos acuoso no haya estimulado la hematopoyesis *in vivo*, podría atribuirse a que la administración por la vía oro-esofágica, expone al producto al ataque de las enzimas de la saliva, del tracto digestivo o del plasma sanguíneo, causando una pérdida de la actividad hematopoyética o bien, siendo animales sanos, cabe suponer que los mecanismos de defensa inespecíficos pudieron reconocer al extracto como material extraño y actuar contra el (130).

Respecto a los ratones tratados con la dosis de 0.05 g/mL del extracto acuoso de *A. californica* que provocó la muerte al 70% de los ratones tratados y que a dosis

de 0.4 y 0.2 g/mL permitió la sobrevivencia de los ratones sin causar alteraciones hematológicas, podría relacionase con la presencia de algún compuesto que se encuentra en baja concentración en el extracto y que tiene un efecto que contrarresta la toxicidad, en la medida en que la muestra (extracto) se diluye, su acción es mínima o se pierde quedando sólo el efecto tóxico del extracto sin oponentes.

Es importante resaltar que, a pesar de que *S. torvum* y *S. aristolochiefolia* son especies ricas en saponinas, no provocaron hemólisis u otros efectos citotóxicos *in vivo*, y que todos los extractos (excepto el clorofórmico de *S. aristolochiaefolia*), estimularon la proliferación de las células hematopoyéticas *in vitro*.

En relación con la inducción de anemia aplástica en ratones mediante la inyección subcutánea de benceno, los animales tratados con este disolvente presentaron los signos clásicos de intoxicación aguda, se observó que el cuadro fue más severo en los ratones tratados con el esquema 1 (B1). El análisis histopatológico del bazo de estos animales mostró zonas necróticas, las cuales no se desarrollaron en los ratones tratados mediante el esquema 2 (B2).

Considerando que el bazo es el órgano que normalmente regula la concentración periférica de eritrocitos y de plaquetas al retirar de la circulación a los elementos viejos o alterados morfológicamente, el daño al bazo por exposición al benceno puede haber impedido esta función, causando la acumulación de plaquetas en los ratones del grupo B1 a las 15 y 20 dosis y dando la imagen de un incremento

en la cuenta de plaquetas, a pesar de que la médula ósea presentó hipoplasia severa (131).

La exposición de los ratones al benceno mediante el esquema 1 alteró la estructura y organización del bazo incapacitándolo para funcionar como un órgano hematopoyético alterno y quedando impedido para producir nuevos elementos sanguíneos, incluidas las plaquetas; a esto se atribuye la acumulación de megacariocitos observada en el bazo, aunque estos megacariocitos de acuerdo con los criterios de clasificación de Levine (132) y Boll (133), no eran productores de plaquetas. Aunado a lo anterior, está la regulación negativa de la línea megacario-cito-plaqueta, lo que en conjunto refuerza un aparente incremento en la concentración de plaquetas a pesar del daño medular causado a los ratones del grupo B1 a las 15 y 20 dosis. Esto es, el incremento en la cuenta de plaquetas se debe más a una estancia prolongada de las mismas en la sangre que a la producción de nuevos elementos.

La cuenta de eritrocitos disminuyó en menor proporción a lo esperado, nuevamente esto podría explicarse por el daño que impidió el retiro de eritrocitos de la circulación, aún cuando presentaban alteraciones morfológicas (acantocitos y equinocitos, esferocitos). La anemia moderada en los ratones del grupo B1 también puede ser debida a una recuperación en el número de eritrocitos circulantes como un mecanismo de regulación compensatoria.

Los ratones tratados con el esquema 1 (B1) mostraron leucopenia severa causada por la toxicidad directa del benceno en la médula ósea. En esta línea, el resultado no está enmascarado por el daño al bazo, ya que la concentración de leucocitos en sangre no está regulada por dicho órgano. Es importante señalar que en todos los 1B grupos (1B10, 1B15 y 1B20, 10, 15 y 20 dosis de benceno, respectivamente) disminuyó la cuenta de leucocitos, lo cual está asociado con un agotamiento de la médula ósea que se manifiesta como una baja en la concentración de células nucleadas totales.

El incremento relativo en la cuenta de granulocitos puede ser debido a un mecanismo de defensa inespecífico, particularmente de los neutrófilos, o por la producción de los metabolitos de oxidación del benceno (hidroquinonas) sobre la línea celular. Experimentalmente, Henschler y colaboradores (134) han demostrado que las quinonas e hidroxiquinonas estimulan *in vivo* e *in vitro* la proliferación y maduración de las células progenitoras de granulocitos/macrófagos, dando origen a unidades formadores de colonias de granulocitos y macrófagos.

Excepto por la trombocitosis observada en los ratones del grupo B1, el benceno produjo en estos animales pancitopenia e hipoplasia severa de la médula ósea. Esto se explica porque los ratones metabolizan el benceno más rápido que otras especies animales dando origen a productos de oxidación (fenoles, catecoles y otros) que son altamente tóxicos para el hígado, bazo y la médula ósea, por lo que los efectos se manifiestan más rápido en esta especie que en otras. Tal como

originalmente lo mostraron Till y McCulloch (11), la médula ósea de ratones tratados con benceno, al ser transplantada en ratones irradiados letalmente, es incapaz de regenerar la hematopoyesis en los ratones receptores (135). Esto demuestra que el benceno daña a las células de la médula de ósea incluyendo a las células tallo hematopoyéticas.

Los ratones tratados con benceno mostraron señales características de anemia aplástica, sin embargo, este cuadro se enmascaró por el daño al bazo, por lo que no se observaron la trombocitopenia y la anemia esperadas.

Los ratones tratados con el esquema 2 mostraron baja en la cuenta de células en la médula ósea lo que provocó una baja en la cuenta de eritrocitos, plaquetas y leucocitos en la sangre. Estos ratones no mostraron el daño del bazo, permitiendo así observar claramente los signos clínicos de la anemia aplástica.

En un tercer experimento (datos no reportados) se utilizó el esquema 2 y los ratones se sacrificaron 48 horas después de completadas las 20 dosis de benceno; otro lote se dejó en observación durante 9 días después de la última dosis. Los resultados con ambos grupos fueron similares (pancitopenia periférica e hipoplasia de la médula ósea), confirmando así que la anemia aplástica inducida con este modelo de estudio persistió por encima del periodo de observación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo están de acuerdo con los de otros autores que han expuesto a los animales al benceno por la vía oral o inhalatoria. Cronkite y colaboradores (136) expusieron ratones a vapores del benceno (32 a 1280 mg/m^3, 10 a 400 ppm) durante 2 semanas, 6 horas por día, 5 días por semana y reportaron que las concentraciones mayores a 320 mg/m^3 provocaron disminución en la cuenta de células de la médula ósea, incluyendo a las células tallo hematopoyéticas. Demostraron además, que las concentraciones de benceno mayores a 960 mg/m^3 originan reducción en el hematócrito, concentración de hemoglobina, eritrocitos, leucocitos, plaquetas y en el porcentaje de linfocitos en la cuenta diferencial. Estos parámetros se revirtieron dentro de las primeras 4 semanas después de que el tratamiento fue suspendido, alcanzando una recuperación del 92% en la celularidad de la médula ósea a las 20 semanas posteriores a la última dosis de benceno. En estudios de término largo donde se expusieron a los ratones a 50 ppm de benceno por más de 6 meses Green y colaboradores observaron leucopenia (137).

La dosis de benceno más baja que causa alteraciones hematológicas en los ratones por vía inhalatoria es de 10 ppm durante 6 horas diarias, 5 días a la semana, durante 25.5 semanas. Esta exposición al benceno causó disminución en la cuenta de los eritrocitos y leucocitos en sangre periférica y de células nucleadas del bazo e impidió la capacidad de éstas para desarrollar unidades formadoras de colonias de eritrocitos (UFC-E) *in vitro* (138).

La administración del benceno por vía oral también causa hematotoxicidad en ratas y ratones, además de alteraciones gástricas severas. Huff y colaboradores (139) administraron el benceno por vía oral en concentraciones entre 25 y 400 mg/kg 5 días por semana durante 120 días. Los autores reportaron leucopenia y agotamiento de los linfocitos B en el bazo de las ratas y ratones tratados con el disolvente.

Nuestros resultados con los ratones tratados mediante el esquema 2 están de acuerdo con los reportados por Baarson y colaboradores (138), Ward y colaboradores (140), quienes indujeron hipoplasia severa de médula ósea administrando de 32 a 960 ppm de benceno durante 25 y 13 semanas, respectivamente.

En este trabajo se inyectaron 3.7 ppm de benceno logrando acumular 37, 74, 110 y 148 ppm (130, 260, 390 y 520 mg/Kg) a las 2, 4, 5 y 7 semanas, respectivamente, sin causar la muerte a los animales antes de la conclusión del experimento. Esto demuestra que el esquema 2 para la inducción de anemia aplástica parece ser más adecuado que otros tratamientos previamente descritos, incluyendo al esquema 1 ensayado en este trabajo. Así mismo, refuerza los resultados de Tice y colaboradores (53) quienes encontraron que la mielotoxicidad causada la administración diaria de benceno en los ratones, es más severa que la administración discontinua (en días alternados).

Utilizando modelos experimentales para la inducción de la anemia aplástica con benceno puede contribuir al entendimiento del desarrollo de la enfermedad en el hombre, ya que en estudios toxicológicos y epidemiológicos realizados con trabajadores de la industria de los plásticos (neumáticos), la incidencia de anemia aplástica y de otras enfermedades es 33% más alta que en cualquier otro grupo de individuos (141,142). Paustenbach y colaboradores (143) argumentaron que es la exposición de término corto a altas concentraciones de vapores del benceno y el contacto con la piel lo que incrementó del 25 al 50% la dosis de benceno absorbida por los trabajadores. En otras palabras, no son las dosis acumulativas sino la exposición de término corto (5-6 horas) a concentraciones altas (50-500 ppm) las que causan las alteraciones hematológicas observadas en este grupo de trabajadores. En este grupo de individuos, la incidencia de todo tipo de cánceres fue 300 veces mayor que en otro grupo de trabajadores.

En el presente trabajo se estableció un modelo experimental para inducir anemia aplástica mediante la administración subcutánea de benceno, cuyos resultados son similares a los obtenidos cuando se induce la enfermedad por vía inhalatoria. En este trabajo se demostró que la anemia aplástica puede ser inducida mediante la inyección de benceno en tiempos más cortos y utilizando equipo más barato, permitiendo así una mejor y más certera administración del disolvente que permita observar el desarrollo de la enfermedad y las manifestaciones clínicas conforme a los niveles de exposición al benceno. Queda por determinar si el daño es

irreversible o reversible y su estabilidad o derivación a leucemia u otras alteraciones hematológicas severas.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró la actividad hematopoyética *in vitro* de cinco plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la anemia.

De los extractos acuosos, el de *P. major* presentó la mayor actividad estimulante en cultivo de médula ósea y el de *S aristolochiaefolia* presentó la menor actividad.

Los extractos metanólicos de *P. major*, *S. torvum* y *S. aristolochiaefolia*, presentaron efecto hematopoyético similar o igual a los correspondientes extractos acuosos. Los extractos metanólicos de *A. californica* y de *A. adstringens* no estimularon la proliferación de células de la médula ósea *in vitro*.

Los extractos acuoso y metanólico de *A. californica* indujeron incrementos en la concentración de células de bazo 8.6 y 8.8 veces, respectivamente, seguidos en orden decreciente por los extractos de *P. major*, *A. adstringens*, *S. torvum* y S. *aristolochiaefolia*

Únicamente los extractos clorofórmico y hexánico de *S. torvum* y de *A. californica* estimularon la proliferación de células de la médula ósea *in vitro*.

En los ensayos *in vivo*, sólo se observó incremento en la concentración de leucocitos en los ratones tratados con las dosis de 0.4, 0.2 y 0.05 g/mL del extracto acuoso de *S. torvum*. En los tratados con la dosis de 0.2 g/mL del extracto acuoso de *A. adstringens* se incrementaron las cuentas de leucocitos y de plaquetas.

En los ratones tratados con benceno mediante el esquema 2 se produjo el cuadro característico de la anemia aplástica, mientras que en los animales tratados con el esquema 1, se produjo esplenotoxicidad que enmascaró las variaciones hematatológicas producidas.

PERSPECTIVAS

En trabajos futuros se podrá determinar si los extractos que presentaron actividad hematopoyética *in vitro*, restauran la hematopoyesis en ratones con anemia aplástica inducida con benceno.

Queda por conocer si además de la actividad mitogénica de los extractos sobre los linfocitos del bazo de ratón, también los capacita para la síntesis y liberación de citocinas al medio de cultivo, lo que respaldaría el uso popular como agentes inmunoestimulantes.

El fraccionamiento químico de los extractos hematopoyéticos, permitirá aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad hematopoyética de las plantas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carow, C E., Hangoc, G., Broxmeyer, H. E., 1993. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: An effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* **81**, 942-949.

2. Zon, L. I., 1995. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**, 2876-2891.

3. Erslev, A. J., Lichtman, M. A., 1991. Structure and function of marrow. In: Hematology, 4th edition. Williams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J., Lichtman, M. A. (Eds.). McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp. 37-47.

4. Cotran, R .S., Kumar, V., Collins, T., 1999. Robbins Pathològic basis of disease. 6th edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 601-604.

5. Van der Loo, J. C .M., Ploemacher, R .E., 1995. Marrow -and spleen- seeding of all murine hematopoietic stem cell subsets are decreased by preincubation with hematopoietic growth factors. *Blood* **85**, 2598-2606.

6. Morrison, S .J., Wright, D .E., Cheshier, S .H., Weissman, S. H., 1997. Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Current Opinion in Immunology* **6**, 216-221.

7. Clark, S., Kamen, R., 1987. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, **236**, 1229-1237.

8. Dzierzak, E., Medvinsky, A., 1995. Mouse embryonic hematopoiesis. *TIG* **11**, 359-366.

9. Orlic, D., Fischer, R., Nishikawa, S., Nienhuis, A. W., Bodine, D. M., 1993. Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. *Blood* **82**, 762-770.

10. Kessinger, A., Sharp, J. G., 1997. Tissue engineering of the hematopoietic stem cell. In: Principles of tissue enginnering. Lanza, R., Langer, R., Chick, W., (Eds.). Landes Company, pp.563-573.

11. Till, J. E., McCulloch, E. A., 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* **14**, 213-222.

12. Shofield, R., Lajtha, L. G., 1969. Graft size considerations in the kinetics of the spleen colony development. *Cell Tissue Kinetics* **2**, 147.13-15.

13. Hasthorpe, S., Hodgson, G. 1977. Proliferation of erythroid and granulocyte progenitors in the spleen as a function of stem cell dose. *Cell Tissue Kinetics*

10, 43-46.

14. Visser, J. W. M., VanBekkum, D. W., 1990. Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present. *Experimental Hematology* **18**, 248-256.

15. Wright, E. G., Lord, B. I., Dexter, T. M., Lajtha, L. G., 1979. Mechanisms of haematopoietic stem cell proliferation control. *Blood Cells* **5**, 247-258.

16. Tubiana, M., Frindel, E., 1982. Regulation of pluripotent stem cell proliferation and differentiation: The role of long-range humoral factors. *Journal of Cell Physiology* Suppl. **1**, 13-21.

17. Popp, D. M., Popp, R. A., 1979. Hemopoietic stem cell heterogeneity: Use of cell cycle-specific drugs to look for age-associated alterations. *Mechanisms of Ageing and Development* **9**, 441-462.

18. Rizzoli, V., Carlo-Stella, C., 1995. Stem cell purging: An intriguing dilemma. *Experimental Hematology* **23**, 296-302.

19. Reddy, P. V., Tiarks, C, Y., Pang, L., Wuu, J., Hsieh, Ch-Ch., Quesenberry, P. J., 1997. Cell cycle analysis and synchronization of pluripotent hematopoietic progenitor stem cells. *Blood* **90**, 2293-2299.

20. Morstyn, G., Brown, S., Gordon, M., Crawford, J., Demetri, G., Rich, W., McGuire, B., Foote, M., McNiece., 1994. Stem cell factor is a potent synergistic factor in hematopoiesis. *Oncology* **51**, 205-214.

21. Nakeff, A., Daniels-McQueen, S., 1976. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: Colony-forming Unit megakaryocyte (CFU-Meg.). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **151**, 587-592.

22. Burgess, A. W., Metcalf, D., Russel, S. H. M., Nicola, N.A., 1980. Granulocyte/ macrophage, megakaryocyte, eosinophil, and erythroid colony-stimulating factors produced by mouse spleen cells. *Biochemical Journal* **185**, 301-314.

23. Nakeff, A., Velasco, L. R., 1981. Megakaryocytic proliferation in vitro. *Blood* Suppl. **51**: 75.

24. Metcalf, D., 1985. Multi-CSF-dependent colony formation by cells of a murine hemopoietic cell line: Specificity and action of multi-CSF. *Blood* **65**, 357-362.

25. Iscove, N. N., Williams, N., Guilbert, L. J., 1982. Molecules stimulating early red cell, granulocyte, macrophage, and megakaryocyte precursors in culture: Similarity in size, hydrophobicity, and charge. *Journal of Cell Physiology*. Suppl **1**, 65-78.

26. Burgess, A. W., 1984. Growth factors and hemopoietic cell differentiation. *Advances in Cell Culture* **3**, 231-256.

27. Ihle, J. N., Weinstein, Y., 1986. Immunological regulation of hematopoietic/ lymphoid stem cell differentiation by interleukin 3. *Advances in Immunology* **39**, 1-48.

28. Naparstek, E., Wagner, K., Harrison, D., Greenberger, J. S., 1987. Hematopoietic effects of continuous intravenous infusion of mice with growth factors produced by the WEHI-3 cell line. *Acta Haematologica* **77**, 1-5.

29. Yamamoto, R., Lin, L. S., Lowe, R., Warren, M. K., White, T. J., 1990. The human lung fibroblast cell line, MRC-5, produces multiple factors involved with megakaryocytopoiesis. *Journal of Immunology* **144**, 1808-1816.

30. Sachs, L., Lotem, J., 1994. The network of hematopoietic cytokines. *Society for Experimental Biology and Medicine* **153**, 170-175.

31. Reid, L. M., 1997. Stem cell/lineage biology and lineage-dependent extracellular matrix chemistry: Keys to tissue engineering of quiescent tissues such as liver. In: Principles of tissue enginnering. Lanza, R., Langer, R., Chick, W. (Eds.). R.G. Lander Company, 481-514.

32. Weisbart, R. H., Golde, D. W., 1997. Physiology of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors in host defense. *Hematology Oncology Clinics of North America* **3**, 401- 409.

33. Neidhart, J. A., 1993. Hematopoietic cytokines. Current use in cancer therapy. *Cancer*. Suppl. **72**, 3381-3386.

34. Kaushansky, K., 1994. The mpl-ligand: Molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development *Stem Cells* Suppl. **12**, 91-97.

35. Baatout, S., 1997. Thrombopoietin. A Review. *Haemostasis* **27**, 1-8.

36. McDonald, T. P., Cottrel, M. B., Clift, R. E., Cullen, W. C. and Lin, F. K. 1987. High doses of recombinant erythropoietin stimulate platelet production in mice. *Experimental Hematology* **15**, 719-721.

37. Ebert, B. L., Bunn, F., 1999. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* **94**, 1864-1877.

38. Han, Z. C., 1994. Identification of a murine high-proliferative-potential colony-forming cell (HPP-CFC) capable of producing a number on megakaryocyte and replating for secondary HPP-CFCs in culture. *Journal of Laboratory of Clinical Medicine* **23**, 610-616.

39. Brindell, R. A., Brandt, J. E., Straneva, J. E., Srour, E. F., Hoffman, R., 1989. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* **74**, 145-151.

40. Avraham, H., 1993. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* **11**, 499-510.

41. Hoffbrand, V., Pettit, J. E., 2000. Clinical Hematology. 3rd edition. Mosby. London, pp 1-5.

42. Fabian, I., Kletter, Y., Mor, S., Geller-Bernstein, C., Ben-Yaakov, M., Volovitz, B., Golde, D.W., 1992. Activation of human eosinophil and neutrophil functions by haematopoietic growth factors: comparisons of IL-I, IL-3, IL-5, and GM-CSF. *British Journal of Haematology* **80**, 137-143.

43. Fardoun-Joalland, D., Texeira-Lebrun, B., Lenormand, M., Dzondo-Gadet, M., Vannier, J .P., 1995. Synergism of interleukin-12 and interleukin-3 on development of hematopoietic progenitors. *European Journal of Haematology* **54**, 172-175.

44. Harai, K., Miyamasu, M., Takaishi, T., Morita, Y., 1997. Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Critical Reviews of Immunology* **17**, 325-352.

45. Marty, J., 1992. Aplastic anemia (including pure red cell aplasia and congenital dyserytrhopoietic anemia). In: Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis. 2nd edition. F.A. Davis Company. Philadelphia, pp. 107-114.

46. Ruíz-Argüelles, J. G., (Ed.). 1994. Hipoplasias y displasias medulares. En: Fundamentos de Hematología. Editorial Médica Panamericana. México, pp. 105-115.

47. Heimpel, H., Heit, W., 1984. Aplastic anemia: pathogenesis and clinical aspects. In: Pathology of the bone marrow. Lennert, K., Hübner, K. (Eds.). Gustav Fischer Verlag. Sttutgart, pp. 217-224.

48. Fohlmeister, I., Fischer, R., Mödder, B., Rister, M., Schaefer, H-E. 1985. Aplastic anaemia and the hypocellular myelodysplastic syndrome: histomorphological, diagnostic, and prognostic features. *Journal of Clinical Pathology* **38**, 1218-1224.

49. Camitta, B. M., Storb, R., Thomas, D. E., 1982. Aplastic anemia. Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *The New England Journal of Medicine* **306**, 645-652 & 712-718.

50. Hoffrand, A. V., Petit, J. E., 1993. Essential hematology. 3rd edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp. 121 - 135.

51. Young, N. S., Maciejewski, J., 1997. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. Review Article. *The New England Journal of Medicine* **336**, 1365-1372.

52. Goldstein, B. D., Witz, G., 1992. Benzene. In: Environmental Toxicants: Human exposures and their health effects. Lippman, M., De Van Nostrand Reinhold. New York, pp. 76 - 79.

53. Tice, R. R., Luke, C. A. and Drew, R. T., 1989. Effect of exposure route, regime, and duration of benzene-induced genotoxic and cytotoxic bone marrow damage in mice. *Environmental Health Perspectives* **82**, 65 - 74.

54. Farris, G. M., Robinson, S. N., Gaido,K. W., Wong, B. A., Wong, V. A., Leonard, L., Shah, R., 1996. Effects of low concentrations of benzene on mouse hematopoietic cells in vivo: A preliminary report. *Environmental Health Perspectives* **104**, 1275-1276.

55. Krishna, G., Nath, J., Petersen, M., Ong, T., 1987. Cyclophosphamide-induced cytogenetic effects in mouse bone marrow and spleen cells In vivo and In vivo/ In vitro assays. *Teratogenic Cancer Mutations* **7**, 183-195.

56. Brown, K. E., Tisdale, J., Dunbar, C. E., Barret, A. J., Young, N. S., 1997. Hepatitis associated aplastic anemia. *The New England Journal of Medicine* **336**, 1059-1064.

57. Gill, D. P., Jenkins, V. K., Kempen, R. R., Ellis, S., 1980. The importance of pluripotential stem cells in benzene toxicity. *Toxicology* **16**: 163-171.

58. Stutte, H. J. 1984. Pathology of anemia. In: Pathlogy of the bone marrow. Lennert, K., Hübner, K. (Eds.). Gustav Fischer Verlag, Sttutgart, pp. 286-302.

59. Hocking, W. G. 1995. Aplastic anemia. In: Manual of clinical hematology. Mazza, J. J. (Ed.). Little Brown, and Company. Boston, pp. 60-69.

60. Ohara, A., Kojima, S., Hamajima, N., Tsuchida, M., Imashuku, S., Ohta, S., Sasaki, H., Okamura, J., Sugita, K., Kigasawa, H., Kiriyama, Y., Akatsuka, J., Tsukimoto, I., 1997. Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. *Blood* **90**, 1009-1013.

61. Góngora-Biachi, R. A., Hurtado-Monroy, R., López-Karpovich, X., González-Llaven, J., 1982. Granulopoyesis normal y patológica. *Revista de Investiga-ción Clínica* **34**, 187-196.

62. Richardson, M. D., Shankland, G. S., 1991. Pathogenesis of fungal infection in the non-compromised host. In: Fungal infection in the compromised patient. Warnock, D. W., Richardson, M. D. (Eds.).John Wiley & Sons. New York. pp. 1-25.

63. To, L. B., Haylock, D. N., Simmons, P. J., Juttner, C. A., 1997. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* **89**, 2233-2258.

64. Morales, P.M., Sánchez, V.E., Chávez, S.G., Guillén, M.C., Gómez, M.E. y Pizutto, C.J. (1992). Avances en el tratamiento de la anemia aplástica. *Gaceta Médica de México* **51**, 399-409.

65. Tong, J., Bacigalupo, A., Piaggio, G., Figari, O., Sogno, G., Marmot, A., 1991. In vitro response of T cell from aplastic anemia patients to antilymphocyte globulin and phytohemagglutinin: Colony-stimulating activity and lymphokine production. *Experimental Hematology* **19**, 312-316.

66. Urlich, T. R., del Castillo, J., Watson, L. R., Yin, S., Garnick, M. B., 1990. In vivo hematologic effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **75**, 846-850.

67. Weiss, M., Moldawer, L. L., Schneider, M., 1999. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* **93**, 425-439.

68. Kaushansky, K., 1997. Thrombopoietin. The primary regulator of platelet production. *Transmission Electron Microscopy* **8**, 45-50.

69. Storb, R., Thomas, D., Buckner, C. D., Appelbaum, F. R., Clift, R. A., Deeg, H. J., Doney, K., Hansen, J. A., Prentice, R. L., Sanders, J. E., Stewart, P., Sullivan, K. M., Witherspoon, R. P., 1984. Marrow transplantation for aplastic anemia. *Seminars in Hematology* **21**. 27-35.

70. Lopez, M., Mortel, O., Pouillart, P., Zucker, J. M., Fechtenbaum, J., Douay, L., Palangie, T., Michon, J., Salmon, D., Gorin, N. C., 1991. Acceleration of hemopoietic recovery after autologous bone barrow transplantation by low doses of peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplantation* **7**, 173-181.

71. Lee, J. H., Klein, H. G., 1995. Collection and use of circulating hematopoietic progenitor cells. *Hematology and Oncology Clinics of North America* **9**, 1-22.

72. Shpall, E. J., Cagnoni, P. J., Bearman, S. I., Ross, M., Jones, R. B., 1997. Peripheral blood stem cells for autografting. *Annual Review of Medicine* **48**, 241-251.

73. Querol, S., García, J. 1997. Potencial hematopoyético de las células progenitoras de la sangre de cordón umbilical. *SANGRE* **42**, 105-11.

74. Regidor, C., Monteagudo, D., Somolinos, N., Posada, M., Lamana, Ma. L., Garaulet, C. 1997. Obtención y procesamiento de la sangre de cordón umbilical para transplante. *SANGRE* **42**, 117- 122.

75. Flake, A. W., Zanjani, E. D., 1999. In utero hematopoietic stem cell transplantation: Ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood* **84**, 3653-3659.

76. Amo, S. del., 1979. Plantas medicinales del estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigación sobre Recursos Bióticos (INIREB). Xalapa, Veracruz. México.

77. Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, O., López, M. E., 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. México.

78. Martínez, M., 1967. Las plantas medicinales de México. 6a edición. Ediciones Botas. México.

79. González, L., Rivero, S. E., Villalpando, E., 1994. Salud y medicina en el norte de México. En: Plantas medicinales de México. Introducción a su estudio. Estrada, L. E. (Ed.). Universidad Autónoma de Chapingo. pp.143-167.

80. López, S. C., (Recopilador). 1993. Lecturas Chiapanecas VI. Gobierno del Estado de Chiapas. México.

81. Baytelman, B., 1993. Acerca de plantas y curanderos. Etnobotánica y antropología médica del estado de Morelos. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México.

82. Cano, A. L. M., 1997. Flora medicinal de Veracruz I. Inventario etnobotánico. Universidad Veracruzana. México.

83. Domínguez, X. A., Alcorn, J. B., 1985. Screening of medicinal plants used by huastec mayas of northeastern Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* **13**, 139-156.

84. Argueta, V. A., Cano, A. I. M., Rodarte, M. E., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. I. Instituto Nacional Indigenista. México.

85. Agrawal. P. K., Mahmood, U., Thakur, R, S. , 1989. Torvonin-B. A spirostane saponin from *Solanun torvum. Heterocycles* **29**, 1895-1897.

86. Nakanishi, K., Sasaki, S., Kinag, A. K., Goh, J., Karisawa, H, Ohashi, M., Goto, M., Watanabe, J, Ykotani, H., Matsumura, Ch., Togashi, M., 1965. Phytochemical survey of malaysian plants preliminary chemical and pharmacological screening. *Chemical Pharmacy Bulletin* **13**, 882-890.

87. Mahmood, U., Shukla, Y, N., Tahaku, R. S., 1982. Non-alkaloidal constituents

from *S. torvum* leaves. *Phytochemistry* **22**, 167-169.

88..Konoshima, T., 1996. Anti-tumor promoting activities of triterpenoid glycosides Cancer chemoprevention by saponins. In: Saponins used in traditional and modern medicine. Waller, G. R., Yamasaky, K. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **404**, 101-110.

89. Hersch-Martínez, P., 1997. Medicinal plants and regional traders in Mexico. Physiographic differences and conservational challenge. *Economic Botany* **51**, 107-120.

90. Kuklinski, C., 2000. Farmacognosia. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. p. 333.

91. Romo de Vivar, A., 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Editorial Limusa. pp. 204-206.

92. Márquez, A. C., Lara, O. F., Esquivel, R. B., Mata, E. R., 1999. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 107-109.

93. Davini, E., Lavarone, C., Trogolo, C., Aureli, P., Pasolini, B., 1986. Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands, *Journal of Ethnopharmacology* **1**, 169-193.

94. Instituto Nacional Indigenista (INI)., 1994. Flora medicinal indígena de México. III. México. p. 1483.

95. Estevez, A., Marquina, G., Polanco, N., Contreras, D., Vergara, A., Perez, I., 1976. Antitumor substances from twenty-two cuban plants. *Revista Cubana de Farmacología* **10**,. 223-227.

96. Samuelsen, A. B., 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology* **71**, 1-21.

97. Caffey-Moquin, M., 1985. Yerba del manso. An evaluation. Symposium on management and utilization of arid land plants. 78-82.

98. Timbrook, j., 1990. Ethnobotany of chumash Indians, California, based on collection by John P. Harrington. *Economic Botany* **44**, 236-253.

99. Moore, M. 1977. Los remedios de la gente. Privately Publisher, Santa Fe, New Mexico. p.133.

100. Instituto Nacional Indigenista (INI)., 1994. Flora Medicinal Indígena de México I. p. 51.

101. Childs, R. F., Cole, J. R., 1965. Phytochemical and pharmacological investigation of *Anemopsis californica*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **54**, 789-791.

102. Encarnación, R., Keer, S., 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* **31**, 181-192.

103. Acharya, R. N., Chaubal, M. G., 1968. Essential oil of *Anemopsis californica*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**, 1020-1022.

104. Sanvordeker, D. R., Chaubal, M. G., 1969. Essential oil of *Anemopsis californica* part II. Minor constituents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**, 213-1217.

105. The Merck Index. 9th Editon. Merck & Co. Inc. New Yersey. 1976.

106. Lara, O. F., Márquez, A. C., 1996. Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p.43.

107. Ramírez, C. C. 1991. Plantas de la región náhuatl del centro de Guerrero. Centro de Investigación y Estudios Superiores en Antropología Social México. p. 85.

108. Domínguez, X. A., Franco, R., García, S., Porras, Ma. E., Vázquez, G., Amezcua, B., 1983. Plantas medicinales mexicanas XLVIII. Estructura del ácido instipolinácico separado de la corteza del cuachalalate (*Amphyterygium adstringens*) Schl. *Revista Latinoamericana de Química* **14**, 99-100.

109. Mata, R., 1993. Chemical studies and biological aspects of some mexican plants used in traditional medicine. In: Recent advances in phytochemistry Vol. 27. Phytochemical potential of tropical plants. Downum, K. R., Romeo, J. T., Stafford, H. A. Plenum Press. New York. pp. 41-62.

110. Soriano-García, M., Toscano, R. A., Ortíz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, S., Barios, H., Yuste, F., 1987. Structure and sterochemistry of the methyl ester of (5α, 13α, 14β, 17α,20S,24Z)-3oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticandien oic acid). *Acta Crystallographyca* C. **43**, 990-992.

111. Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G. 1989. Alkylanacardic acids from *Amphypterygium adstringens. Planta Medica* **55**, 579.

112. Watson, W. H., Domínguez, X. A., Vázquez, G., García, S. 1987. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphypterygium adstringens. Revista Latinoamericana de Química* **18**, 89-90.

113. Dorantes-Mesa, S., 1989. Nuevas perspectivas en la anemia aplástica. *Gaceta Médica de México* **125**, 341-343.

114. U.S. Department of health and human services. 1997. Toxicological profile for benzene. Public health service agency for toxic substances and disease registry. 295-303.

115. Bello-González, S. A., Nuñez-Villegas, N. N., Márquez-Vázquez, J. L., Vázquez-Meraz, E, E. 1997. Pancitopenia periférica. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **54**, 288-294.

116. Jiménez, C. A., Dorantes, M. S., Pacheco, C., Sulkes, A., Calderon, F. E., 1987. Pancitopenia e inhalación de cemento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **44**, 102-107.

117. Vázquez-Meraz, J. E., 1999. Transplante de médula ósea. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **56**, 571-581.

118. Chmelik, S., 1999. Chinese herbal secrets. Avery Publishing Group. New York. p. 132.

119. Chevallier, A. 1996. The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley Limited. London. pp. 233-234.

120. Tapia, A. R., Castillo, R. V., Velasco, L. R. 1998. Efecto de *Solanum torvum* Sw. sobre la proliferación celular in vitro. VII Congreso Latinoamericano de Botánica. Cuaderno de Resúmenes. p. 144.

121. Vives, C. J. L., Aguilar, B. J. L., 1997. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 2ª edición. Masson, S. A. Barcelona. pp. 91-118.

122. Lanotte, M. 1984. Terminal differentiation of hemopoietic cell clones cultured in tridimensional collagen matrix: *in situ* cell morphology and enzyme histochemistry analysis. *Biology of the Cell* **50**, 107-120.

123. Reyes, C. P., 1990. Bioestadística aplicada. Editorial Trillas. S. A. de C. V. México.

124. Nakeff, A., 1981. Examination of culture conditions for optimizing the growth of megakaryocyte colonies. In: Megakaryocyte biology and precursors: In vitro cloning and cellular properties. Evatt, B. L., Levine, R. F., Williams, N. T. (Eds.). Elsevier/North-Holland. New York. pp. 111-125.

125. Aguilar, C. A., Zolla, C., 1982. Plantas tóxicas de México. Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional Herbolaria del IMSS. p. 271.

126. Natural Product Alert (NAPRALERT) database. The University of Illinois at

Chicago. USA.

127. Tice, D. G., Davey, F. R., 1983. T lymphocyte colonies stimulated by different mitogens require diverse culture conditions. *Experimental Hematology* **5**, 394-401.

128. Croseen, P. E., Durie, B. G. M., Trent, J. M., 1986. Generation time (GT) of human bone marrow cells cultured in the CFC-gm assay. *Cell Tissue Kinetics* **19**, 533-588.

129. Bentfeld-Barker, M. E., Schooley, J. C., 1981. Comparison of the effectiveness of bone marrow and spleen stem cells for platelet repopulation in lethally irradiated mice. *Experimental Hematology* **9**, 379-390.

130. Smolen, J. E., Boxer, L. A., .1991. Functions of neutrophils. In: Hematology. 4th edition. Williams, J. W., Beutler, E., Erslev, A. J. and Litchman, M. A. (Eds.). McGraw-Hill Publishing Company. New York, pp. 780-794.

131. Harmeming, D. M. (Ed.)., 1992. The red blood cell: Structure and function.In: Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 2nd editon. F. A. Davis Company. Philadelphia. pp. 3-20.

132. Levine, R. F., 1981. Criteria for the identification of megakaryocytes. In Megakaryocyte biology and precursors: In vitro cloning and cellular properties. Evatt, B. L., Levine, R. F., Williams, N. T. (Eds.). Elsevier/North - Holland. New York. pp. 203-215.

133. Boll, I.T.M., Domeyer, C. Bührer, C., 1997. Human megakaryoblastic proliferation and differentiation events observed by phase-contrast cinematography. *Acta Haematologica* **97**,144-152.

134. Henschler, R., Glatt, H. R., Heyworth, C. M., 1996. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro and in vivo. *Environmental Health Perspectives* **104**, 1271-1274.

135. Gill, D. P., Jenkins, V. K., Kempen, R. R., Ellis, S., 1980. The importance of pluripotential stem cells in benzene toxicity. *Toxicology* **16**, 163-171.

136. Cronkite, E. P. Drew, R. T. Inoue, T., Bullis, J. E., 1985. Benzene hematotocitoxicity and leukemogenesis. *American Journal of Industrial Medicine* **7**, 447–456.

137. Green, J. D., Snyder, C. A., Lobve, J., Goldstein, B. D., Albert , R. E., 1981a. Acute and chronic dose response effect of benzene inhalation on the peripheral blood, bone marrow and spleen cells of CD_1 male mice. *Toxicology and Applied*

Pharmacolology **59**, 204-214.

138. Baarson, K., Snyder, C. A., Albert, R. E., 1984 Repeated exposures of $C_{57}B_1$ mice to 10 ppm inhaled benzene markedly depressed erythropoietic colony formation. *Toxicology Letters* **20**, 337- 342.

139. Huff, J. 1983. National Toxicology Program. Technical report on toxicology and carcinogenesis. Studies of benzene (CAS No. 71-43-2) in F344/N Rats and $B_6C_3F_1$ Mice (Gavage Studies). Research Triangle Park, NC: National Intitutes of Environmental Health Sciences.

140. Ward, C. O., Kuna, R. A., Snyder, N. K., Alsaker, R. D., Coate, W. B., Craig, P. H., 1985. Subchronic inhalation toxicity of benzene in rats and mice. *American of Journal of Industrial Medicine* **7**, 457-458.

141. Crump, K., Allen, B., 1984. Quantitative estimates of risk of leukemia from occupational exposure to benzene. OSHA Docket H-059b. Exhibit 152 (Appendix B) Washington DC.

142. Rinsky, R. A., Smith, A. B., Hornug, R., Filloon, R. G., Young, R. J., Okun, A. H., Landrigan, P. J., 1987. Benzene and leukemia: an epidemiologic risk assessment. *The New England of Journal of Medicine* **316**, 1044-1050.

143. Paustenbach, D. J., Proce, P. S., Ollison, W., Blank, C., Jernigan, J. D., Bass, R. D., Peterson, H. D., 1992. Reevaluation of benzene exposure for the pliofilm (rubberworker) cohort (1936-1976). *Journal of Toxicology and Environmental Health* **36**, 177-231.

Artículos científicos en los que se incluyen algunos resultados del presente trabajo de tesis.

1. Rodolfo Velasco Lezama., Eduardo Barrera Escorcia., Antonio Muñoz Torres., Rafaela Tapia Aguilar., Claudia González, Ramírez., Mario García Lorenzana., Verónica Ortiz Monroy., Miguel Betancourt Rule. 2001. A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice. *Toxicology* **162**, 179-191.

2. Rodolfo Velasco Lezama, Rafaela Tapia Aguilar, Rubén Román Ramos, Elisa Vega Avila and Ma. Salud Pérez Gutiérrez. 20002. Enviado para publicación en la revista Journal of Ethnopharmacology.

ELSEVIER

Toxicology 162 (2001) 179–191

TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/toxicol

A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice

Rodolfo Velasco Lezama [a,*], Eduardo Barrera Escorcia [b], Antonio Muñoz Torres [b], Rafaela Tapia Aguilar [a], Claudia González Ramírez [a], Mario García Lorenzana [a], Verónica Ortiz Monroy [b], Miguel Betancourt Rule [a]

[a] *Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Michoacán y La Purísima s/n, Col. Vicentina, Apartado Postal 55-535, Mexico, D.F. CP 09340, Mexico*

[b] *Laboratorio de Biorregulación, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus-Iztacala, Mexico, Mexico*

Received 24 November 2000; accepted 15 February 2001

Abstract

Long-term exposure to benzene vapors is associated with hematological diseases such as leukemia, lymphoma and aplastic anemia. CD_1 male mice were randomly assigned to six groups: $1B_{10}$, $1B_{15}$, $1B_{20}$, $2B_{10}$, $2B_{15}$, and $2B_{20}$. 1B mice were administered 2 ml/kg (1940 mg/kg) subcutaneous injection (in the dorsal region) of benzene 5 days a week, and 2B mice were exposed 3 days a week (Monday, Wednesday and Friday) until a total of 10, 15 and 20 doses were completed. About 48 h after treatment completion, leukocyte, erythrocyte, and bone marrow cells were counted, and spleen histopathology was analyzed. $1B_{15}$ and $1B_{20}$ mice showed lethargy and irritability, 80% body and 42% spleen weight loss ($P < 0.001$), while body and spleen weight loss were less severe in 2B mice (12 and 48%, respectively). After exposure to 20 benzene doses, $1B_{20}$ and $2B_{20}$ mice showed decreased hemoglobin concentrations, and erythrocyte, leukocyte and bone marrow cell counts (37, 34, 80 and 50%, respectively in group $1B_{20}$; $P < 0.001$; and 12, 48, 62 and 62%, respectively in group $2B_{20}$). Thrombocytopenia occurred only in group 2B. Both benzene-treatment schemes caused aplastic anemia, however, the disease was masked by spleen toxicity in group 1B. Scheme 2 allowed mice survival and caused less non-hematological effects. We establish here a reproducible and inexpensive experimental model to induce aplastic anemia in mice by subcutaneous injection of 2 ml/kg benzene, using two short-term treatment schemes. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Aplastic anemia; Benzene; Hematotoxicity

1. Introduction

Benzene is one of the most widely used industrial chemical agents. It is used as a solvent for paint, glue, varnish, house-cleaning agents and in

* Corresponding author.
E-mail address: velr@xanum.uam.mx (R. Velasco Lezama).

0300-483X/01 $ - see front matter © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved
PII: S0300-483X(01)00371-7

2. Materials and methods

One hundred and twenty male CD_1 8–12-month-old mice were used for the study, provided by of the National Autonomous University of Mexico, Iztacala Campus. The animals were weighed and placed in cages (five mice per cage) where food and water were available ad libitum. Two different exposure schemes were tested using 2 ml/kg (1940 mg/kg) benzene doses diluted 1:1 in corn oil (J.T. Baker).

2.1. Scheme 1

Sixty mice were randomly assigned to two different groups, a control group (1C) where 30 mice were injected subcutaneously (in the dorsal region) with corn oil; and an experimental group (1B), where 30 mice were treated with benzene + corn oil by subcutaneous injection (dorsal region), where three subgroups of 10 mice ($1B_{10}$, $1B_{15}$ and $1B_{20}$) were treated daily from Monday to Friday until 10, 15 or 20 doses were completed, respectively.

2.2. Scheme 2

Sixty mice were randomly assigned to two different groups, a control group (2C) where 30 mice were treated with corn oil, and an experimental group (2B) where the mice were treated with benzene. Three subgroups of 10 mice ($2B_{10}$, $2B_{15}$ and $2B_{20}$) were treated with corn oil + benzene three times a week (Mondays, Wednesdays and Fridays) to reach a total of 10, 15 and 20 doses.

Two days after the last dose was administered, the animals were weighed, anesthetized with chlorofom and ensanguined by cardiac puncture. Blood was collected in EDTA tubes for cytometric determinations, animals were examined for skin lesions, and necropsies were performed. The spleen was isolated, weighed and placed in Bouin's solution for histopathologic analysis. The femur was isolated to obtain bone marrow and to quantify total nucleated cells.

2.2.1. Blood cell counts

Whole blood was diluted in Gower's liquid (1:200) in red cell pipettes for erythrocyte (RBC) counts, and blood was diluted in Turk's solution (1:20) for leukocyte (WBC) quantification. Cells were counted with a hemocytometer by light microscopy. Blood was diluted with 1% ammonium oxalate (1:200) for platelet quantification using a phase contrast microscope (Simmons, 1980). Blood smears were prepared and stained with Wright stain and New Methylene blue for differential leukocyte and reticulocyte counts respectively. Hemoglobin concentrations were determined by the cyanometahemoglobin method, and the hematocrit was quantified by capillary centrifugation (Williams et al., 1991).

2.2.2. Total nucleated cell quantification in bone marrow

After the femur was removed, the epiphyses were cut, and 1 ml of saline solution was injected into the medullary channel. Cell suspensions were diluted with Turk's solution (1:20) and cells were quantified with a hemocytometer and a light microscope (Nakeff and Daniels-McQueen, 1976).

2.2.3. Spleen histopathology

The spleen was dissected, weighed, placed in Bouin's solution and then washed in 70% ethanol and dehydrated in 80, 96 and 100% ethanol. The spleen was then washed with a 1:1 mix of 100% ethanol and xylene, washed twice in absolute xylene, and finally embedded in paraffin. Serial 7 μm sagital cuts were obtained and stained with hematoxylin–eosin (Humason 1979). Cuts were analyzed at 100X with a light microscope and an image analyzer.

2.2.4. Data analysis

Data are expressed as mean ± standard error (S.E.). Comparisons among groups were performed using analysis of variance (ANOVA) and LSD Fisher tests. R:RAO 0.001 was considered statistically significant.

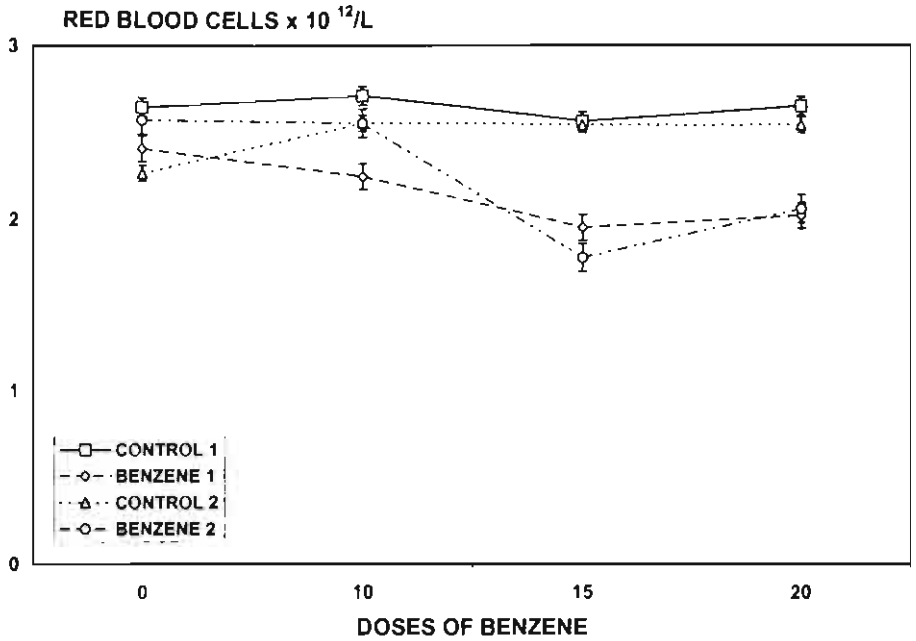


Fig. 1. Erythrocyte (RBC) counts of mice exposed to 10, 15 and 20 (2 ml/kg) benzene doses according to treatment 1 (Benzene 1), and treatment 2 (Benzene 2). Values are expressed as mean ± standard error.

or parenchyma-penetrating trabeculae were observed. However, the capsule showed folds resulting from the loss of spleen volume (Fig. 6B). Overall, red pulp organization showed no alterations although zones were found with increased numbers of megakaryocytes (Fig. 6D) as compared with controls (Fig. 6A).

3.2. Scheme 2

Benzene treated mice showed the same clinical and behavioral signs reported for group B1, although they tended to be less severe. Group $2B_{20}$ showed 12% corporal weight loss as compared with controls (2C) (Table 1), and postmortem examination revealed considerable spleen size and weight loss 48% as compared with controls, although no necrotic areas were observed.

3.2.1. Erythrocyte, platelet and leukocyte counts

Mean RBC counts decreased 26.5% after exposure to 15 benzene doses ($P < 0.001$) as compared with controls, and decreased 14.21% after exposure to 20 doses (Fig. 1). Furthermore, groups $2B_{10}$, $2B_{15}$ and $2B_{20}$ showed significantly decreased mean hemoglobin concentrations 21, 34 and 22 g/dl, respectively (Table 2). After exposure to 20 doses, the mean hemoglobin concentration was 34% lower than in controls, while the mean hemoglobin concentration of all benzene treated mice was 25% lower than the controls, with a highly significant difference: $P < 0.001$ (Table 2).

The mean hematocrit decreased 30% in group $2B_{10}$, 43% in group $2B_{15}$ and 36% in group $2B_{20}$ as compared with the controls ($P < 0.001$). Furthermore, the MCV decreased in groups $2B_{10}$, and $2B_{15}$ but not in group $2B_{20}$, while MCHC and MCH did not vary significantly (Table 2). Mean reticulocyte counts did not show significant variations in groups $2B_{10}$ and $2B_{15}$, but decreased significantly in group $2B_{20}$ (40% as compared with controls).

Mean platelet counts remained unaltered with the administration of 10 doses, but decreased significantly in mice exposed to 15 and 20 doses (55 and 59%, respectively, as compared with controls; $P < 0.001$ Fig. 2).

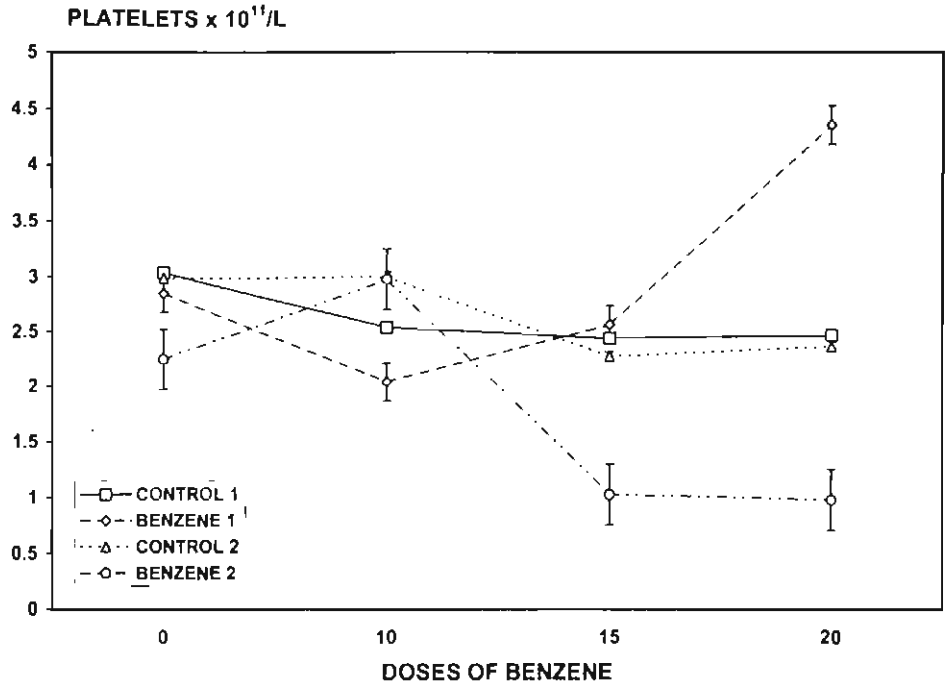


Fig. 2. Peripheral platelet counts of mice exposed to 10, 15 and 20 benzene doses (2 ml/kg) according to treatment 1 (Benzene 1), and treatment 2 (Benzene 2). Values are expressed as mean ± standard error.

in the group treated with scheme 1. Spleen histopathology showed macroscopic necrotic areas in B1 mice, but not in the B2 group. Since the spleen normally regulates peripheral erythrocyte and platelet counts by removing aged or damaged cells, benzene exposure may have impaired this function, causing accumulation of circulating platelets in spite of the severe bone marrow hypoplasia and the impaired platelet and megakaryocyte production (Tavasoli, 1991).

Furthermore, benzene exposure altered the spleen structure and organization so that it was unable to function as an alternate hematopoietic organ with platelets, liberation impaired, and megakaryocytes accumulation in the spleen. These megakaryocytes were not platelet producers according to the classification criteria of Levine, (1981), Boll et al., (1997). Nonetheless, as peripheral platelet count levels are regulated by negative feedback, the high number of circulating platelets not induced platelet withdrawal by the spleen.

Although benzene exposure decreased RBC counts, the decrease was not as expected. Spleen toxicity probably impaired efficient erythrocyte removal, in spite of the presence of morphologically altered RBC. Furthermore, erythrocytopenia may have induced a compensatory erythrocyte recovery under the feedback regulation (Erslev, 1990).

1B mice showed severe leukopenia caused by the direct toxicity of benzene on bone marrow. This is most evident since the spleen does not regulate peripheral leukocyte counts. It is important to remark that in all 1B groups ($1B_{10}$, $1B_{15}$ and $1B_{20}$) decreased leukocyte counts were associated with bone marrow depletion. The relative increase of granulocyte counts may have been due to a non-specific defense response, particularly of neutrophils, or to a response to the specific stimulus of benzene metabolites such as hydroquinones, which stimulate the granulocyte/macrophage progenitor cells (CFU-GM) both in vivo and in vitro (Henschler et al., 1996).

Except for thrombocytosis, scheme 1 induced generalized pancytopenia and severe bone marrow hypoplasia. Mice metabolize benzene generating

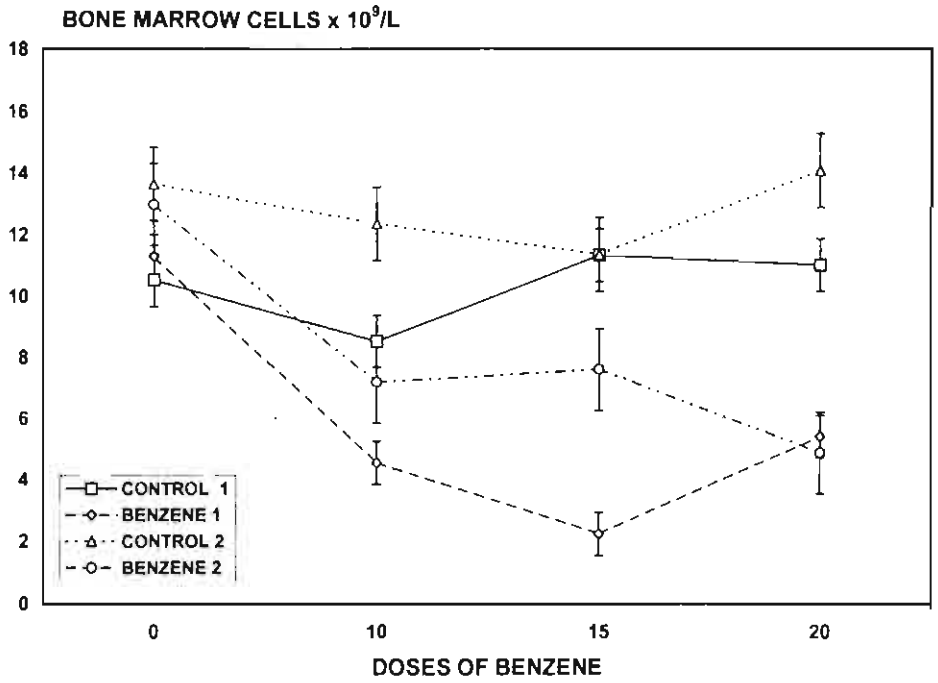


Fig. 4. Differential WBC counts of mice exposed to 10, 15 and 20 benzene doses (2 ml/kg) according to treatment 1 (Benzene 1, 4B), treatment 2 (Benzene 2, 4D), and in control groups (4A and 4C). Values are expressed as mean ± standard error.

The lowest dose of benzene reported to cause hematological alterations in mice is the inhalation of 10 ppm benzene for 6 h/day, 5 days a week, during 25.5 weeks. This benzene exposure decreased peripheral erythrocyte and leukocyte counts, decreased nucleated cell counts in spleen and inhibited the ability to develop erythrocyte CFUs in vitro (Baarson et al., 1984).

Oral route benzene exposure also causes hematotoxicity in rats and mice, in addition to severe gastric alterations. Huff (1989) forced mice to ingest benzene in corn oil at concentrations ranging from 25 to 400 mg/kg, 5 days a week during 120 days. This caused leukopenia and lymphoid depression in spleen B-lymphocytes in rats and mice.

Our results in benzene-exposed mice according to scheme 2 are in accordance with those reported by Baarson et al. (1984), Ward et al. (1985) who induced severe bone marrow hypoplasia (aplastic anemia) by administering 32–960 ppm benzene during 25 and 13 weeks, respectively. We administered 3.7 ppm for injection, causing cumulative doses of 37, 74, 110 and 148 ppm (130, 260, 390 and 520 mg/Kg) in 2, 4, 5 and 7 weeks, respectively, without causing death in any of the benzene exposed animals by the end of the experiment. This demonstrates that our induction scheme seems to be more adequate than other earlier described treatments, and than scheme 1 described here. This is in accordance with the findings of Tice et al. (1989), who found benzene-induced myelotoxicity in mice is more severe when administered discontinuously as compared with continuous exposure.

Aplastic anemia models using experimental animals have made great contributions to understand the development of the disease. In humans, there are many epidemiological or toxicological studies describing the effects of benzene on chronically exposed pliofilm workers, such as those of Crump and Allen (1984), Rinsky et al. (1987), Paustenbach et al. (1992). The latter authors concluded that short term exposure to high benzene vapor concentrations, and contact with the skin increased the benzene dose absorbed by workers

25–50%. In other words, it is not the cumulative doses but short term exposure (5–6 h) at high concentrations (50–500 ppm) that cause SNC and hematological alterations in humans. This contrasts with our findings in mice.

Although both benzene treatment schemes tested here induced aplastic anemia, scheme 1 caused additional side effects that modified the manifestation of the disease, while scheme 2 induced aplastic anemia without causing deaths (all experimental animals survived) and with less non-hematological effects.

This study has established an experimental model to induce aplastic anemia by the subcutaneous injection of benzene in mice, with similar results to those found in mice exposed to benzene by inhalation. Therefore, aplastic anemia may be induced by benzene injection in a shorter time and

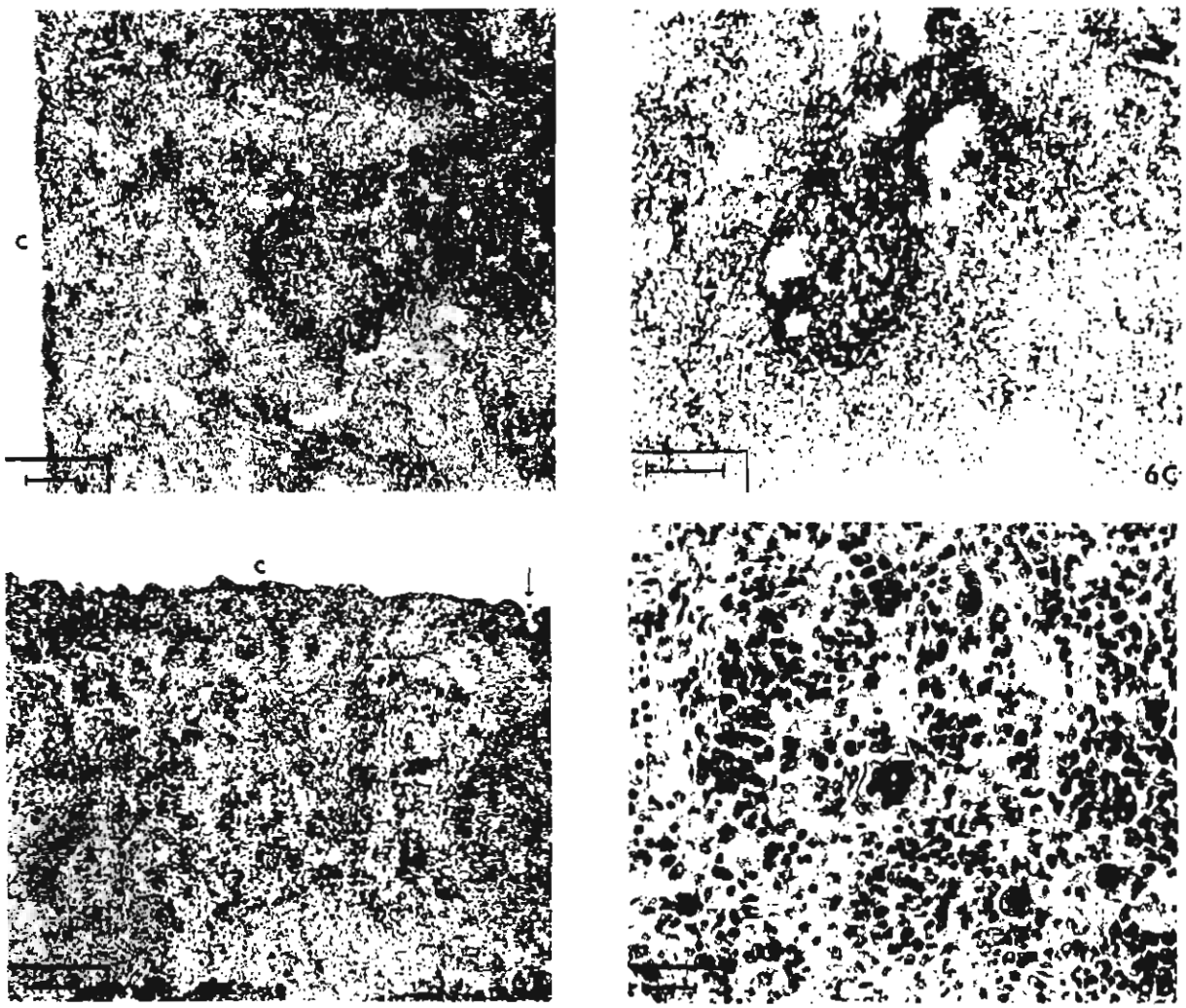


Fig. 6. (A) Spleen of a control group mouse. The white pulp (WP) shows typical arrangement with folicula (F) and red pulp with Billroth strands (BS) and sinus (S). The capsule is normal and suggests spleen turgency. H-E 100X. (B) Spleen of a mouse exposed to 20 doses of benzene according to scheme 1. Follicula show loss of definition in the white pulp (WP), and the red pulp shows a great number of megakaryocytes (M). The capsule shows no anomalies, but is folded (+). H-E 100X. (C) Spleen of a mouse exposed to 20 doses of benzene according to scheme 2. The follicular zones of the white pulp show necrotic areas (N). H-E 100X. (D) The red pulp shows several megakaryocytes (M). H-E 1000X.

Simmons, A., 1980. Technical Hematology, Third ed. J.B. Lippincott, Philadelphia, pp. 48–57.

Snyder, C.A., Goldstein, B.D., Sellakumar, A., et al., 1978. Hematotoxicity of inhaled benzene to Sprague Dawley rats and AKR mice at 300 ppm. J. Toxicol. Environ. Health 4, 605–618.

Tavasoli, M., 1991. Structure and functions of the spleen. In: Williams, J.W., Beutler, E., Erslev, A.J., Litchman, M.A. (Eds.), Hematology, Fourth ed. McGraw-Hill, New York, pp. 54–62.

Tice, R.R., Luke, C.A., Drew, R.T., 1989. Effect of exposure route, regime, and duration of benzene -induced genotoxic and cytotoxic bone marrow damage in mice. Environ. Health Perspect. 82, 65–74.

Till, J.E., McCulloch, E.A., 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Res. 14, 213.

Wallace, L., 1996. Environmental exposure to benzene. An update. Environ. Health Perspect. 104, 1129–1136.

Ward, C.O., Kuna, R.A., Snyder, N.K., Alsaker, R.D., Coate, W.B., Craig, P.H., 1985. Subchronic inhalation toxicity of benzene in rats and mice. Am. J. Ind. Med. 7, 457.

Wanner, H.V., 1993. Sources of pollutants in indoor air. In: Environmental carcinogens methods of analysis and exposure measurement, vol. 12 Seifert, B., van de Wiel, 75–77.

Williams, J.W., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M.A., 1991. Hematology, Fourth ed. McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp. 1695–1734 International Edition.

Woo, L.W., Johnson, T.J., Gardner, D.C., 1989. Inhibitory effects of benzene metabolites on nuclear DNA synthesis in bone marrow cells. J. Toxicol. Environ. Health 26, 277–291.

Young, N.S., Maciejewski, J., 1997. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. New Engl. J. Med. 336, 1365–1372.

Journal of ETHNOPHARMACOLOGY

D.D. Soejarto
PCRPS College of Pharmacy M C 877, University of Illinois at Chicago, 833 S. Wood St., Chicago, IL 60612, U.S.A.
Phone: 312-996-8889 Fax: 630-627-9764 E-mail: <dds@uic.edu> and <soejarto39@hotmail.com>

DS 562

With Compliments

March 30 2002

Prof. R.V. Lezama
Dpto Cie. Salud. Div. Ciencias Biologicas y Salud
Universidad Autonoma Metropolitana
Col Vicentina. Iztapalapa. Av. Michoacan x La Purisima s n
Mexico. D F CP 09340
MEXICO

Dear Prof Lezama

This is to inform you that your manuscript entitled

"Effect of Plantago major on cell proliferation in butro" by R. Velasco et al.

has been received by the Editors Your manuscript has been assigned a code DS-562, and will be submitted for review.

You will be informed on the status of your manuscript, after the comments of the referees have been received

Please use the code DS-562 for all inquiries concerning your manuscript.

Sincerely yours,

D. D. Soejarto
Editor

Effect of *Plantago major* on cell proliferation *in vitro*

R. Velasco[a], R. Tapia[a], R. Román[a], E. Vega[a], M.S. Pérez[b]

[a]Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186. Col, Vicentina. México, D.F. CP 09340.

[b]Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud. México, D.F. 04960 .

- E-mail address: velr@xanum.uam.mx (R. Velasco)

Abstract

Plantago major (Plantaginaceae) is popularly used as antitumoral, antimicrobial and blood purifier. We obtained aqueous, methanol, chloroform and hexane aerial part extracts by reflux heating for 3 hours. We added 0.4, 0.2, 0.1, and 0.05 mg/mL extract dilutions to CD_1 mice bone marrow and spleen cultures incubated at 37°C for 72 hours. The cell number was determined. These extracts were also added to *Escherichia coli, Bacillus subtilis* and *Candida albicans* cultures, and, 1, 10, and 100 μg/mL methanol extract dilutions were added to HTC-15, OVCAR, UISO and KB cell line cultures. Doses of 0.4 and 0.2 mg/mL aqueous and methanol extracts increased the bone marrow cell concentration 2.7 and 3.1 fold, respectively and increased the spleen cell concentration 3.3 and 6.3 fold, respectively ($p<0.001$). Aqueous extract inhibited *B. subtilis* growth from 78 to 21%; the hexane extract inhibited the growth of *E. coli,* and the methanol and chloroform extracts weakly inhibited the growth of *B. subtilis* and *E. coli*, respectively. Methanol extract (1 μg/mL) decreased the UISO and OVCAR cell concentrations to 59% and 82%,respectively. We demonstrate for the first time that *P. major* has hematopoietic and lymphopoietic activity *in vitro.*

Keywords: Hematopoiesis; *Plantago major*; Bone Marrow; Cytotoxicity; Antibacterial activity

1. Introduction

Plantago major (Plantaginaceae) is a perennial or annual plant which grows up 10 to 30 cm, with oval shaped leaves that come out of the ground forming a rosette and wrapping part of the stem. It has small whitish-greenish flowers set in a large tassel, resembling a slender ear of corn. Its seeds are small and oval shaped (0.4-0.8 x 0.8-1.5 cm) with a slightly bitter taste, located in capsules (8 to 16 seeds per capsule), which become sticky when hydrated in humid environments. When humid, the capsules adhere to both animals and humans, facilitating their distribution (Samuelsen, 2000).

This plant originated in northern Europe and Central Asia, and is currently distributed worldwide. In its wild form, it grows in hot, semi-hot and mild or medium temperature climates, from sea level to up to 3500 m altitude (Argueta et al., 1994). Leaf infusions are popularly consumed for its depurative, diuretic, febrifuge, bile secretion stimulating and antitumoral effects. It is used externally to wash wounds, to treat skin infections, and crushed leaves are used as hemostatic (Martínez, 1967; Chiej, 1982; Cáceres et al., 1987a; De Feo and Senatore, 1993). Furthermore, experimental studies have proven that this plant has analgesic, and antiinflamatory (Núñez et al.,1997), antifungal (McCutcheon et al., 1994), antibacterial (Moskalenko, 1986) and antigiardiasic (Ponce-Macotela et al., 1994) properties.

Plantago major was introduced to Mexico by the Spaniard conquers, and its therapeutic applications are recorded in several documents and codices of the XVI century. In these documents the plant was recommended to treat dysentery, swellings, burns, and to cure bites of dogs affected with rabies (Somolinos, 1990).

In México this plant is known as llantén, antén, and cancerina. It is popularly used to treat bacterial and amebiasic diarrhea; its leaves are applied on wounds and bites of poisonous animals, for cicatrization, and seed infusions are used to treat ascariasis and constipation (Martínez, 1967; Cano, 1997). Its aerial parts (leaves and seeds) are cooked and applied as foments to treat swellings, pimples, supurant wounds (Márquez et al., 1999). In the State of Chiapas, México, aerial part infusion is drunk to treat cancer, gastrointestinal infections and to purify blood (INI, 1994).

Even though it is frequently used to treat anemia, the hematopoietic properties of this plant have not been studied. Considering the popular use of *Plantago major* as antimicrobial, antitumoral, blood purifier and regenerator, and to treat different types of anemia and leukemia, we analyzed the effect of aerial part extracts of *P. major* on the proliferation of hematopoietic cells obtained from healthy mice, human transformed cells, bacteria and yeasts *in vitro.*

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The whole plant was collected in the town of San Pablo Pahuatlán, Puebla, in June 1997, and authenticated by Dr. Jorge Santana Carrillo. A voucher specimen of the plant (52718) is stored at the Herbarium of the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Iztapalapa.

2.2. Preparation of extracts

The plant was dry at room temperature, protected from dust and sunlight. The aerial parts (leaves and seeds) were pulverized manually, and then 500 g were heated using 10 liters of water, methanol, chloroform or hexane (Baker), under reflux for 3 hours, the extracts were filtered and the last three extracts were evaporated to dryness under reduced pressure, at 35°C in a Savant Speed Vac Plus SC210A concentrator (Farmingdale, USA). The aqueous extract was lyophilized. Afterwards, 0.40, 0.20, 0.10 and 0.05 g/mL dilutions were prepared using 0.85% saline solution for the aqueous and methanol extracts, and corn oil for the chloroform and hexane extracts. These dilutions were used to test biological activity *in vitro*.

2.3. Experimental animals

Experiments were carry out with 8 to 12 week-old male CD_1 mice from the UAM-Xochimilco animal facility were used for the experiments, placing four mice per box. The animals were fed *ad libitum*, using water sterilized by filtration through 0.22 μm Millipore membranes (USA).

2.4. Hematopoietic activity in bone marrow cultures

Mice were sacrificed by cervical dislocation, the femur was isolated under sterile conditions, the epiphysis were cut, 1 ml of physiologic saline solution was injected through the bone marrow channel and the cells were collected in a 4.8 ml criotube (Nunc, USA). A cell suspension aliquot was diluted with Turk´s solution (1:20) in white cell pipettes to count the total number of nucleated cells with the aide of a hematocytometer under a clear field microscope. Cell viability was determined using 0.2% trypan blue (Hudson and Hay, 1980). Cell concentration was adjusted to 2.0×10^6 cells/mL using Leibovitz medium (L-15). Afterwards, 0.1 ml of this suspension were added with 0.60 ml of L-15, pH 7.2 (Gibco-BRL), 0.20 ml of inactivated horse serum (Sigma, Saint Louis, MO) and 0.1 ml of the extract dilution to be tested. Then, 0.50 ml of this mixture were placed in 24-well plates (Nunc, USA) and incubated at 37°C for 72 hours in a humid atmosphere with 5% CO_2 and 95% air. Control cultures free of extract were prepared simultaneously. The cultures were harvested and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at room

temperature, cells were washed twice with phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.2, the cell pellet was resuspended in 0.5 ml PBS, and cells were counted with the aide of a hemocytometer by clear field microscopy, (Metcalf et al., 1975). Each extract was assayed in triplicate.

2.5 Hematopoietic activity in spleen cultures

Mice were sacrificed by cervical dislocation, the spleen was isolated, placed on a metal mesh and mechanically dispersed using tweezers and scissors. 30 ml α-MOPS medium {(Minimum Essential Medium-/3-[-Morpholino]-propanesulfonic acid), (Gibco-BRL)} were added with 10% horse serum (In vitro-Mex.), and an antibiotic solution (100 IU/mL Penicillin, 100 μl/mL Streptomycin; Sigma, Saint Louis, MO). Cells were dispersed with the aide of a pipette, washed with α-MOPS medium, and centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes at room temperature. The cell pellet was resuspended in α-MEM medium (Sigma,Saint Louis, MO), pH 7.O complemented with 10% horse serum. Cells were counted in a hemocytometer, and cell viability was determined using 0.2% trypan blue. Cell concentration was adjusted to 2.0 X 10^6 cells/mL in α-MEM medium (Hudson and Hay, 1980). One volume of this suspension was added with 6 volumes α-MEM medium, 2 volumes of inactivated horse serum (Sigma, Saint Louis, MO), one volume of aqueous or methanol extract (0.4 and 0.2 g/mL) and then incubated at 37°C for 48 hours in a humid atmosphere with 5% CO_2 and 95% air. Cells were then harvested, washed with PBS, pH 7.2 centrifuged twice at 3000 rpm, and finally resuspended in 0.5 ml

PBS. Cells were counted with a hemocytometer (Nakeff and Daniels-McQueen, 1976). Each experiment included extract-free cultures. Results are expressed as mean ± standard error. The extract-treated cultures were compared with control cultures using ANOVA variance analysis.

2.6. Cytotoxic activity of P. major methanol extract on human transformed cells

1, 10 and 100 μg/mL methanol extract were dissolved in 0.5 % dimethylsulfoxide (DMSO) and added to confluent cultures of the following human transformed cell lines (2 $x10^4$ cells/mL): HCT-15 (colon carcinoma), SQC-UISO (cervical carcinoma), OVCAR (ovary carcinoma) and KB (nasopharynx carcinoma). The cultures were incubated at 37°C for 72 hours in a humid 5% CO_2/ 95% air atmosphere. Each dilution was assayed in triplicate including two cultures free of extract (controls), one containing the initial number of cells that was refrigerated, and the other that was cultured along with cultures containing extract. Cell concentration was determined by protein quantification as established by Lowry and modified by Oyama and Eagle, (1956). Results are expressed as the dose inhibiting 50% cell growth after incubation (ED_{50}).

2.7. Antimicrobial activity

The study was performed using ATCC8937 *Escherichia coli*, NRS 744 *Bacillus subtilis* and ATCC10231 *Candida albicans* cultures. The bacteria were cultured in

Tryptic Soy Broth (Bioxon-Mex) and incubated at 37°C, while *C. albicans* was cultured in Sabouraud broth at 28°C. The microorganisms were incubated and cell concentration was adjusted to 3 x 10^8 CFU/mL (1 McFarland nephelometer tube /(Barry and Thornsberry, 1985). 1.0 ml of *E.coli* and *B. subtilis* suspension were seeded by dispersion in Müeller-Hinton medium (Bioxon, Mex), while *C. albicans* was seeded in Sabouraud-Dextrose Agar (Bioxon, Mex). Filter paper disks (Whatman No. 2) containing 0.40, 0.20, 0.10 and 0.05 g/mL of the plant extract (water, methanol, chloroform or hexane) were placed on the test plate and cultured. For bacteria an antibiotic solution (Sigma, Saint Louis, MO), as used as positive control, in the case of yeast 1X Antifun solution (Microlab, Mex) was used. Disks impregnated with physiological saline solution were also included as non-inhibition controls. Bacterial cultures were incubated at 37°C and *C. albicans* cultures were incubated at 28°C for 24 hours. Inhibition diameters measured and compared with the corresponding controls.

3. Results

3.1. Hematopoietic activity in bone marrow cultures

The aqueous and methanol extracts stimulated cell proliferation at all concentrations tested. The hematopoietic activity of both extract types was similar using 0.4 and 0.2 g/mL, increasing the cellular concentration 2.7 to 3.10 fold as compared to controls. However, the hematopoietic activity of 0.1 and 0.05 g/mL methanol extract was significantly higher than that of the aqueous extract ($p<0.05$; Figure 1).

On the other hand the chloroform and hexane extracts did not modify the cellular concentration compared to control cultures. Moreover, 0.05 g/mL of the chloroform and hexane extracts decreased the cellular concentration 26.7 and 22.3%, respectively ($p<0.05$, Figure 2).

3.2. Hematopoietic activity in spleen cultures

Doses of 0.4 and 0.2 g/mL aqueous extract increased the cellular population 3.3 and 4.4 fold respectively. In contrast, the same concentrations of methanol extract increased the cell concentrations 6.2 and 4.2 fold, respectively as compared to control cultures. Doses 0.4 g/mL methanol extract showed significantly higher activity than the same concentration of aqueous extract ($p<0.001$; Figure 3).

3.3. Cytotoxic activity on human transformed cells

Methanol extract (1 μg/mL) was cytotoxic for the UISO and OVCAR cell lines, causing a 59% and 82% decrease in the number of surviving cells (Figure 3). However, 10 and 100 μg/mL of methanol extract were not cytotoxic, as more than 100% cells remained viable. Unexpectedly, this extract stimulated the proliferation of KB cells, as 183 and 302% survival rates were observed with the 10 and 100 μg/mL concentrations. Survival rates showed slight and non-significant increases when added with 1 and 10 μg/mL of methanol extract, however with 100 μg/mL the survival rate decreased to 54% (Figure 4).

3.4. Antimicrobial activity

The growth of *Bacillus subtilis* was inhibited by the aqueous extract, decreasing 78, 71, 50, 39 and 21% at concentrations of 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.025 g/mL, respectively, as compared to control cultures which were considered as reference for 100% inhibition activity. This extract had no effect on the proliferation of *E. coli* and *C. albicans* (Table 1).

Doses of 0.4 and 0.2 g/mL mehanol extract inhibited the growth of *Bacillus subtilis* 39 and 32%, respectively. This extract did not inhibit the growth of *E. coli* and *C. albicans* (Table 1).

Finally, 0.4 and 0.2 g/mL chloroform extract showed 42% and 32% growth inhibition of *E. coli* respectively, while the hexane extract had a dose dependent growth inhibition effect (94, 85, 68, 51 and 37% inhibition at concentrations of 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.025 g/mL, respectively). This extract showed no inhibition effect on the proliferation of *B. subtilis* and *C. albicans* (Table 1).

4. Discussion and conclusions

Plantago major is one of the most studied plants. Most of its components and the pharmacological action of some of these are well known. However, in Mexico aerial parts are used to treat bone marrow proliferating disorders, even though the effects of this plant on hematopoietic cells, particularly on totipotential stem cells, remain unknown. Changes of the proliferation patterns of stem cells may cause aplastic anemia and leukemia (Hoffbrand and Pettit, 2000). These diseases are of particular concern in developing countries, as they are lethal and treatment expenses surpass the income of a high proportion of individuals (Morales et al., 1992). Hematopoietic stem cell alterations also affect the immune system, specifically lymphocytes and other immune response cells which also originate from totipotential hematopoietic stem cells (Ikehara, 1997).

Figures 1 and 3 show that aqueous and methanol extracts of *Plantago major* stimulate cell proliferation in bone marrow and spleen cell cultures. However, even though the same number of cells were seeded in both types of culture, the cell population increase was significantly higher in spleen cultures than in bone marrow cultures. Possible explanations for these differences are the following: Only 30 to 40% of bone marrow cells are capable of multiplying, while 70 to 80% of spleen cells are B or T lymphocytes, with high proliferation capability (Popp and Popp, 1979), and bone marrow cell cycle lasts 15 to 32 hours, while spleen cell cycle takes 15 hours, and can be reduced to 6 hours in the presence of mitogens or certain antigens (Crossen et al., 1986; Salmi and Jalkanen, 1997).

Bentfeld-Barker and Schooley, (1981) demonstrated that these two cell groups also show different proliferation capability *in vivo*. They transplanted spleen cells and bone marrow cells to two different groups of mice who had received fatal X-ray doses. Time for recovery was 2.5 fold shorter and cellularity was 3-fold higher in mice transplanted with spleen cells. The results of these assays performed *in vivo* are in accordance with the results of our experiments performed *in vitro*. On comparing control cultures, bone marrow cells increased their population 1.7 fold, while the spleen cell population increased 4.0 fold at 72 hours. This demonstrates that development conditions were appropriate in both culture types as cells proliferated both in the absence, and much more evidently in the presence of *P. major* extracts.

The capability of methanol and aqueous extracts to stimulate hematopoietic cell proliferation may be related to the presence of molecules functioning as mitogens, such as phytohemagglutinin (PHA) obtained from *Phaseolus vulgaris* (Riikola and Weber, 1982), or pokeweed obtained from *Phytolacca americana*. These mitogens stimulate the proliferation of lymphocytes and other hematopoietic cells in vitro (Ferber, 1980; Nakeff, 1981; Tice and Davey, 1983). Whatever the nature of the cell proliferation-inducing molecules, whether they are naturally present in the plant or are formed during heating for the extraction process remains to be determined.

In vivo and *in vitro* experimental data on the cytotoxic and antitumoral properties of several *P. major* aerial part extracts have produced contradictory

results. A leaf extract prepared with 95% ethanol showed antitumoral activity when was administered intraperitoneally (0.20 mg/k) to mice with Sarcoma 180 type tumors during 5 days (Estévez et al., 1976). Nevertheless, dry leaves failed to show this activity when administered to rats with sarcoma (1.0 mg/Kg/day) during 4 days. Bhakuni et al., (1976) reported that 50% ethanol (ethanol-water) leaf, stem and seed extracts of *P. major* and other Chilean plants failed to show antitumoral activity in mice with lymphocytic leukemia, but was in fact cytotoxic for certain cell lines, reporting ED 50 > 20 g.

Our results differ from these reports of cytotoxic activity *in vitro*. The previously mentioned authors obtained the extracts at room temperature, while we boiled the plant for over 3 hours to obtain aqueous and methanol extracts. Under these experimental conditions, it is possible that acids known to be contained in the plant (caffeic, ferulic, chlorogenic, urosolic and oleanic acids), with proven antitumoral activity *in vitro* (Huang et al., 1988; Huang et al., 1994; Liu, 1995) may loose their cytotoxic and/or antitumoral properties.

P. major also contains the flavonoids; 7-luteoline, apigenin, hispidulin, baicalein, etc. known for their capability of inducing carcinoma cell death (Matsuzaki et al., 1996) and of inhibiting the growth of hepatoma cells (Motoo and Sawabu, 1994). Even though these flavonoids may have been present in the extracts, in our experiments they failed to inhibit the growth of transformed cells.

Several studies have reported antimicrobial properties of *Plantago major* aqueous extracts obtained in low temperature conditions have shown bactericide and bacteriostatic activity *in vitro* (Davini et al., 1986). Methanol extracts have shown antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*, and weaker activity against *Mycobacterium phlei* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus,* but they did not inhibited the growth of *Bacillus subtilis*, *Escherichia. coli*, *Serratia marcescens,* and, *Aerobacter aerogenes.* (Moskalenko, 1986; Cáceres et al., 1978b; Cáceres et al., 1990; McCutcheon et al., 1992).

We found here that the aqueous extract did in fact inhibit *B. subtilis* growth in a dose-dependent fashion. Furthermore, our methanol extract was active against *B. subtilis* even though Cáceres, 1978b); Moskalenko, 1986; McCutcheon et al., 1992, reported for methanol extracts.

It is important to point out that the hexane extracts inhibited the growth of *E. coli* in a dose dependent fashion. Under our experimental conditions, the extracts obtained with polar solvents seem to be more effective against *B. subtilis* (gram positive), while the extracts obtained using non-polar solvents inhibited *E. coli* (gram negative) more efficiently. This finding may be related with the polarity of the extract compounds and their capability to penetrate cell walls with hydrophilic environments (gram positive bacteria) or lipophilic environments (gram negative bacteria).

P. major is popularly known for its antitumoral and antibacterial properties, which has been found to be effective among people who have used this plant to treat such diseases. *In vitro* assays have produced contradictory results. However, this plant may be useful to treat such diseases, not only because of its putative antimicrobial or antitumoral action but also by immune system activation, making the individual competent to challenge such diseases. Although there are no previous reports with experimental evidence to support the latter statement. However, the results reported here demonstrate that *P. major* stimulates lymphocyte and precursor cell proliferation both directly (in the spleen) and indirectly (in the bone marrow), which play a determinant role in the immune response. Furthermore, our group has obtained an aqueous macerate from *P. major* aerial parts, which stimulated spleen cell proliferation, but not bone marrow cell proliferation (data not shown), confirming the lymphopoietic activity of the plant. The present study has experimentally demonstrated the hematopoietic activity of *Plantago major*. Its ability to stimulate lymphocyte proliferation is of particular importance, leading to the possibility of being studied and used as an immune system stimulator. The lineage and maturation level of cells that are responsive to aqueous and methanol *Plantago major* extracts remains to be determined.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr María Luisa Villarreal from the Centro de Investigación en Medicina Tradicional de Xochitepec, México, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) for allowing us to perform the cytotoxicity assays; and Mary Lou Quinn from NAPRALERT, University of Illinois, for her assistance with the bibliographic information search. We thank Dr Jorge Santana Carrillo for the identification of plant material.

5. References

Argueta, V.A., Cano, A.L.M, Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, vol 2. Instituto Nacional Indigenista. México, pp. 916- 918.

Bhakuni, D.S., Bittner, M., Marticorena, C., Silva, M., Weldt, E., Hoeneisen, M., 1976. Screening of Chilean plants for anticancer activity. Lloydia 39, 225-243.

Bentfeld-Barker, M.E., Schooley, J.C., 1981. Comparison of the effectiveness of bone marrow and spleen stem cells for platelet repopulation in lethally irradiated mice. Experimental Hematology 9, 379-390.

Cáceres, A., Girón, L.M., Martínez, A.M., 1987a. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. Journal of Ethnopharmacology 9, 223-245.

Cáceres, A., Girón, L.M., Alvarado, S.R., Torres, M.F., 1987b. Screening on antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. Journal of Ethnopharmacology 20, 223-237.

Cáceres, A., Cano, O., Samoyoa, B., Aguilar, L., 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. A screening of 84 plants against enterobacteria. Journal of Ethnopharmacology 30, 55-73.

Cano, A.L.M., 1997. Flora medicinal de Veracruz. Inventario etnobotánico. Universidad Veracruzana. Veracruz, México, pp. .256-257.

Chiej, R., 1982. Piante medicinali. Arnoldo Mondador Editore, Milan, p. 237.

Croseen, P.E., Durie, B.G.M., Trent, J.M., 1986. Generation time (GT) of human bone marrow cells cultured in the CFC-gm assay. Cell Tissue Kinetics 19, 533-588.

Davini, E., Lavarone, C., Trogolo, C., Aureli, P., Pasolini, B., 1986. Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands, Journal of Ethnopharmacology 1, 169-193.

De Feo, V., Senatore, F., 1993. Medicinal plants and phytotherapy in Amalfitan Coast, Salermo Province, Campania, Southern Italy. Journal of Ethnopharmagology 39, 39-51.

Estevez, A., Marquina, G., Polanco, N., Contreras, D., Vergara,A., Peres, I., 1976. Antitumor substances from twenty-two cuban plants. Revista Cubana de Farmacología 10, 223-227.

Ferber, E., 1980. Dynamics of membrane fatty acids during lymphocyte stimulation by mitogens. Behring Institute Research Communications 65, 16-25.

Hoffbrand, V.A., Pettit, J.E., 2000. Color atlas of clinical hematology. 3rd edition. Mosby, London, p. 107-111.

Hudson. L., Hay, F.C., 1980. Practical immnunology. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 30-31.

Huang, M-T., Smart, R.C., Wong, C-Q., Conney, A.H., 1988. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Research 48, 5941-5946.

Huang, M-T., Ho, C-T., Wang, Z,Y., Ferraro, T., Lou, Y-R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D., Conney, A.H., 1994. Inhibiton of skin tumorigenesis by Rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. Cancer Research 54, 701-708.

Ikehara, S., 1997. Autoimmune diseases as "stem cell disorders". Acta Histochemical and Cytochemical 30, 3-12.

Instituto Nacional Indigenista (INI). 1994. Flora medicinal indígena de México, vol. 2. México, p. 693.

Lennette, E.H., 1985. Manual of clinical microbiology. 4th edition. American Association for Microbiology, Washington, D.C., pp. 978-.987.

Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanic acid and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology 49, 57-68.

Márquez, C., Lara, O.F., Esquivel, R.B., Mata, E., 1999. Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, .México, p.107.

Martínez, M., 1967. Las plantas medicinales de México. 6a edición. Ediciones Botas, México, p. 195.

Matsuzaki, Y., Kurokawa, N., Terai, S., Matsumura, Y., Kobayashi, N., Okita, K., 1996. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. Japanese Journal of Cancer Research 87, 170-177.

McCutcheon, A.R., Ellis, S.M., Hancock, R.E.W., Tower, G.H.N., 1994. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbia native peoples. Journal of Ethnopharmacology 44, 157-169.

Metcalf. D., McDonald, H.R., Odartchenko., Sordat, B., 1975. Growth of mouse megakaryocyte colonies *in vitro*. Proceedings National Academic Sciences, USA 72, 1744-1748.

Morales, P.M., Sánchez, V.E., Chávez, S.G., Guillén, M.C., Gómez, M.E., Pizutto, C.J., 1992. Avances en el tratamiento de la anemia aplástica. Gaceta Médica de México 51, 399-409.

Moskalenko, S.A., 1986. Preliminary screening of Far-Eastern ethnomedicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology 15, 231-259.

Motoo, Y., Sawabu, N., 1994. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin, and baicalein on human hepatoma-cell lines. Cancer Letters 86, 91-95.

Nakeff, A., Daniels-McQueen, S., 1976. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor; Colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). Proceeding Society Experimental Biology and Medicine 151, 587-590.

Nakeff, A., 1981. Examination of culture conditions for optimizing the growth of megakaryocyte colonies. In: megakaryocyte biology and precursors. In: In vitro cloning and cellular properties. Evatt, B.L., Levine, R.F. and Williams, N.T., Eds. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. p. 111-125

Nuñez, G. M.E., da Silva, E., J.A., Souccar, C., Lapa, J.A., 1997. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract of Plantago major L. International Journal of Pharmacognosy 35, 99-104.

Oyama., V.I., Eagle, H., 1956. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteau) Proceeding Society Experimental Biology Medicine 91, 305-307.

Ponce-Macotela, M., Navarro-Alegría, I., Martínez-Gordillo, M.N., Alvarez-Chacón, R., 1994, In vitro antigiardiasic activity of plant extracts. La Revista de Investigación Clínica 46, 343-347.

Popp, D.M., Popp., R,A., 1979. Hematopoietic stem cell heterogeneity: Use of cell cycle specific drugs to look for age-associated alterations. Mechanism of Ageing Development 9, 441-462.

Riikola, L., Weber, T.H., 1982. Quality control of commercial phytohemagglutinins (PHA) from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). In: Lectins-biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, vol. II. Walter de Gruyter & Co., Berlin, pp. 643-654.

Salmi, M., Jalkanen, S., 1997. How do lymphocytes know where to go: Current concepts and enigmas of lymphocyte homing. Advances in Immunology 64, 139-217.

Samuelsen, A.B., 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. A review. Journal of Ethnopharmacology 71, 1-21.

Somolinos, G. d'A., 1990. Médicos y libros en el primer siglo de la colonia. Medicina novohispana Siglo XVI. En: Historia general de la medicina en México. Tomo II. Aguirre, B.G., Moreno, A.R., eds. Universidad Nacional Autónoma de México, p. 159-174.

Tice, D.G., Davey, F.R., 1983. T lymphocyte colonies stimulated by different mitogens require diverse culture conditions. Experimental Hematology 5, 394-401.

Figure legends

Figures 1a and 1b.

Tittle: Hematopoietic Activity of *Plantago major* Extracts in vitro

Figure Legend: Dose-response curve showing the effect of *Plantago major* extracts on mouse bone marrow cell proliferation. Data are expressed as mean ± standard error. $p<0.001$

Figure 2

Tittle: Effect of *Plantago major* Aqueous and Methanolic Extracts on Mouse Spleen Cell Proliferation.

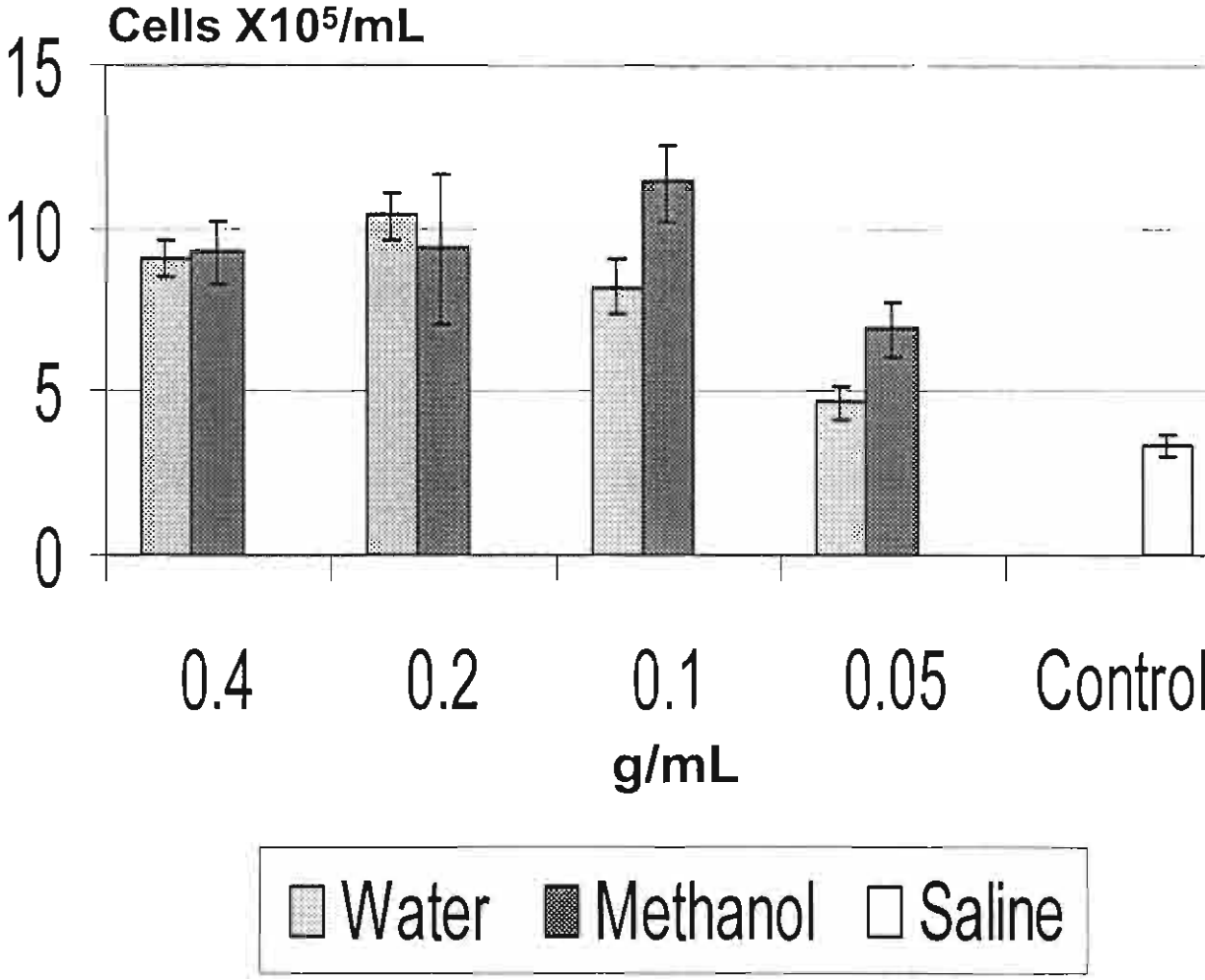
Figure Legend: Dose-response curve showing the effect of *Plantago major* aqueous and methanolic extracts on mouse spleen cell proliferation. Data are expressed as mean ± standard error. $p< 0.001$

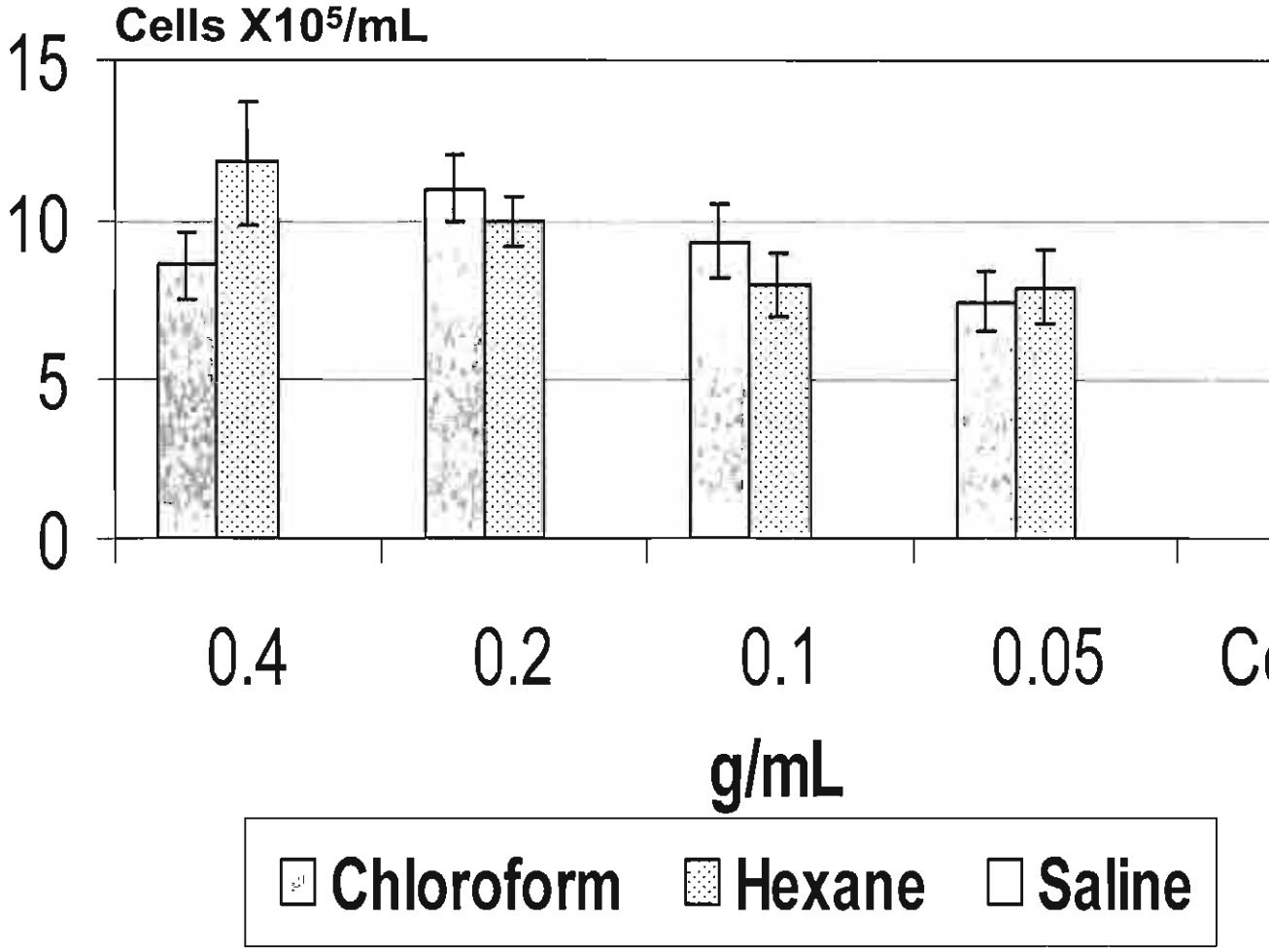
Figure 3

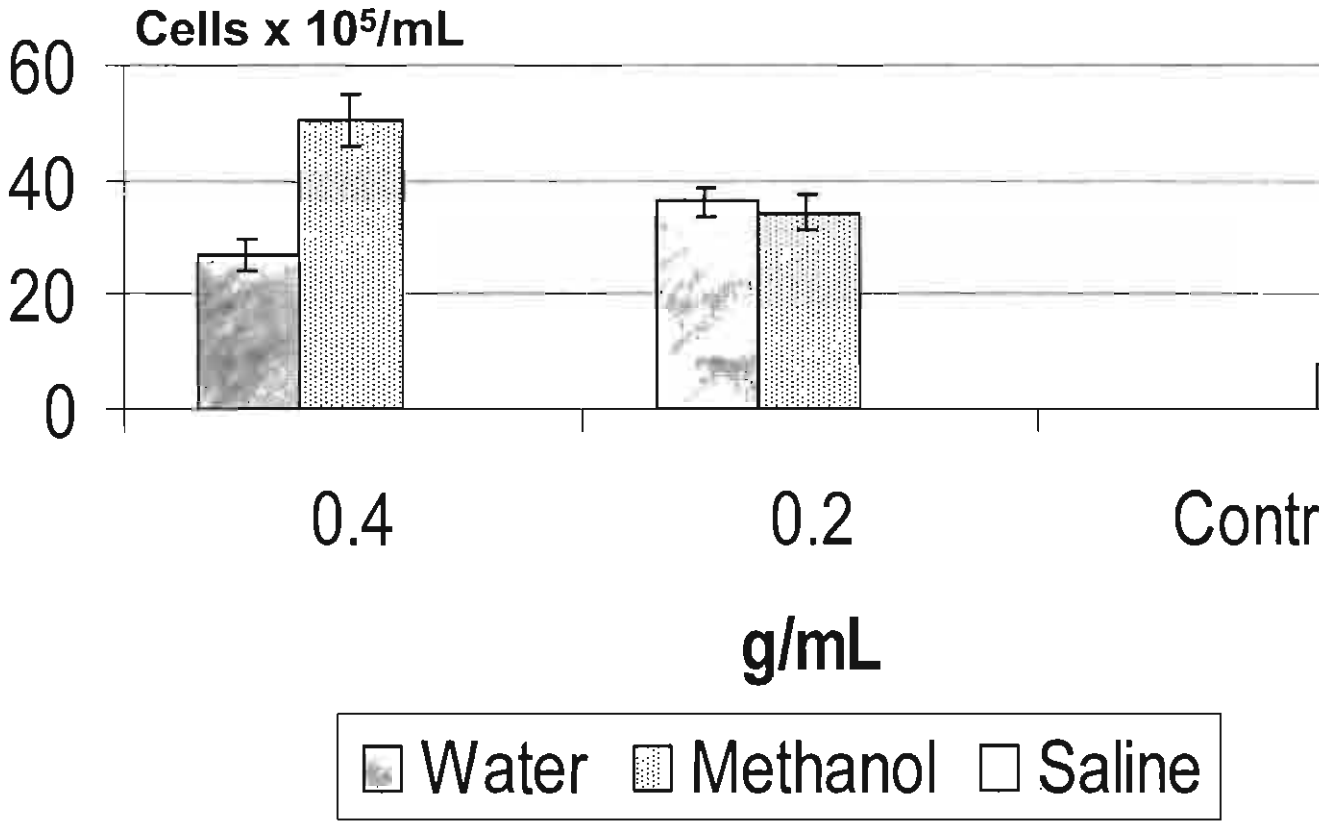
Tittle: Cytotoxic Activity of *Plantago major L* Methanolic Extract on Transformed Human Cell Lines.

Figure Legend: The effect of *Plantago major* methanolic extract (1, 10 and 100 μg/mL) on human transformed cell proliferation. Data are expressed as mean ± standard error.

Cell lines: HCT-15, colon carcinoma; SCQ-UISO, cervix carcinoma; OVCAR, ovary carcinoma; KB nasopharynx carcinoma.


Cells X10⁵/mL
15
10
5
0
0.4
0.2
0.1
0.05
Control
g/mL
Water
Methanol
Saline


Cells X10⁵/mL
15
10
5
0
0.4
0.2
0.1
0.05
g/mL
Chloroform
Hexane
Saline


Cells x 10⁵/mL
60
40
20
0
0.4
0.2
Contr
g/mL
Water
Methanol
Saline

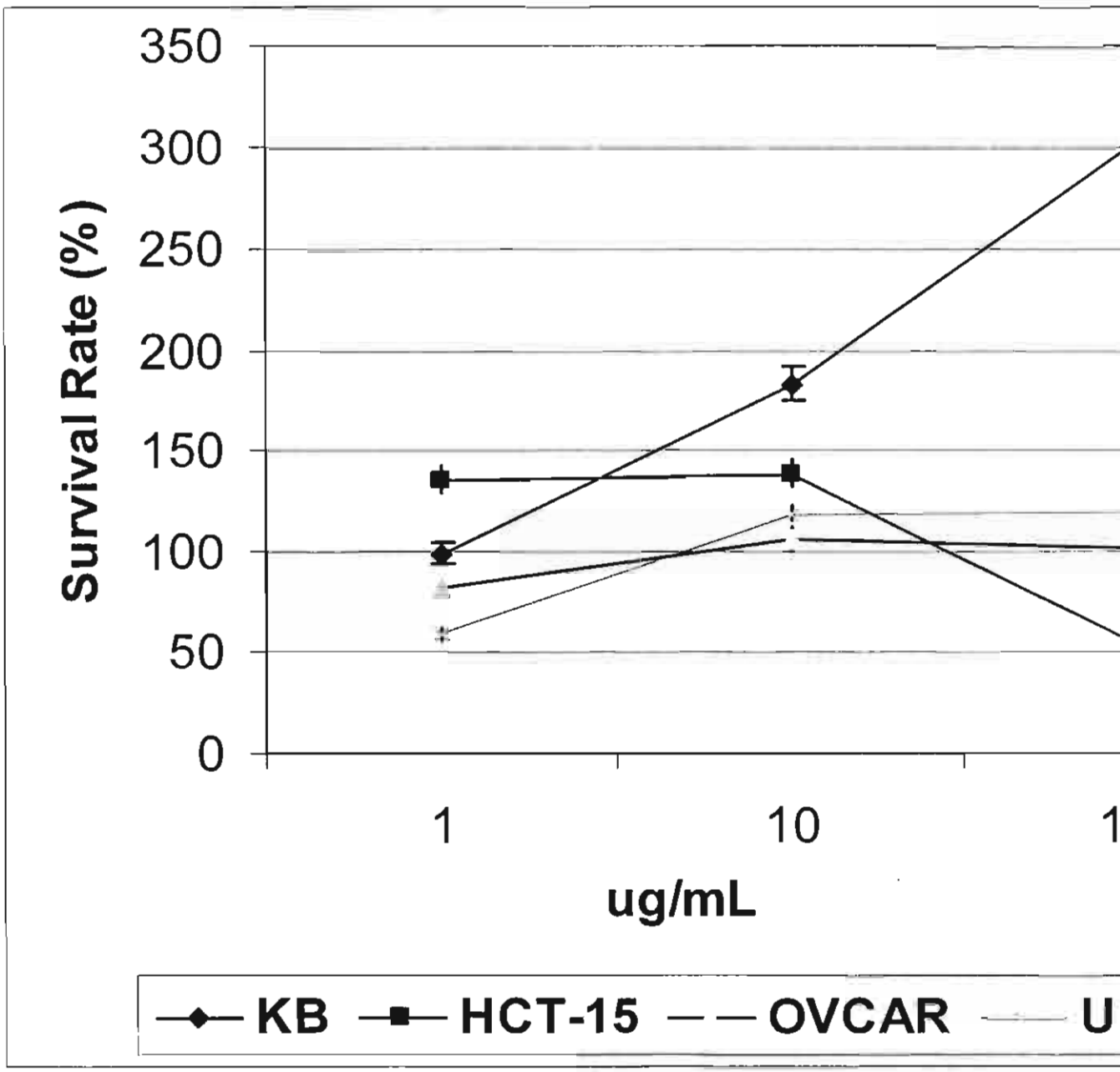

350
300
250
200
150
100
50
0
Survival Rate (%)
1
10
ug/mL
KB
HCT-15
OVCAR

Table 1
Antimicrobial activity[a] of *Plantago major* aerial part extracts

Extract µg/mL	Aqueous			Methanol			Chloroform			Hexane		
Microorganism[b]	E	B	C	E	B	C	E	B	C	E	B	C
0.40	-	22	-	-	11	-	12	-	-	34	-	-
0.20	-	20	-	-	9	-	9	-	-	30	-	-
0.10	-	14	-	-	-	-	-	-	-	24	-	-
0.05	-	11	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-
0.025	-	6	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-
Controls[c,d]	35	28	18	35	28	18	35	28	18	35	28	18

[A]Diameter in mm of the zone of inhibition (n=9)
[b]E: *Escherichia coli.*, B: *Bacillus subtilis.*, C: *Candida albicans*
[c]Control for *E. coli* and *B. subtilis*: Penicillin10^4IU/mL -Streptomycin 10^4µg/mL
[d]Control for *C. albicans*: 1X Antifun Solution