

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 Padrón de 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

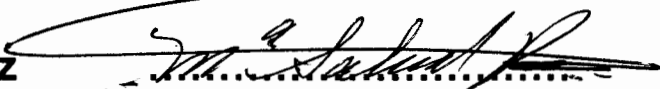
Jurado:

Cotutores:

Dr. J. Miguel Betancourt Rule



Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez



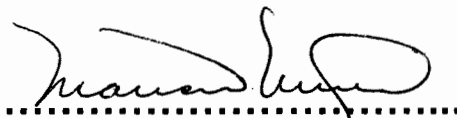
Asesor:

Dr. Rubén Román Ramos

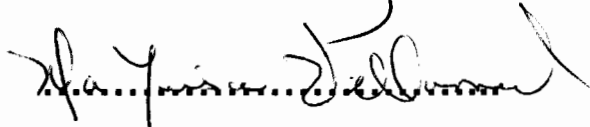


Sinodales:

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 aristolochiaefolia*, *Plantago major*, *Anemopsis californica* y *Amphyterigyum 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 CD₁ 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 aplásica en ratones mediante la inyección de benceno por vía subcutánea. Se emplearon ratones CD₁ 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, respectivamente. 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, respectivamente. 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 aplásica, 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 aplásica. 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 *Amphyterigium 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 CD₁ 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 CD₁ 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 activity 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 <i>Solanum torvum</i> Sw.	24
Características generales de <i>Smilax aristolochiaefolia</i> Miller.	26
Características generales de <i>Plantago major</i> L.	28
Características generales de <i>Anemopsis californica</i> Nutt.	30
Características generales de <i>Amphypterygium adstringens</i> 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 <i>in vitro</i>	
Cultivo de médula ósea de ratón	44
Cultivo de bazo de ratón	46
Ensayos <i>in vivo</i>	
Determinación de las dosis tóxicas, dosis de trabajo y esquemas de tratamiento	48

Evaluación de la actividad hematopoyética de las plantas <i>in vivo</i>	48
--	-----------

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

RESULTADOS

Actividad hematopoyética de <i>Solanum torvum</i> Sw. <i>in vitro</i>	52
--	-----------

Determinación de las dosis tóxicas y de trabajo <i>in vivo</i>	56
---	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Solanum torvum</i> Sw. <i>in vivo</i>	57
---	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Smilax aristolochiaefolia</i> M. <i>in vitro</i>	59
--	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Smilax aristolochiaefolia</i> M. <i>in vivo</i>	61
---	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Plantago major</i> L. <i>in vitro</i>.....	65
--	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Plantago major</i> L. <i>in vivo</i>.....	67
---	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Anemopsis californica</i> N. <i>in vitro</i>	69
--	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Anemopsis californica</i> N. <i>in vivo</i>.....	72
--	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Amphypterygium adstringens</i> Schl. <i>in vitro</i>	73
--	-----------

Actividad hematopoyética de <i>Amphypterygium adstringens</i> Schl. <i>in vivo</i>	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 <i>Solanum torvum</i> Sw	25
4. Fotografía de las hojas y frutos de <i>Smilax aristolochiaefolia</i> M	27
5. Fotografía de las hojas y espigas de <i>Plantago major</i> L	28
6. Fotografía de la flor y hojas de <i>Anemopsis californica</i> N	30
7. Fotografía de la corteza de <i>Amphypterygium adstringens</i> Schl	32
8. Diseño experimental	40
9. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. torvum</i> en cultivo de médula ósea de ratón	52
10. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de <i>S. torvum</i> en cultivo de médula ósea de ratón	53
11. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. torvum</i> en cultivo de bazo de ratón	54
12. Actividad hematopoyética de los extractos de <i>S. torvum</i> disueltos en aceite de maíz	56
13. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. aristolochiaefolia</i> en cultivo de médula ósea de ratón	59

14. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de <i>S. aristolochiaefolia</i> en cultivo de médula ósea de ratón	60
15. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. aristolochiaefolia</i> en cultivo de bazo de ratón	61
16. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. aristolochiaefolia</i> sobre la producción de leucocitos <i>in vivo</i>	63
17. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de <i>S. aristolochiaefolia</i> sobre la concentración de plaquetas	64
18. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>P. major</i> en cultivo de médula ósea de ratón	65
19. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de <i>P. major</i> en cultivo de médula ósea de ratón	66
20. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>P. major</i> en cultivo de bazo de ratón	67
21. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>A. californica</i> en cultivo de médula ósea de ratón	69
22. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de <i>A. californica</i> en cultivo de médula ósea de ratón	70
23. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>A. californica</i> en cultivo de bazo de ratón	71
24. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>A. adstringens</i> en cultivo de médula ósea de ratón	74
25. Actividad hematopoyética de los extractos clorofómico y hexánico de <i>A. adstringens</i> en cultivo de médula ósea de ratón	74

26. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de <i>A. adstringens</i> 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

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 aplásica grave	15
3. Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento de la anemia aplásica 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 <i>S. torvum</i> Sw	57
6. Efecto del extracto acuoso de <i>S. torvum</i> 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 <i>S. aristolochiaefolia</i>	62
8. Efecto del extracto acuoso de <i>P. major</i> sobre la hematopoyesis de de ratón <i>in vivo</i>	68
9. Efecto del extracto acuoso de <i>A. californica</i> sobre la hematopoyesis de ratón <i>in vivo</i>	73
10. Efecto del extracto acuosos de <i>A. adstringens</i> sobre la hematopoyesis de ratón <i>in vivo</i>	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 dos85

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 trasplante. 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 quimioterapéuticos 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 sustancias 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 leucócitos 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 superponen 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 citoquímica-mente (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.

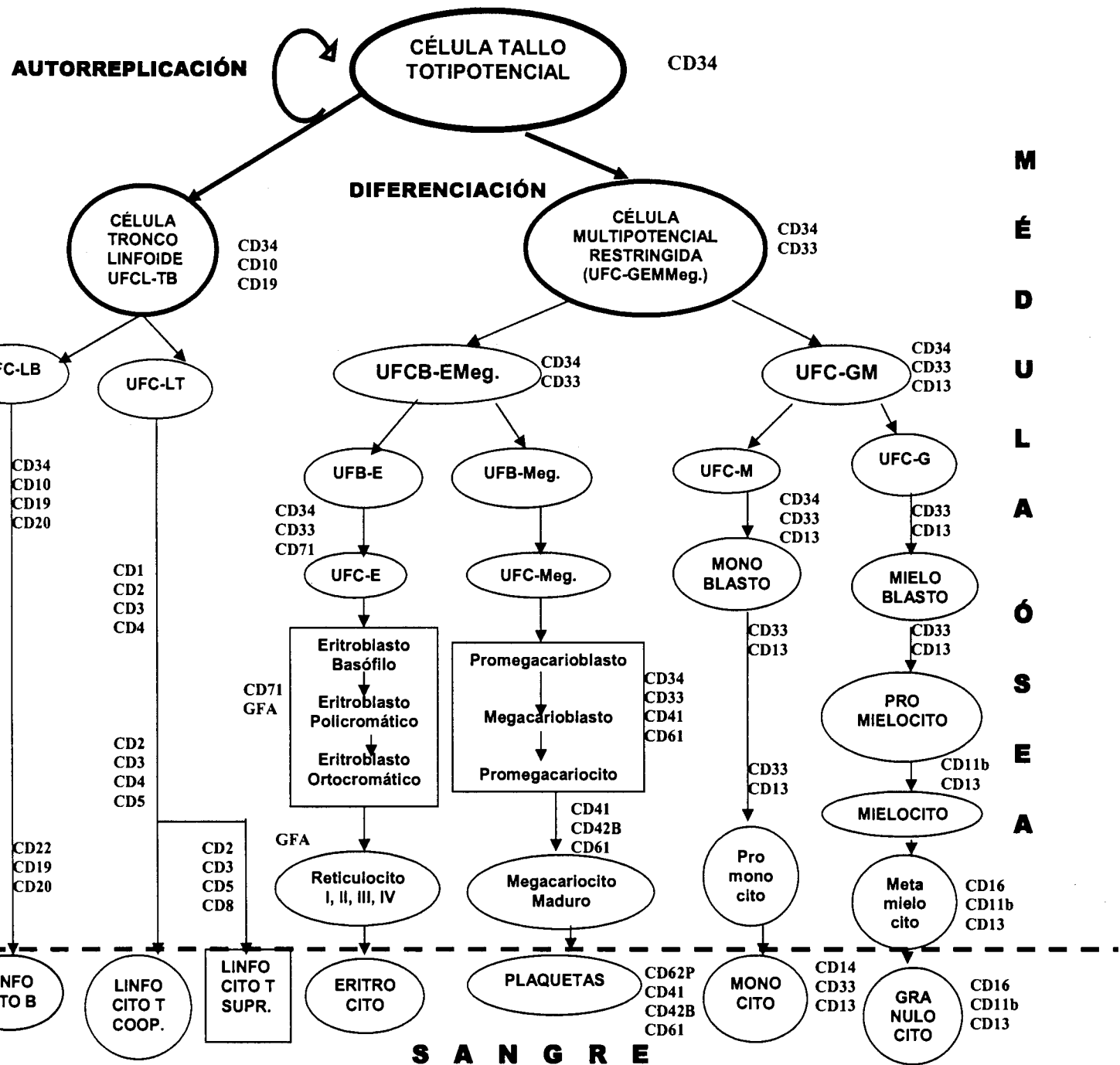
TABLA 1**Propiedades biológicas de los factores de crecimiento y citocinas que regulan humoralmente la hematopoyesis**

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	Precusores granulocíticos y granulocitos maduros.	Hematopoyesis temprana, producción y función de granulocitos
FEC-M	40,000-70,000	Células estromales, macrófagos, monocitos	Precusores monocíticos y monocitos	Producción y función de monocitos
EPO	34,000-39,000	Hígado, riñón	Precusores 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
FNT α	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

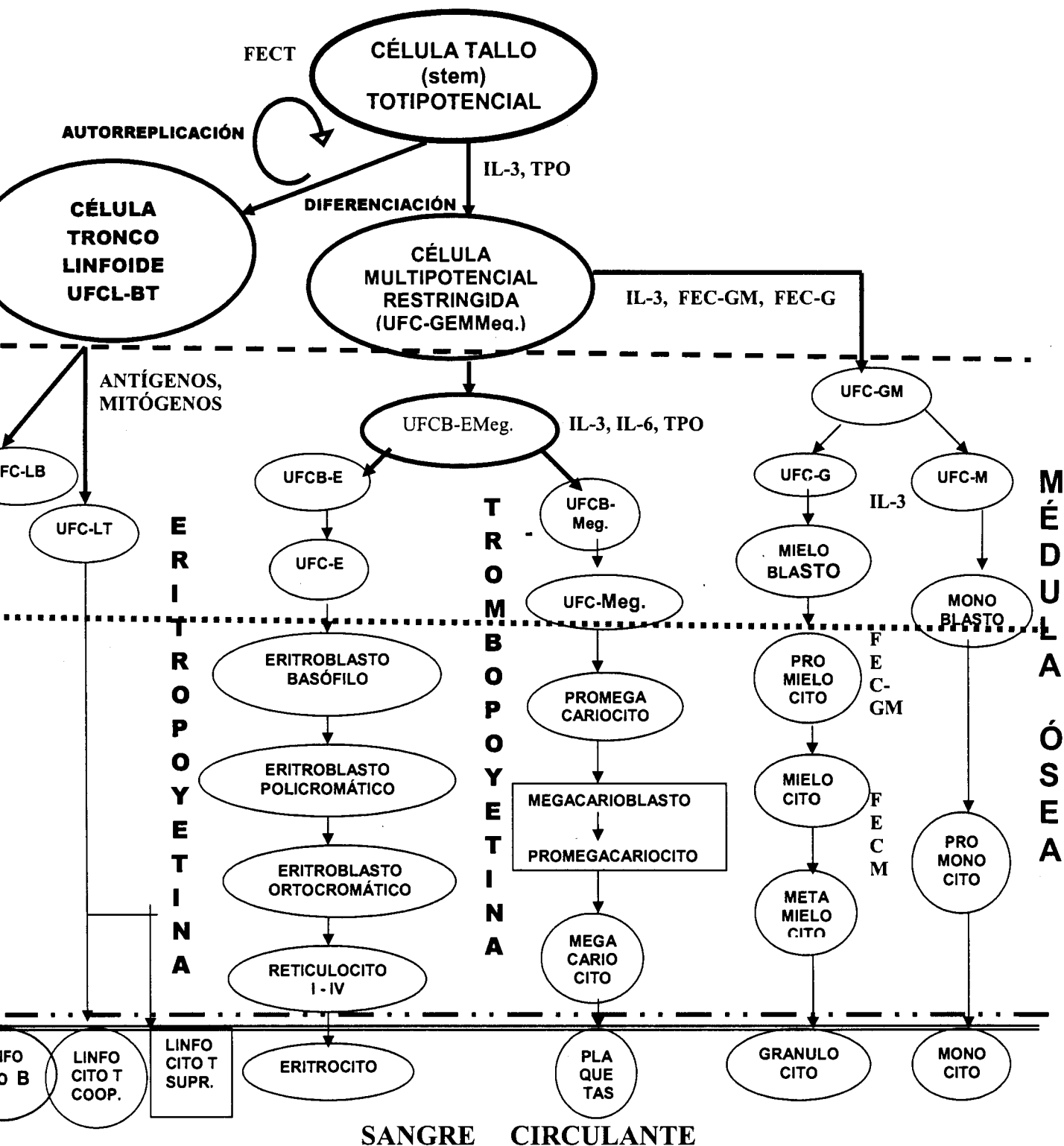
ETAPAS DE LA HEMATOPOYESIS EN EL HOMBRE Y EN ALGUNAS ESPECIES DE ROEDORES



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.

Zona de células multipotenciales con tasa de replicación limitada

Zona de células comprometidas o comisionadas altamente replicativas

Zona de células madurantes sin potencialidad v 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 sustancias 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 aplásica

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 aplásica 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 aplásica 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 aplásica 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 anomalías 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 aplásica 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 Aplásica	*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 aplásica

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 sobrevivencia 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 trasplante de médula ósea (50).

Trasplante de médula ósea

El trasplante 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 $0.2 \times 10^9/L$ que han presentado infecciones recurrentes, ya que ambas condiciones amenazan su vida. El trasplante de médula puede ser singénico, alogénico y autólogo. El trasplante 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 trasplante 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 trasplante 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 trasplante (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 trasplante de médula ósea por su tecnología y alto costo es inaccesible para la mayoría de los enfermos, por lo que la anemia aplásica 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 aplásica. 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) COMUN (ES)	USOS	PREPARACIÓN/ VÍA DE ADMON.	REF.
<i>Agave salmiana</i>	Magüey	Anemia, cáncer	Agua miel/ Oral	76,82
<i>Amphypterygium adstringens</i>	Cuachalalate, cuachalalá volador	Cáncer de estómago e intestino, úlcera gástrica, purificar la sangre, escoriaciones bucales	Corteza cocida o remojada/ Oral	77,78, 81
<i>Anagallis arvensis</i>	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
<i>Anemopsis californica</i>	Yerba mansa, hierba del manso	Anemia, cáncer	Infusión de Hojas/ Oral	77
<i>Bacopa chamaedryoides</i>	Chotete, quina, malva de quebranto	Anemia, malaria, dolor de estómago	No se indica	82
<i>Beta vulgaris</i>	Betabel	Anemia	Raíz licuada/ oral	77
<i>Bidens alba</i>	Mozote	Aumentar la sangre	Sin indicar	77,82
<i>Bocconia frutescens</i>	Gordolobo, llorasangre	Anemia	Decocción de hojas/ Oral	77
<i>Brickellia lanata</i>	Sanguinaria	Purificar la sangre	Cocción de toda la planta/ Oral	77
<i>Buettneria aculeata</i>	Arrendador, varilla prieta, zarza, Xtesak	Depurativo como la zarzaparrilla	Raíz/ sin especificar	78
<i>Calea zacatechichi</i>	Prodigiosa, hierba amarga	Engrosar la sangre	Ramas hervidas/ Oral	77

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

<i>Karwinskia latifolia</i>	Margarita	Purificar la sangre	Cocimiento de hojas/ Oral	78
<i>Marrubium vulgare</i>	Manrubio	Diabetes, purificar la sangre, cólicos, tónico	Cocimiento de las hojas o de toda la planta/ Oral	77,82
<i>Microgramma nitida</i>	Lengua de ciervo	Purificar la sangre, hígado	Hojas y ramas hervidas/ Oral	77
<i>Momordica charantia</i>	Amargosa, cundeamor	Anemia, debilidad, fortalecer la sangre	Sin indicar	77
<i>Pilea pubescens</i>	Chichicastle, mala mujer	Cáncer, anemia	Cocción de toda la planta para cáncer, fresca para la anemia	77
<i>Pityrogramma polylepsis</i>	Lengua de ciervo, caliguala	Fortalecer la sangre, gonorrea	Decocción del rizoma/ Oral y lavados	77
<i>Plantago major</i>	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
<i>Polygonum aviculare</i>	Sanguinaria, sangrilla	Producción de sangre	Cocimiento de la planta/ Oral	77
<i>Polypodium lanceolatum</i>	Lengua de ciervo, manenepeli	Purificar la sangre	Cocimiento de las frondas	78
<i>Portulaca sp</i>	Sanguinaria	Enfermedades de la sangre	Cocimiento de la planta/ Oral	78
<i>Rhus microphylla</i>	Agritos	Leucemia	La infusión de la planta para el tratamiento de leucemia/ Oral	79

<i>Serjania racemosa</i>	Bejuco de tres corazones, nueve hojas	Diabetes, purificar la sangre	Bejuco hervido/ Oral	77
<i>Smilax aristolochiaefolia</i>	Zarzaparrilla, mecapatli, ko-keb-ak.	Purificar la sangre, depurativa en lepra, eczema, ronchas, sudorífero	Decocción de la raíz/ Oral	78,81, 82
<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora, quelite	Anemia, depurativo	Hojas hervidas/ Oral	77,82
<i>Solanum torvum</i>	Hierba sosa	Cáncer, leucemia, linfoma	Hojas en cocimiento/ Oral	80
<i>Sonchus oleraceus</i>	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 ileon 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-trimetiltriacontano, b) triacontanato de octanósido y c) 5-hexatriacontanona. También identificaron 3-triacontanol, esteroles, estigmasterol y ácido tetratriacontanoico (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 zarzaparrilla, alambrilla, raíz de zarzaparrilla, cocolmecha, etc.

En 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 *Amphyterygium 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 hipocolesterolemizante 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, cuachalácico y alquil-anacárdicos entre otros (109,110,111). Además se han aislado β -sitosterol y una saponina (112). Los ácidos instipolinácico y cuachalácico se han relacionado con la actividad antiulcerosa e hipocolesterolemia 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 aplásica que en nuestro país provocan la muerte a la mayoría de los adultos que las padecen (113). El desarrollo de anemia aplásica 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 trasplante 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 CD₁.
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.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ESTUDIO ETNOBOTÁNICO

COLECTA DE
Solanum torvum Sw, *Smilax aristolochiaefolia* Miller, *Plantago major* L,
Anemopsis californica Nutt y *Amphypterygium adstringens* Schl.

EJEMPLARES
PARA
AUTENTIFICACIÓN

MOLIENDA

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CON
HEXANO, CLOROFORMO, METANOL Y AGUA
POR CALENTAMIENTO A TEMPERATURA DE REFLUJO

EXTRACTO
HEXÁNICO

EXTRACTO
CLOROFÓRMICO

EXTRACTO
METANÓLICO

EXTRACTO
ACUOSO

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD
HEMATOPOYÉTICA EN:
CULTIVO DE MÉDULA ÓSEA
Y
CULTIVO DE CÉLULAS DE BAZO DE RATÓN

ADMINISTRACIÓN
EN RATONES SANOS

Sangre
Citometría Hemática
Médula Ósea
Células Nucleadas

DESARROLLO DE
MODELOS
EXPERIMENTALES
PARA LA INDUCCIÓN
DE ANEMIA APLÁSTICA
EN RATONES

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 autenticada 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 autenticada 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 autenticadas 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
<i>Solanum torvum</i> Sw. (Hierba Sosa)	Hojas
<i>Smilax aristolochiaefolia</i> Miller (Zarzaparrilla)	Raíz
<i>Plantago major</i> L. (Llantén)	Hojas y espigas
<i>Anemopsis californica</i> Nutt (Hierba del Manso)	Raíz
<i>Amphyterygium adstringens</i> 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 CD₁ 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 4.0×10^6 /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 CO₂.

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 \pm 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 CD₁ 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 CO₂ (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 \pm 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 CD₁ 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 CD₁ 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 aplásica en ratones mediante la administración subcutánea de benceno

Se emplearon 120 ratones macho CD₁, 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 \pm 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.

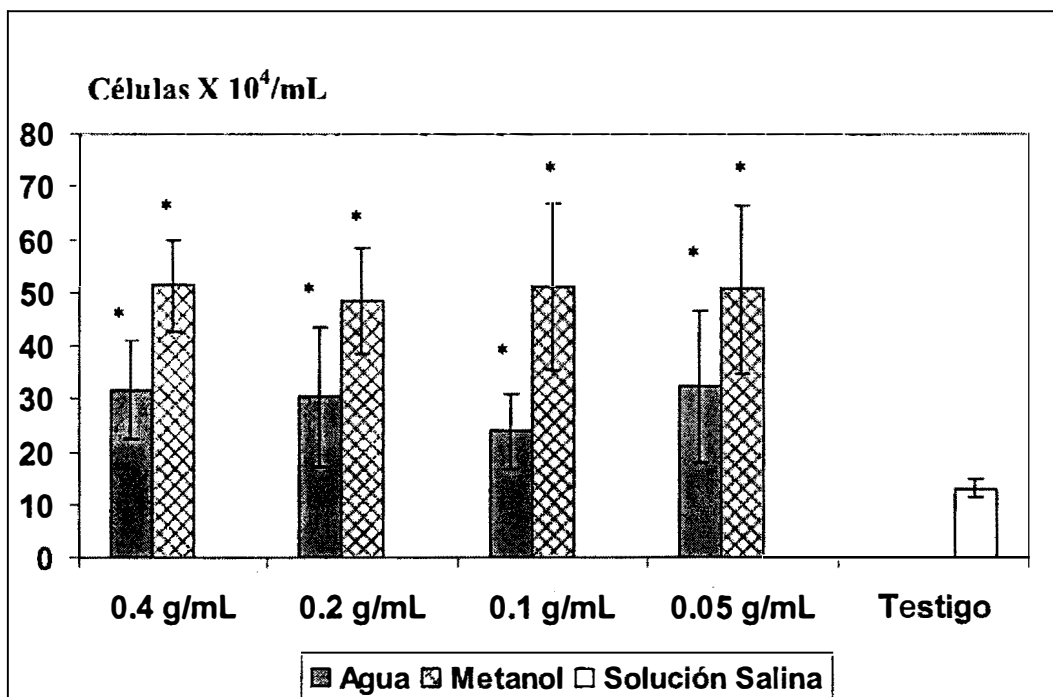


Figura 9. Actividad hematopoyética de *S. torvum* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm Error estándar, (n=8).

* $p < 0.02$ 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).

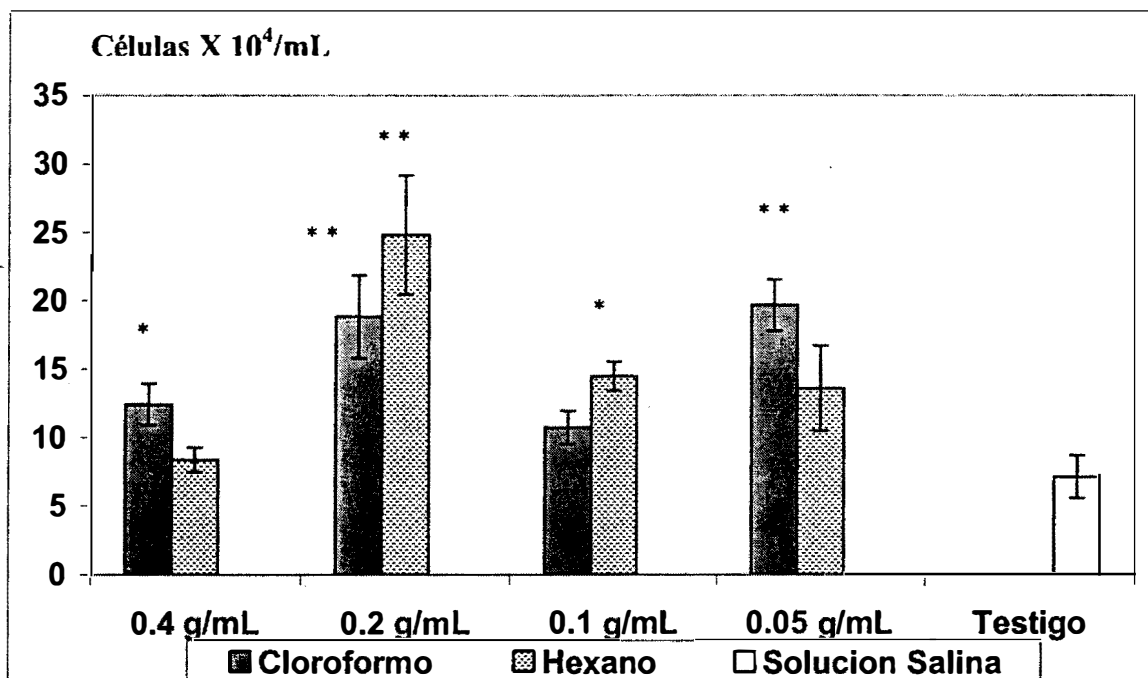


Figura 10. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *S. torvum* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm Error estándar, (n=8). *p<0.01, **p<0.001 respecto al testigo.

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 ($p < 0.001$).

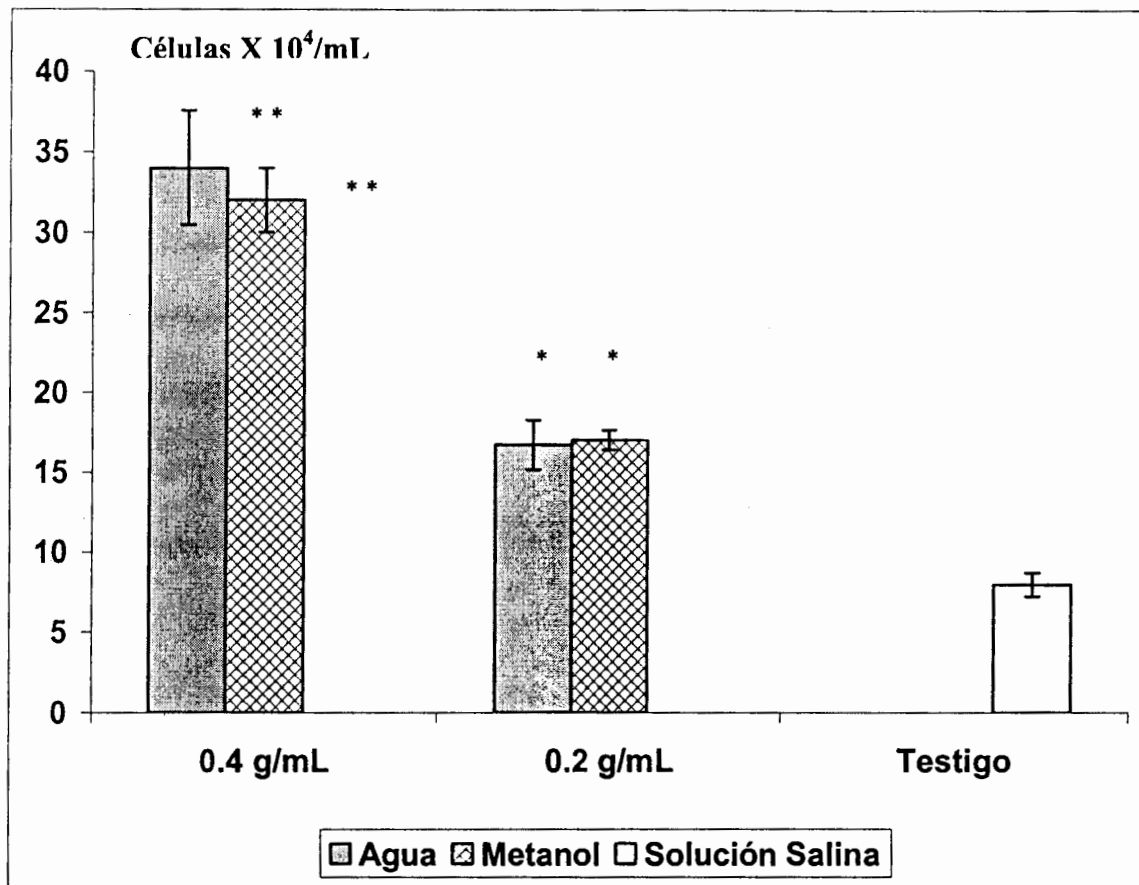


Figura 11. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. torvum* en cultivo de bazo de ratón. Media \pm Error estándar, (n=8). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ respecto al testigo.

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).

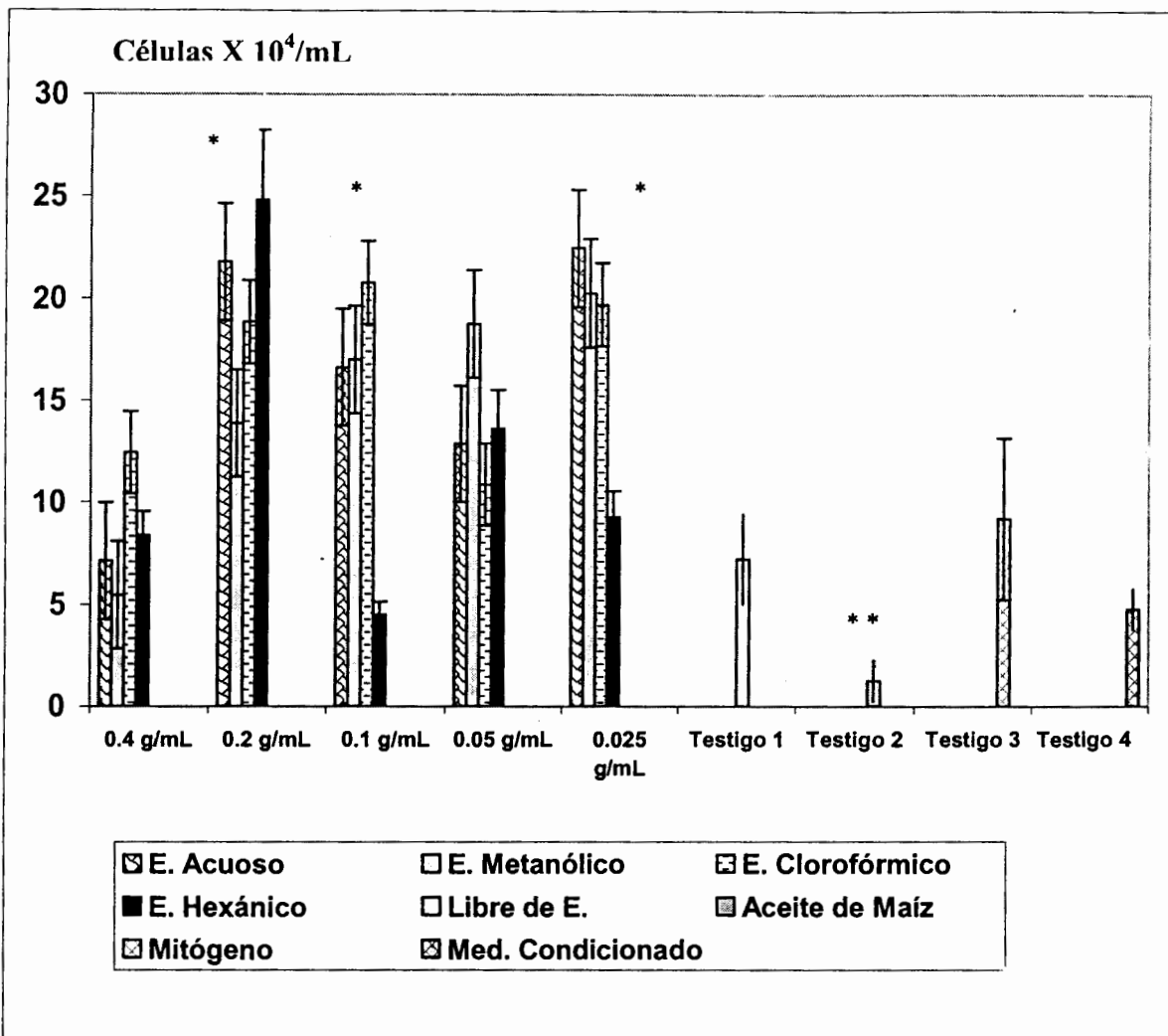


Figura 12. Actividad hematopoyética de los extractos de *S. torvun* disueltos en aceite de maíz. Media \pm Error estándar, (n=5).

- *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 ± 2.62	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.

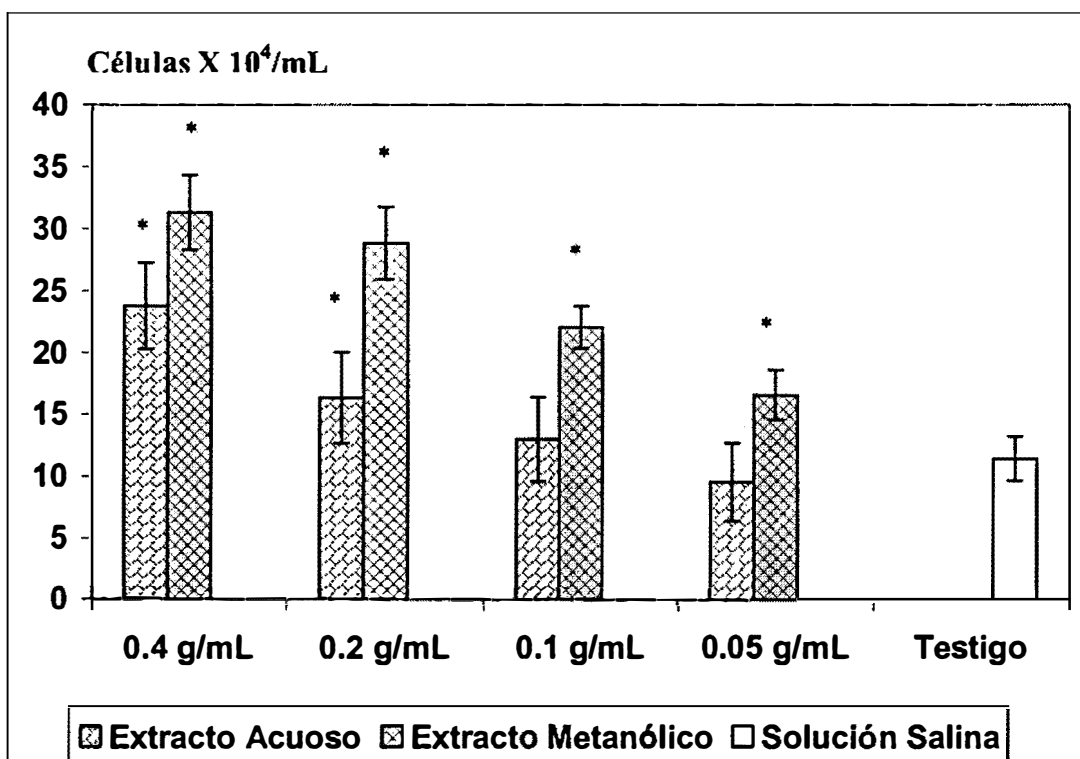


Figura 13. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm Error estándar, (n=10). * $p < 0.01$.

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

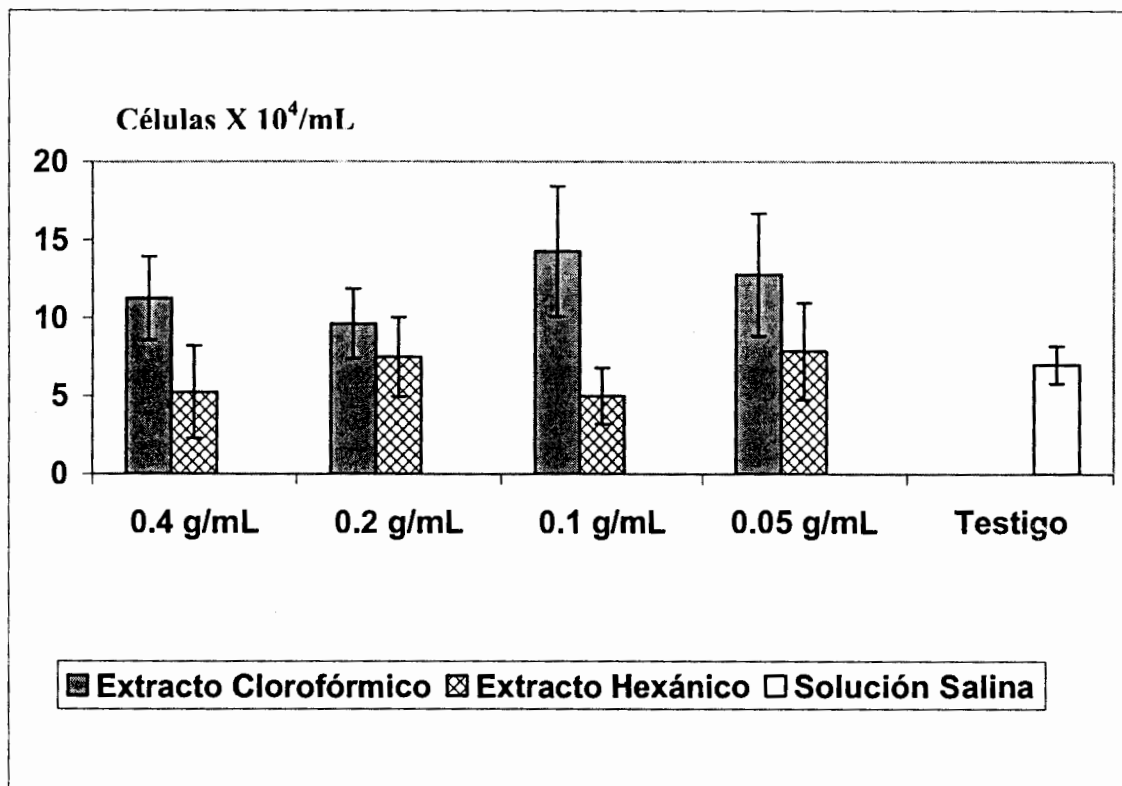


Figura 14. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm Error estándar, (n=10).

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).

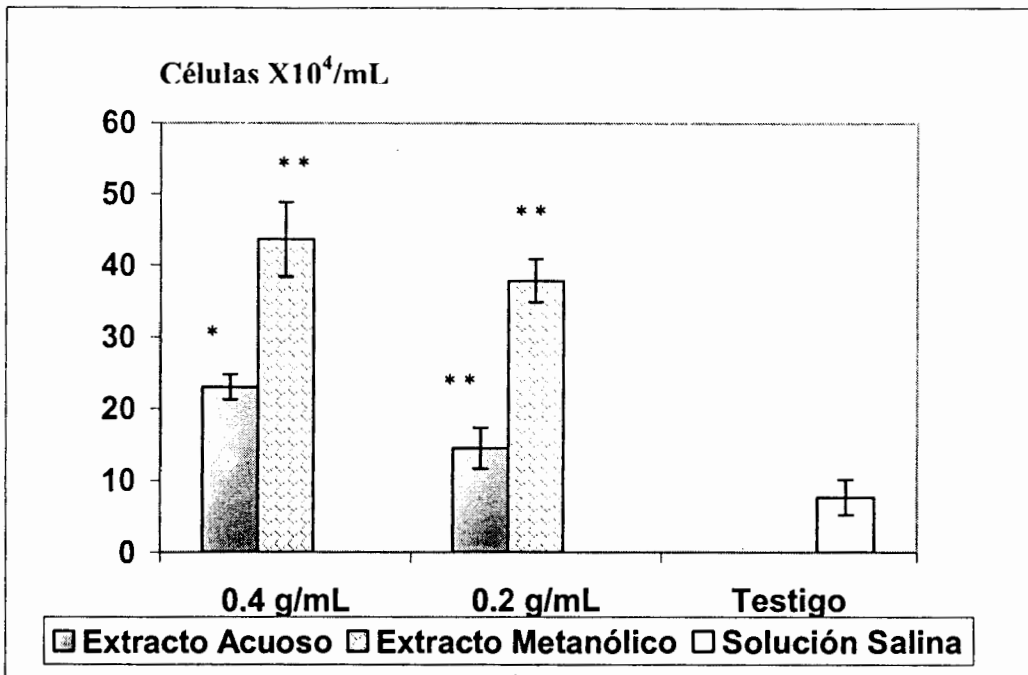


Figura 15. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* en cultivo de células de bazo de ratón. Media ± Error, (n=10). *p<0.01,p<0.001.**

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 ($\times 10^{12}/L$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Eritrocitos ($\times 10^{12}/L$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
0.8	10.15 \pm 0.63	12.29 \pm 2.02*	37.87 \pm 6.20*	11.60 \pm 1.43	23.70 \pm 2.20	54.59 \pm 5.30
0.4	8.72 \pm 0.63	13.65 \pm 0.89*	44.12 \pm 0.73*	11.70 \pm 1.15	22.81 \pm 1.11	42.85 \pm 4.27
0.2	9.21 \pm 0.97	13.90 \pm 2.28*	41.82 \pm 2.55*	12.50 \pm 1.80	22.82 \pm 0.92	43.12 \pm 3.85
0.1	10.14 \pm 1.14	15.07 \pm 1.00*	43.85 \pm 4.58*	12.60 \pm 0.47	27.49 \pm 2.30	46.11 \pm 3.11
Testigo	10.20 \pm 0.91	9.59 \pm 1.10	30.31 \pm 0.41	13.45 \pm 0.36	26.72 \pm 1.15	45.02 \pm 5.10

Media \pm 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 hiperocrómicos.

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).

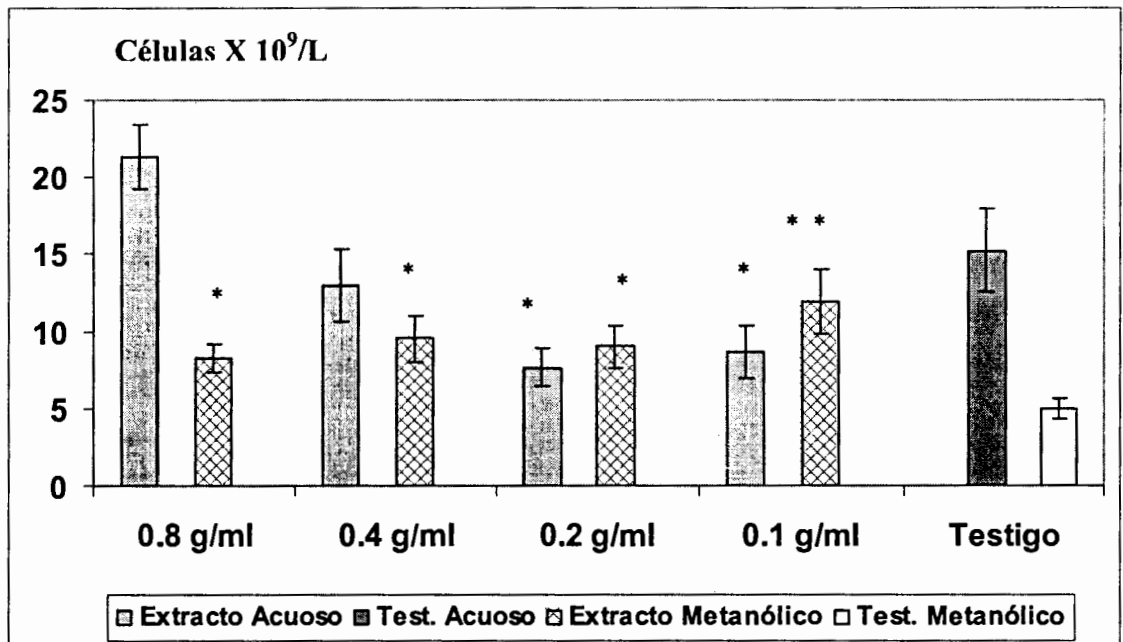


Figura 16. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* sobre la producción de leucocitos *in vivo*. Media \pm Error estándar, (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ respecto al grupo testigo correspondiente.

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).

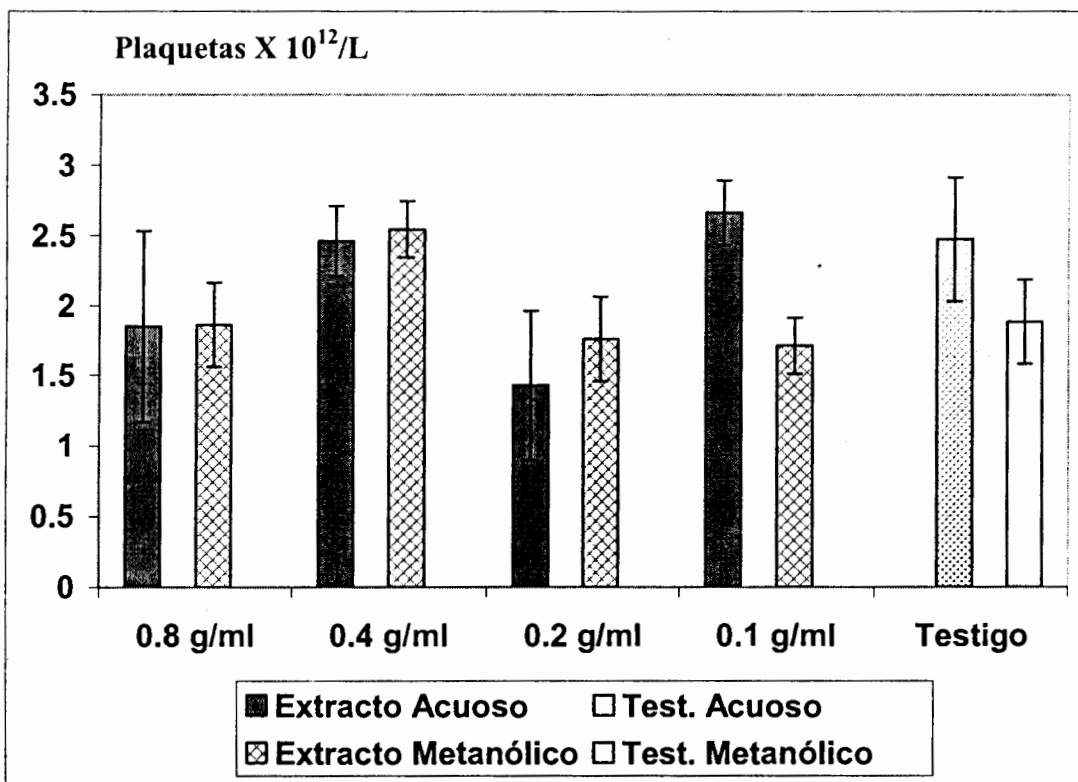


Figura 17. Efecto de los extractos acuoso y metanólico de *S. aristolochiaefolia* sobre la concentración de plaquetas. Media \pm Error estándar, (n=10).

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 ($p < 0.05$).

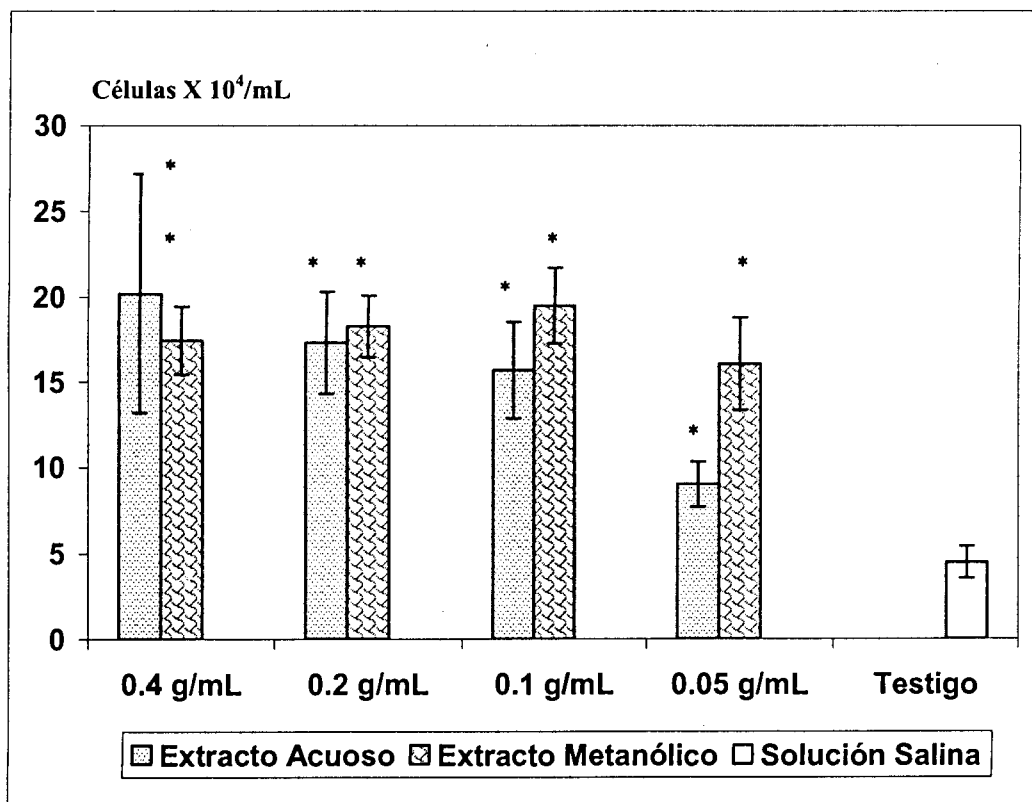


Figura 18. Actividad hematopoyética de *P. major* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm Error estándar, (n=8). * $p < 0.05$ respecto al cultivo testigo

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).

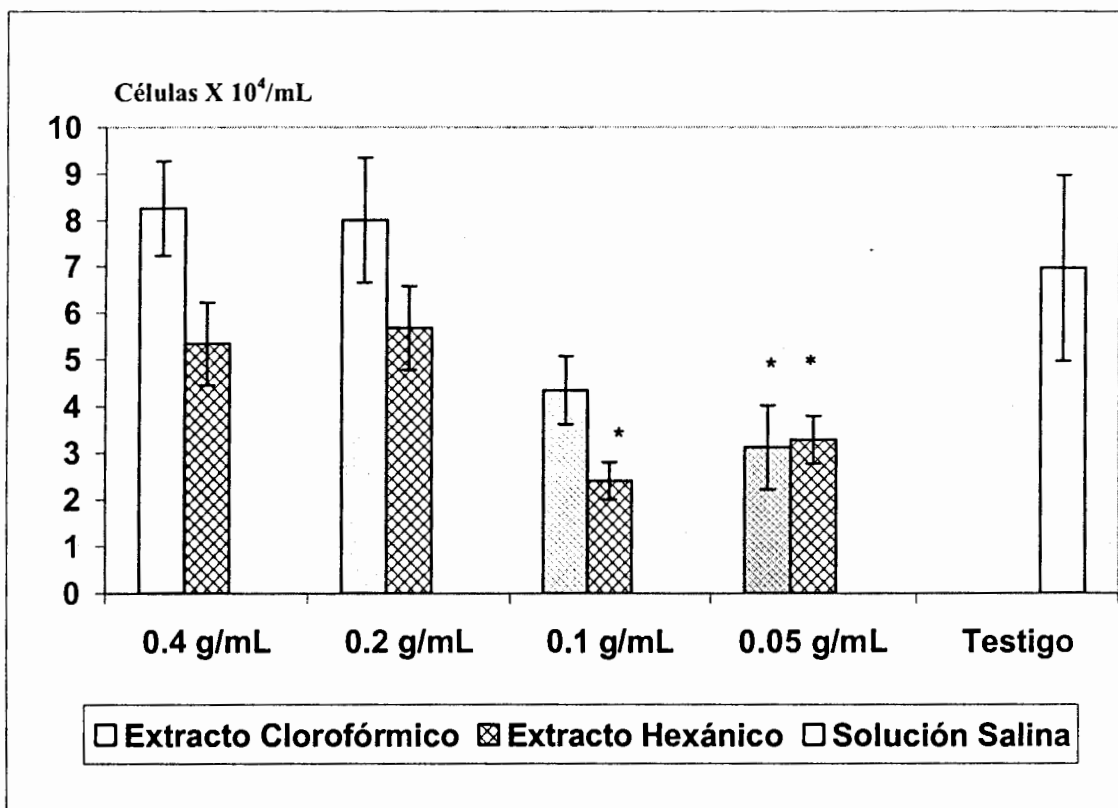


Figura 19. Actividad hematopoyética de *P. major* en cultivo de médula ósea de ratón. Media ± Error estándar, (n=8). *p<0.05 respecto al testigo.

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 ($p < 0.001$).

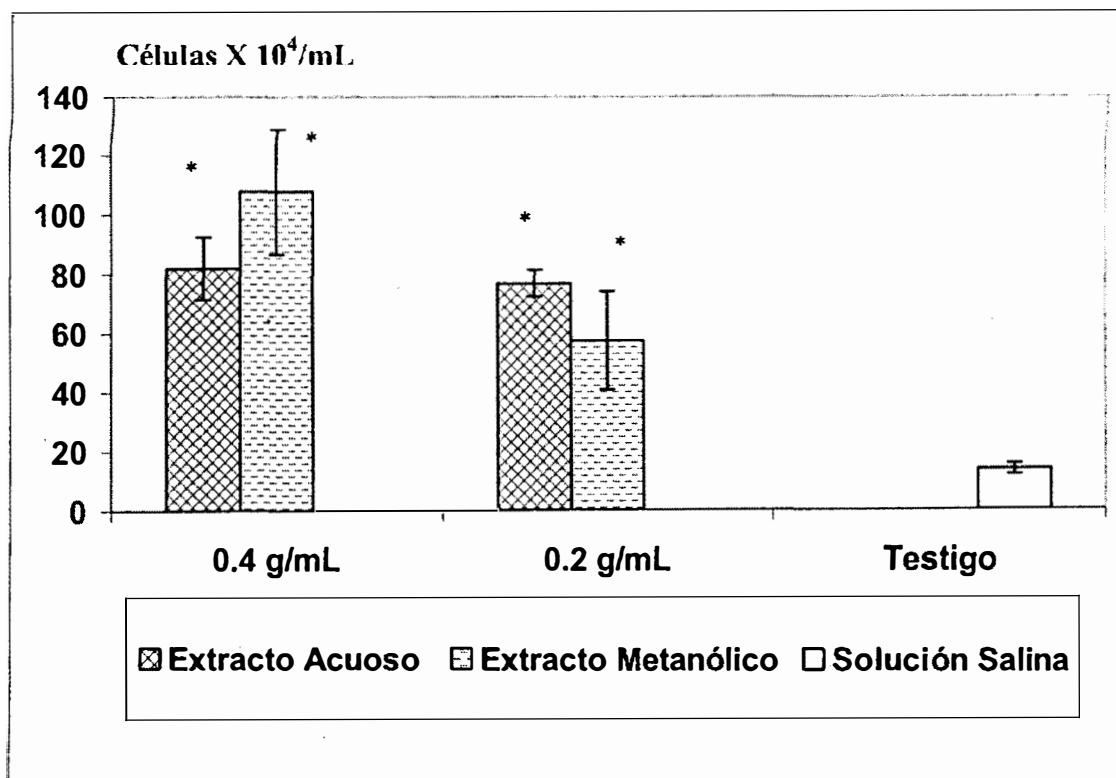


Figura 20. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *P. major* en cultivo de bazo de ratón. Media \pm Error estándar, (n=8). * $p < 0.001$ respecto al testigo.

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 \pm 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).

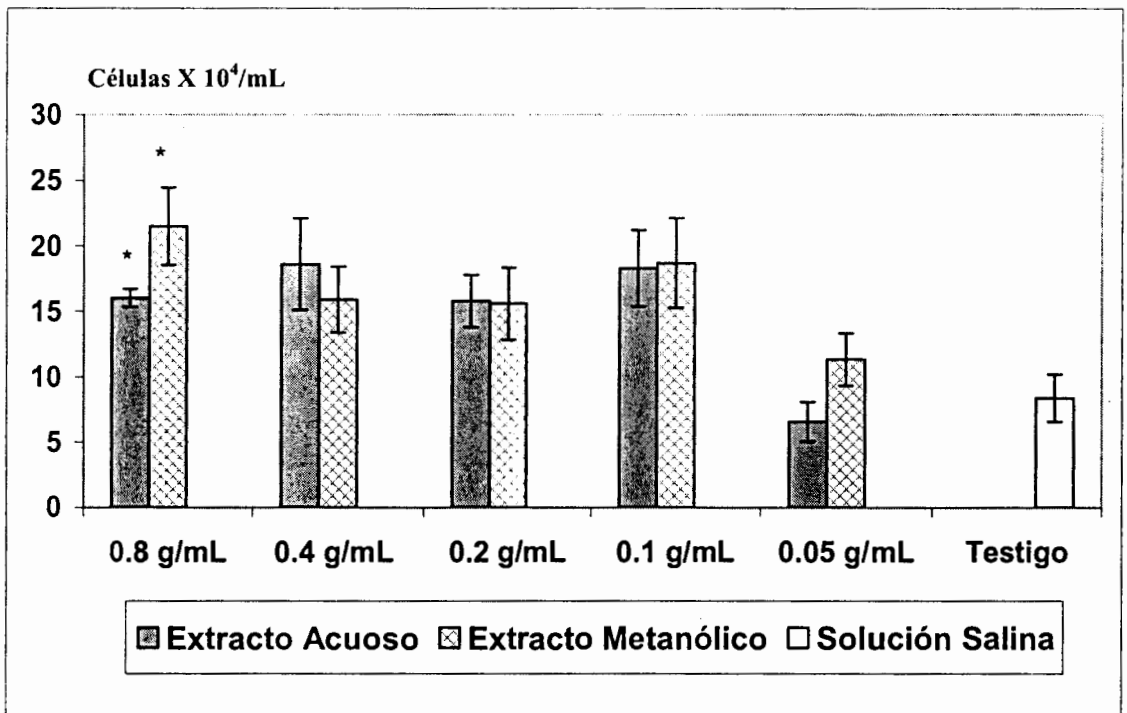


Figura 21. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. californica* en cultivo de médula ósea.

Media \pm 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.

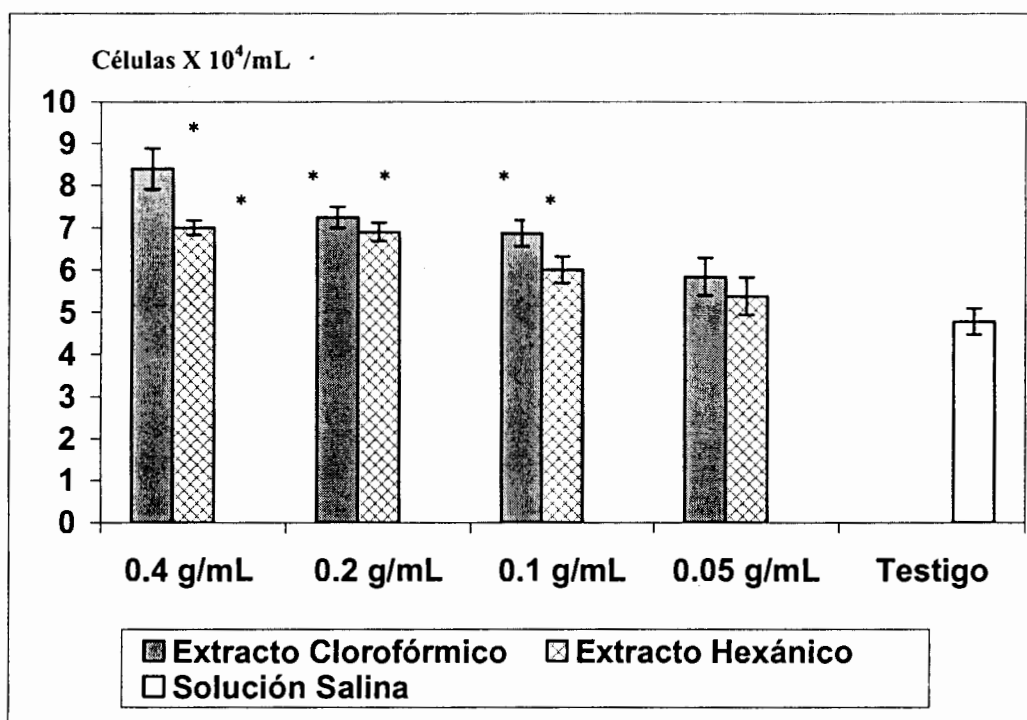


Figura 22. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *A. californica* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm Error estándar, (n=10). * $p < 0.001$ respecto al testigo.

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).

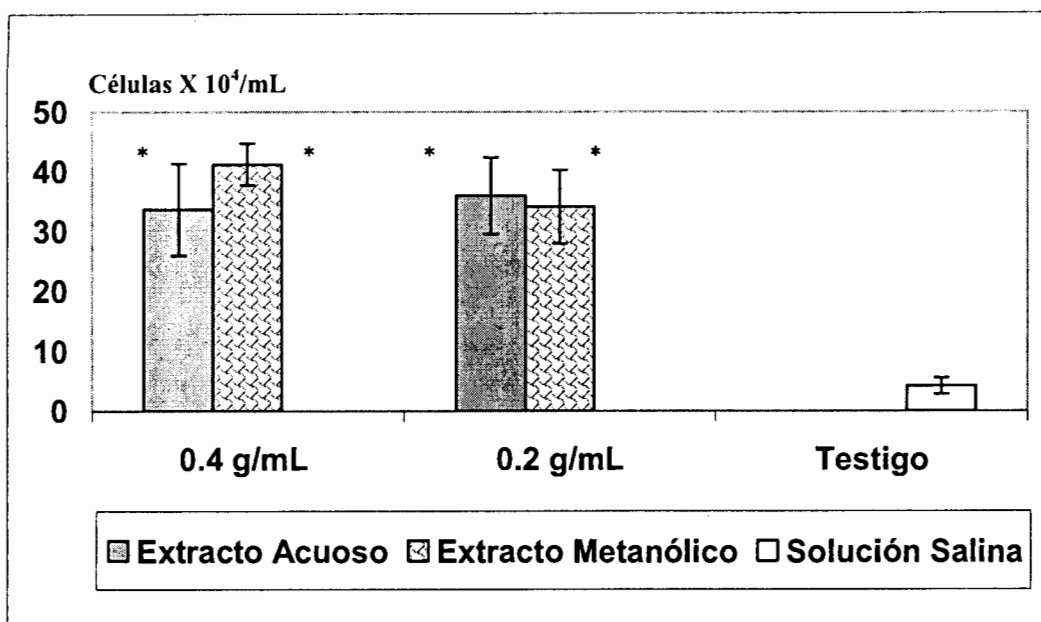


Figura 23. Actividad hematopoyética de *A. californica* en cultivo de células de bazo de ratón. Media \pm Error estándar, (n=10).
* $p < 0.025$, respecto al testigo.

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).

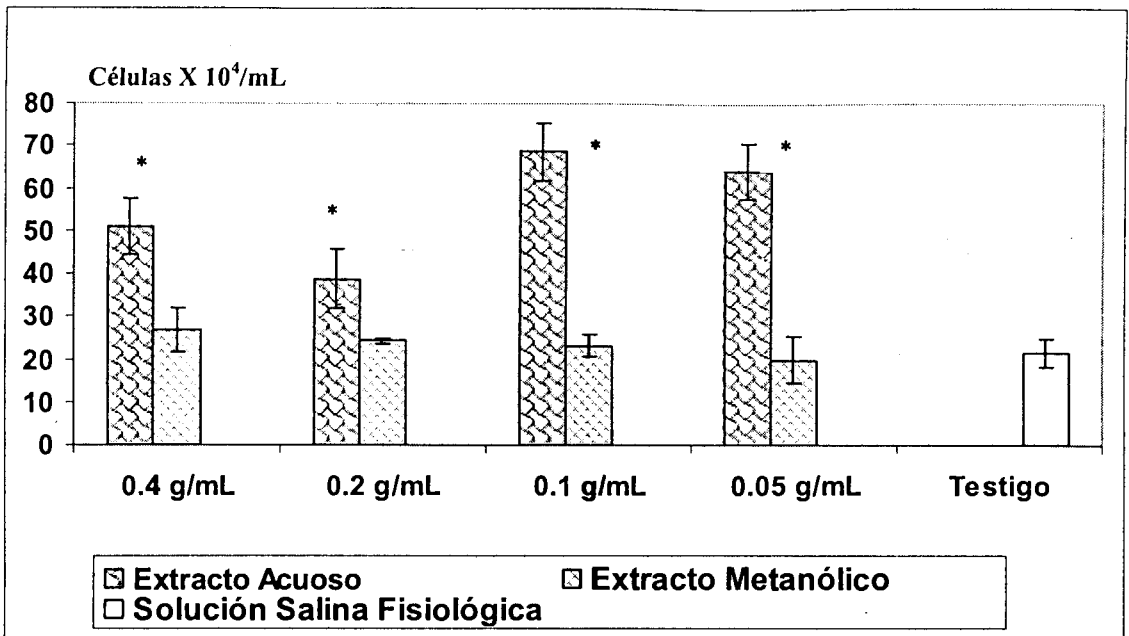


Figura 24. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. adstringens* en cultivo de médula. Media \pm Error estándar, (n=10). *p<0.025 respecto al testigo.

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).

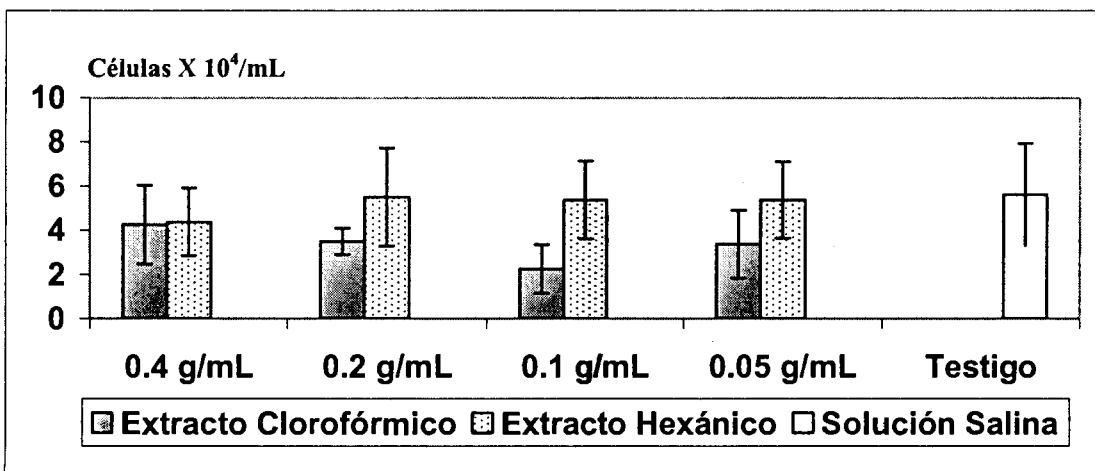


Figura 25. Actividad hematopoyética de los extractos clorofórmico y hexánico de *A. adstringens* en cultivo de médula ósea de ratón. Media \pm error estándar, (n=10).

Por otra parte, los extractos acuoso 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.

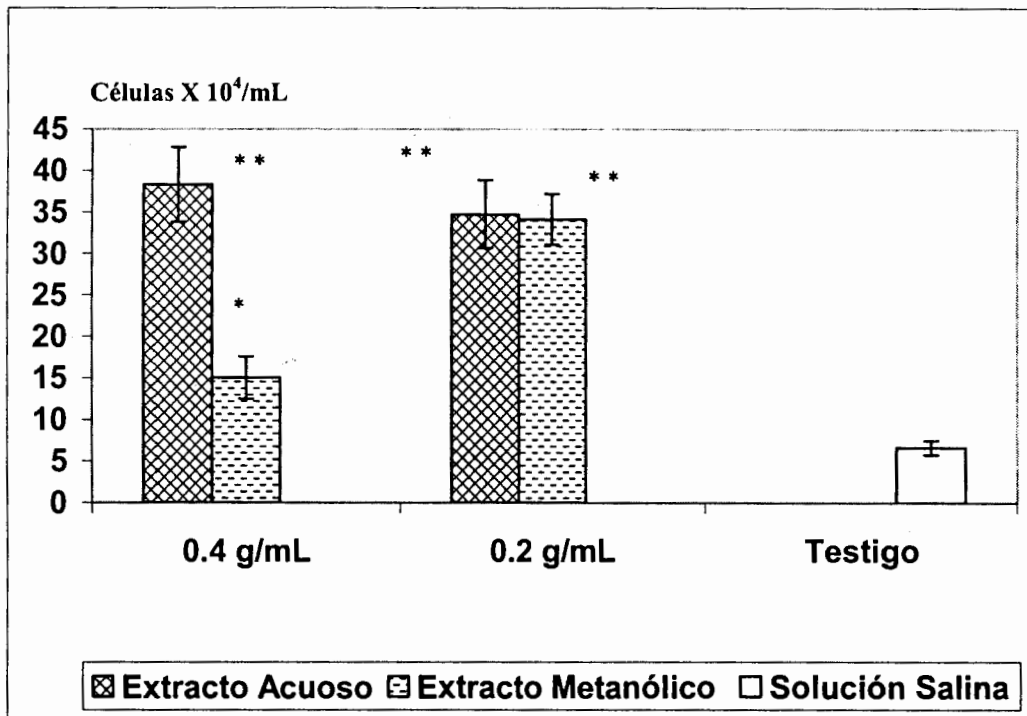


Figura 26. Actividad hematopoyética de los extractos acuoso y metanólico de *A. adstringens* en cultivo de células de bazo de ratón. Media \pm Error estándar, (n=10). *p<0.025, **p<0.001 respecto al testigo.

Actividad hematopoyética de *Amphyterygium 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).

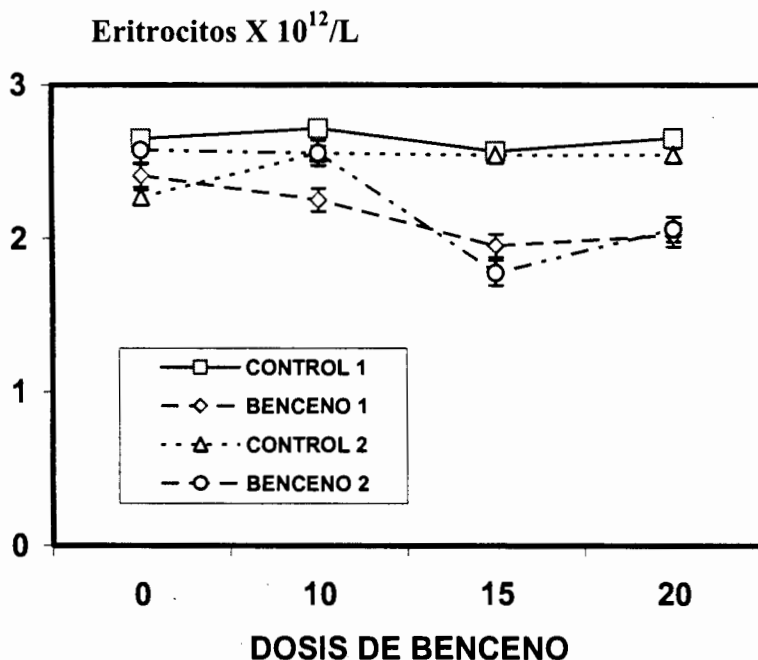


Figura 27. Concentración de eritrocitos en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración Media \pm Error estándar, (n=15). $p < 0.001$ respecto a los grupos testigos.

Además del cambio en la concentración total de eritrocitos, en los ratones tratados mediante el esquema 1, se observaron anomalías 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).

parámetros eritroides

	No. De	CONTROL 1	BENCENO 1	CONTROL 2	BENCENO 2	
DOSIS						
HEMOGLOBINA	0	11.39 +/- 1.053	11.39 +/- 1.053	9.538 +/- 1.201	9.871 +/- 0.874	
(g / dL)	10	10.16 +/- 0.684	9.96 +/- 0.879	10.874 +/- 1.462	8.546 +/- 1.24*	
	15	9.91 +/- 0.742	9.31 +/- 0.481	10.853 +/- 1.301	7.174 +/- 1.308*	
	20	10.31 +/- 0.070	8.25 +/- 1.227*	10.751 +/- 1.068	7.092 +/- 1.383*	
HEMATÓCRITO	0	51.08 +/- 1.52	38.30 +/- 1.32*	43.98 +/- 2.81	39.28 +/- 0.96	
(%)	10	49.52 +/- 1.99	36.45 +/- 2.60*	40.48 +/- 2.27	25.78 +/- 1.81*	
	15	45.54 +/- 1.51	38.47 +/- 1.82*	39.27 +/- 2.10	22.36 +/- 0.86*	
	20	44.80 +/- 0.77	39.98 +/- 2.92*	45.30 +/- 2.58	28.73 +/- 1.01*	
VOLUMEN	0	186.11 +/- 7.22	163.25 +/- 9.38	195.07 +/- 2.82	154.16 +/- 11.2	
CORPUSCULAR	10	259.94 +/- 5.76	164.15 +/- 28.4	164.62 +/- 44.31	95.93 +/- 8.81	
MEDIO	VCM	15	189.35 +/- 4.31	198.07 +/- 11.6	160.32 +/- 17.71	130.92 +/- 5.17
	(fL)	20	204.31 +/- 17.8	200.0 +/- 38.16	177.04 +/- 12.97	218.14 +/- 7.40
CONCENTRACIÓN	A	0	42.64 +/- 2.47	39.41 +/- 2.53	44.07 +/- 3.46	37.35 +/- 4.59
MEDIA DE HEMOGLOBINA		10	54.12 +/- 3.13	45.29 +/- 7.01	44.55 +/- 8.68	39.55 +/- 3.36
M.H.C.		15	41.07 +/- 2.61	48.11 +/- 5.55	44.30 +/- 3.51	43.01 +/- 2.44
	(pg)	20	46.88 +/- 9.19	40.77 +/- 7.61	53.88 +/- 1.10	52.46 +/- 2.13
HEMOGLOBINA		0	18.70 +/- 1.26	29.85 +/- 1.91	22.70 +/- 3.94	25.25 +/- 1.41
CORPUSCULAR MEDIA		10	20.86 +/- 2.60	27.29 +/- 5.51	27.41 +/- 1.64	35.55 +/- 1.64
		15	21.80 +/- 1.51	24.17 +/- 3.51	27.32 +/- 0.36	33.18 +/- 0.36
(M.C.H.C.) (%)		20	23.34 +/- 0.73	20.59 +/- 2.47	23.71 +/- 1.43	25.67 +/- 1.43
RETICULOCITOS		0	0.008 +/- 0.0002	0.019 +/- 0.0029	0.008 +/- 0.0003	0.007 +/- 0.0020
	(%)	10	0.003 +/- 0.0005	0.028 +/- 0.0040	0.007 +/- 0.0003	0.010 +/- 0.0040
		15	0.005 +/- 0.0002	0.013 +/- 0.0050	0.006 +/- 0.0002	0.018 +/- 0.0080
		20	0.003 +/- 0.0005	0.007 +/- 0.0020	0.005 +/- 0.0002	0.002 +/- 0.0003

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 $4.35 \times 10^{12}/L$ (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).

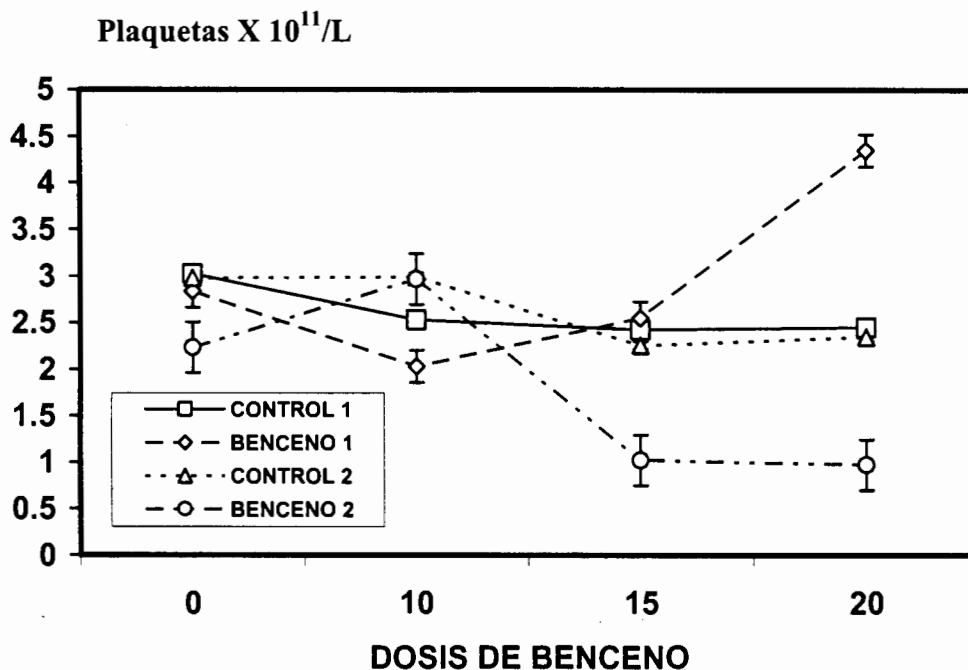


Figura 28. Concentración de plaquetas en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de administración. Media \pm Error estándar, (n=15). $p < 0.001$, a las 15 y 20 dosis respecto al grupo testigo.

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 nuevamente 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).

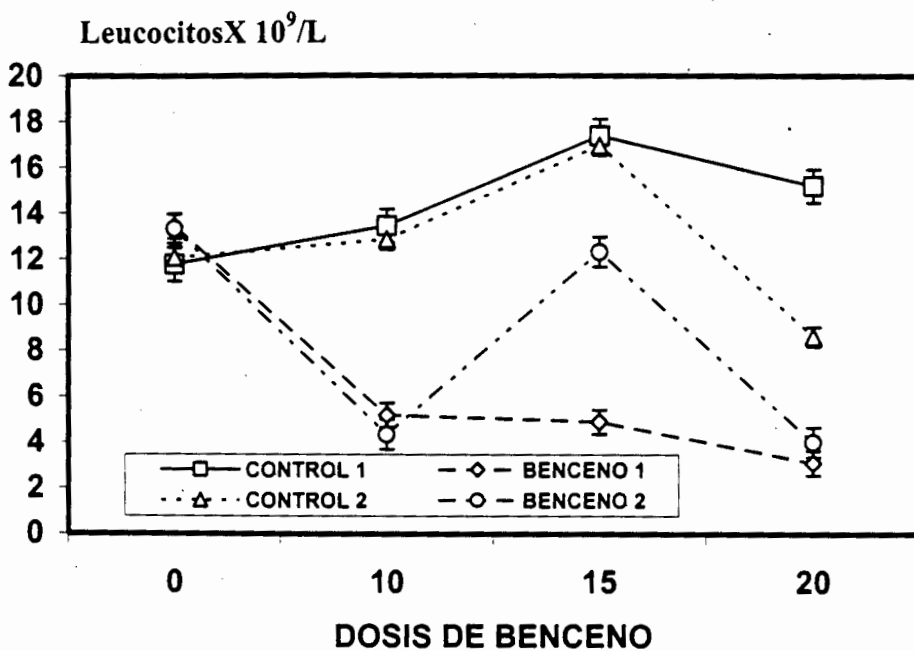


Figura 29. Concentración de leucocitos en ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de inducción.
Media \pm Error estándar, (n=15), $p < 0.001$ respecto al grupo testigo a las 10, 15 y 20 dosis

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				
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).

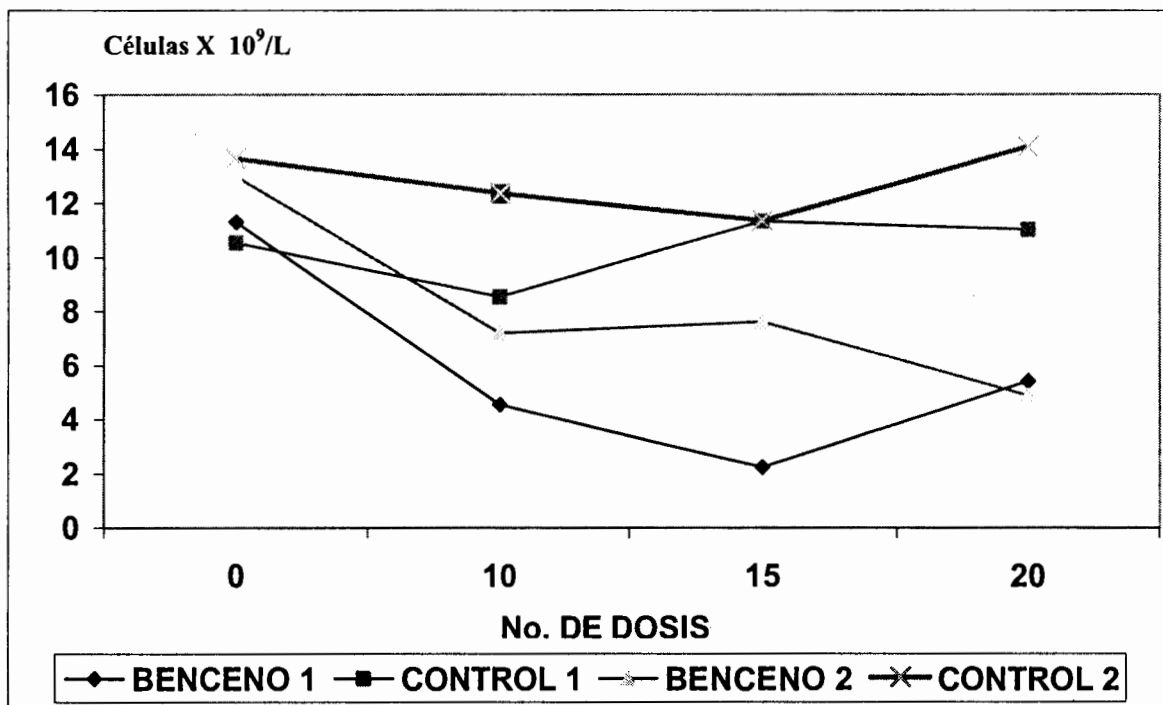


Figura 30. Concentración de células nucleadas en la médula ósea de ratones tratados con benceno mediante dos esquemas de inducción. Media \pm Error estándar, (n=15). $p < 0.05$, respecto a los grupos testigos a las 10, 15 y 20 dosis.

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 relacionarse 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 aplásica 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 megacariocito-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/m³, 10 a 400 ppm) durante 2 semanas, 6 horas por día, 5 días por semana y reportaron que las concentraciones mayores a 320 mg/m³ 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/m³ 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 aplásica 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 aplásica, mientras que en los animales tratados con el esquema 1, se produjo esplenotoxicidad que enmascaró las variaciones hematológicas 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 Pathologic 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 engineering. 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., VanBekkom, 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., Wu, 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 engineering. 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-1, 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 dyserythropoietic 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. Stuttgart, 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: Pathology of the bone marrow. Lennert, K., Hübner, K. (Eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 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 Investigación 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. Ulrich, 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 marrow 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**, 105-111.
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 trasplante. *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 medicina-
les 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**, 213-217.
105. The Merck Index. 9th Edition. Merck & Co. Inc. New Jersey. 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 instipolinámico 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., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, S., Barios, H., Yuste, F., 1987. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticandien oic acid). *Acta Crystallography C*. **43**, 990-992.
111. Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G. 1989. Alkylanacardic acids from *Amphyterygium adstringens*. *Planta Medica* **55**, 579.
112. Watson, W. H., Domínguez, X. A., Vázquez, G., García, S. 1987. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphyterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química* **18**, 89-90.

113. Dorantes-Mesa, S., 1989. Nuevas perspectivas en la anemia aplásica. *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. Bühner, 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 hematotoxicity 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 CD₁ male mice. *Toxicology and Applied*

Pharmacology **59**, 204-214.

138. Baarson, K., Snyder, C. A., Albert, R. E., 1984 Repeated exposures of C₅₇B₁ 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 B₆C₃F₁ Mice (Gavage Studies). Research Triangle Park, NC: National Institutes 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 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 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 Escorcía., 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*.