ISBN: 978-607-00-2083-4

Valoración de la sobrevida de ratones BALB/c inoculados con linfoma murino L5178Y y tratados con los extractos etanólico y acuoso de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton & Rose (cactus estrella)

Brenda Lizbeth Paniagua-Dominguez[1,2], Jorge Peregrina-Sandoval[1], Salvador Velázquez-Magaña[1], Edgardo Flores-Torales[1], Arturo Orozco-Barocio[1]
[1]Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal., 45101, México
[2]Estudiante de la Licenciatura en Biología. Becaria del programa de estudiante sobresaliente de la U de G.
Correo-e: arorozco@cucba.udg.mx

Introducción

La medicina tradicional o herbolaria actualmente representa una alternativa de vida. Los efectos secundarios, y el alto costo de la medicina farmacológica, obligaron a las personas a recurrir, como sus antepasados, a las propiedades "mágicas" que se creía tenían las plantas, curando todo tipo de malestares e incluso enfermedades médicamente irreversibles. El conocimiento y utilización de las plantas por las sociedades humanas tiene una larga e interesante historia, reconociéndose que desde siempre los vegetales satisfacen muy diversas necesidades y una de ellas es la recuperación y el mantenimiento de la salud (Orozco-Barocio 1998).

Antiguas civilizaciones descubrieron las propiedades curativas de plantas medicinales como el ricino (Egipto), la colchicina (Grecia), el opio (Medio Oriente) y la belladona (Roma), así como los Chinos utilizaron el gingsen y la efedrina. Así también, México ofrece una gran variedad de plantas medicinales como el aguacate (*Persea americana*), el gordolobo (*Gnaphalium spp.*) y el toloache (*Datura stramonium*) entre otras (Barnes 1991; Aguilar 1996; Bye 1999).

La información de plantas medicinales de México se encuentra registrada en documentos como el Manuscrito o Códice Badiano (1552), obra escrita en latín y en nahúatl, presenta dibujos a color de 150 plantas autóctonas y sus propiedades curativas (Emmart, 1940). Así mismo, en 1559 el Fraile Francisco Bernadino Sahagún escribió el Códice Florentino (Historia de las cosas de la Nueva España), que describe la historia, religión, organización social - política y costumbres de las culturas indígenas prehispánicas, y en el libro XI incluye la ciencia agrícola y botánica.

Es muy interesante analizar el uso de la medicina tradicional por la población y darnos cuenta de que muchos de estos usos van en relación directa con las enfermedades más comunes de la región, con las facilidades que ofrece el ecosistema, con el intercambio social, así como con las normas vigentes de la religión (Linares 1995) .Un núcleo muy amplio de la población mexicana usa solo plantas medicinales y remedios caseros, por no tener recursos, ni posibilidad de acceso a la medicina farmacológica.

Del vegetal se utilizan semillas, frutos, flores, hojas, tallos y la corteza de plantas y hierbas, que se emplean como, lociones, tabletas y soluciones líquidas e inhalantes (Valdez-Aguilar y cols. 2002). Se ha observado que la combinación pragmática de remedios herbolarios (tisanas, infusiones, maceraciones, tés, etc.) y la medicina farmacológica (rayos X, antibióticos, etc.) resulta altamente eficaz (Lozoya 1997).

La medicina herbolaria siegue utilizándose ahora en el siglo XXI, simplemente, porque tiene miles de años funcionando.

Algunas plantas son utilizadas en enfermedades donde el sistema inmunológico se ve afectado, como en procesos inflamatorios o en inmunodeficiencias, enfermedades degenerativas y el desarrollo de cáncer (Borchers 1997; Wagner 1994).

Inmunidad y herbolaria

La inmunidad biológica es la respuesta de los eventos celulares y moleculares que ocurren cuando un organismo está en contacto con microorganismos, moléculas extrañas o la agresión tisular (Abbas 2003). Esta respuesta inmune puede ser afectada en varios niveles por diferentes agentes. La modulación de la inmunidad puede afectar la inducción, la expresión, la amplificación o la inhibición de las fases aferente, central y eferente:

- La Fase Aferente incluye: el reconocimiento y procesamiento del antígeno, y la interacción de las células linfoides.
- La Fase Central comprende la función de las células cooperadoras y supresoras; la proliferación de las poblaciones de células respondedoras; la diferenciación de células efectoras, y la síntesis de productos inmunes, tales como linfocinas y anticuerpos; y
- La Fase Eferente establece la reacciones mediadas por células T, reacciones antígeno–anticuerpo, y el sistema complementario efector [macrófagos, células cebadas (mastocitos) y la actividad del complemento] (Abbas 2003).

Desde la década de los noventa se han utilizado sustancias de origen vegetal con la intención de conocer sus efectos inmunomoduladores (Wagner 2004). La OMS ha definido requerimientos especiales para los inmunomoduladores de fuentes naturales; por ejemplo la degradación biológica rápida, la ausencia de efectos colaterales y ser químicamente puros o sin toxicidad aguda (Ramírez-León 2006)

La investigación actual se dirige a la búsqueda y validación de moléculas obtenidas de productos naturales, con este fin delimitamos nuestro interés a las cactáceas (Cactaceae), plantas suculentas, generalmente de ambientes áridos, nativas de América e introducidas a otros continentes. A las cuales se les atribuyen propiedades: diuréticas, analgésicas, cardiotónicas, laxantes, astringentes, desparasitantes, hipoglucemiantes e incluso alucinógenas (Bravo-Hollis 1999).

Lophocereus schottii (Engelm) Britton & Rose es un cactus (familia Cactaceae) que llega a medir de 2 a 4 m de altura, presenta de 5 a 10 costillas, sus flores son blancas a rosa pálido, es una especie endémica de México, de clima cálido, entre los 5 y 300 m snm,

asociada a dunas costeras y matorrales xerófilos. Se encuentra en Sinaloa, Sonora, Baja California Sur y Norte, así como el desierto de Arizona en los Estados Unidos de América. Sus nombres comunes son cardona, muso, sina, sinita, cactus estrella, lupeal, garambullo. Es empleado comúnmente para la diabetes, úlceras, llagas, malestares estomacales (Encarnación 1992). En el estado de Sinaloa los Ahome lo utilizan para tratar la tuberculosis; en Sonora se usa el tallo para curar heridas, llagas, diabetes, úlceras y cánceres estomacales (Argueta y cols. 1994). ***Química:*** De la planta completa y del tallo se han aislado los alcaloides de isoquinolina, lofocerina y pilocereina (pilocereina solo está presente en tallos y lofocerina se detecto en la planta completa). Además el tallo contiene los triterpenos: lofenol, lupeol y esterol escotenol (Argueta y cols. 1994, Morales-Rubio y cols. 2006). ***Farmacología:*** El extracto etanólico de la planta, presento actividad citotóxica sobre células de carcinoma humano 9kB y antitumoral en ratón con leucemia P388, cuando se administró por vía intraperitoneal. Contiene compuestos bioactivos como una tetrahidroisoquinolina denominada lofocina que presenta actividad anticancerígena (Kircher 1969; West y cols 1975; Wani y cols 1980). Presenta actividad inhibitoria en las siguientes bacterias: *Salmonella typhi, Enterobacter aerogenes y Listeria monocitogenes*. Se utiliza en el tratamiento para cáncer, ulcera, diabetes y reumas . (Argueta y cols. 1994, Morales-Rubio y cols. 2006). ***Dosis:*** Tomar los tallos en infusión (100g de tallo en 2 l de agua). Se hierve hasta que quede un litro de cocimiento, se cuela y se pone en el refrigerador para tomarla durante todo el día como agua de uso, el tiempo que sea necesario (Bravo-Hollis 1999). *Lophocereus schottii* es una cactácea endémica de México, se le atribuye un efecto benéfico sobre padecimientos que se presentan con mayor frecuencia en la actualidad, como el cáncer úlceras, diabetes y reumas; en ésta se han identificado alcaloides que pueden actuar como inmunomoduladores en el organismo. El efecto de éstos no es totalmente conocido.

El propósito de este estudio es probar las fracciones obtenidas del tallo por extractos etanólico y acuoso de *Lophocereus schottii* en ratones inmunosuprimidos con linfoma murino L5178Y, un cáncer ascítico que tiene su origen en el timo y se manifiesta en los ratones como un liquido que se acumula en la región peritoneal.

Objetivos

Investigar el efecto de las fracciones de extractos etanólicos y acuosos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton & Rose en la valoración de la sobrevida de ratones inoculados con linfoma murino L5178Y.

Objetivos Específicos:

1.1 Determinar la Dosis Letal 50 (DL_{50}) de *Lophocereus schottii* sobre ratones sanos, con el fin de establecer la dosis terapéutica.

1.2 Comparar la sobrevida de ratones inoculados con células de linfoma murino L5178Y con y sin tratamiento del extractos etanólico y acuoso de *Lophocereus schottii*.

Material y Métodos

Material vegetal.

Debido a la anatomía del cactus que nos permite separar físicamente los tejidos y con el conocimiento de que los tejidos almacenan y sintetizan compuestos distintos, optamos por hacer una separación física de estos en tres grupos: uno que incluye el tejido vascular o de conducción, el segundo que incluye los tejidos epidérmico y de sostén, y el tercero incluye una mezcla de los tres tejidos (planta completa)

De un tallo del cactus de *L schottii* de 440gr y 30 cm de largo, se separaron los tejidos como arriba se menciona. Se homogenizaron con un molino de mano, en trozos de 5 mm^3 de tamaño aproximadamente; se obtuvo 297 g de tejido sostén y dérmico y 92 g de tejido vascular. A estos tejidos se realizaron extracciones inmediatamente después de su molienda. De estas muestras se realizaron los extractos acuosos y etanólicos en una proporción de 10 g de muestra en 100 ml de solvente (agua o etanol):

Se realizaran 3 extractos:
Las extracciones alcohólicas se hicieron con etanol al 100% dejando reposar las muestras por 48 hrs a temperatura ambiente en completa oscuridad.

1. **Extracto A** 25 g de tejido de sostén y dérmico en 250 ml de etanol al 100%
2. **Extracto B** 25 g de tejido de sostén y dérmico más 25 g de tejido vascular (planta completa) en 50 ml de etanol al 100%.
3. **Extracto C** 40 g de tejido de sostén y dérmico en 400 ml de agua destilada mediante infusión (se calienta el agua a temperatura de ebullición, se coloca el material vegetal y se retira del calor, dejándose reposar por 48 hrs a temperatura ambiente en ausencia de luz).

NOTA: Los extractos se filtraron con gasas y se almacenaron en refrigeración, hasta su concentración y liofilizado.

Concentrado del Extracto.

Las mezclas de los extractos obtenidos después de las 48 hrs de reposo, se concentró el solvente (agua o etanol) a 1/10 de su volumen inicial con un evaporador rotatorio modelo RE marca YAMATO SCIENTIFIC, posteriormente los concentrados resultantes se llevaron al secado completo en un sistema de secado en frio (liofilizador) marca LABCONCO modelo FREEZONE 4.5; esta técnica consiste en la eliminación del solvente mediante su congelamiento y evaporación al vacío, provocando que la sustancia a liofilizar se sublime. La ventaja de esta técnica es no variar la composición química (valor nutricional o características organolépticas) de los extractos.

Animales de estudio

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c hembras y machos de 20 a 25 g de peso y de 6 a 8 semanas de edad, mantenidos a temperatura de cuarto, ciclos de 12 horas de luz y de oscuridad con alimento y agua *ad libitum*. Se utilizaron grupos de 10 ratones machos y 10 de hembras para los estudios de sobrevida y para determinar la Dosis Letal 50 (DL_{50}).

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50})

Para determinar la DL_{50}, se formaron 3 grupos de 10 ratones machos c/u de la cepa BALB/c, de 6 semanas de edad y de 20 a 25 g de peso. A estos grupos se les administraron dosis únicas de los 3 diferentes extractos por vía oral (v.o.). Se utilizaron las siguientes dosis : 50, 500 y 5000 mg/kg de peso corporal diluidas en 0.2 ml de agua destilada y un grupo control al cual se le administró el vehículo. Los animales se mantuvieron en observación durante 14 días para registrar las manifestaciones clínicas como muerte, cambios de conducta, alteraciones respiratorias y motoras, postración, piloerección, etc. (Loomis, TD., 1982; Kent, 1998).

Linfoma Murino L5178Y

En el presente trabajo se utilizó el linfoma murino L5178Y como modelo de inmunosupresión. Es un linfoma de origen tímico y de origen espontáneo en ratones de la cepa DBA/2, que fue adaptado en forma ascítica y mantenido por trasplante seriado en dicha cepa (Alexander, 1962). Sin embargo, se ha conservado en la cepa BALB/c con la cual es compatible en antígenos tisulares en el locus $H-^{2d}$ (Gómez-Estrada 1977; 1979).

Estudio de sobrevida de ratones con linfoma murino L5178Y tratados o no con extractos de *L schottii*

Después de la determinación de la DL_{50} (ver resultados), se consideró utilizar 5 mg/kg de peso corporal de cada uno de los extractos (arriba mencionados) como dosis terapéutica administrado por vía oral, en un volumen de 0.1 ml.

Se establecieron dos tipos de tratamiento, el primero considerado como "pretratados" ya que se dosificaron con 10 días de anticipación a inocular el linfoma murino y continuar el tratamiento por otros 10 días, es decir, los ratones de estos grupos se les administró por 20 días 5 mg/kg de peso, de cada uno de los 3 extractos. La segunda forma de tratamiento llamado "postratados" fueron aquellos grupos que solamente se les dosificó durante 10 días consecutivos después de inocularles el linfoma murino, con la misma concentración que los otros grupos. Además se agregaron otros dos grupos de ratones a los que solo se les inoculó el linfoma sin darles tratamiento. Todos los grupos constan de 10 individuos y cada extracto se administró a dos grupos de ratones, uno de hembras y otro de machos (ver tabla). Todos los ratones de todos los grupos recibieron 2 x 10^4 células del linfoma murino L5178Y.

Grupo/sex	N	Tratamiento	Extracto	Tejidos vegetales	Solvente
A / hembras	10	Pretratadas	A	Sostén/dérmico	Etanol
A / machos	10	Pretratados	A	Sostén/dérmico	Etanol
A / hembras	10	Postratados	A	Sostén/dérmico	Etanol
A / machos	10	Postratados	A	Sostén/dérmico	Etanol
B / hembras	10	Pretratadas	B	Sostén/dérmico/vascular	Etanol
B / machos	10	Pretratados	B	Sostén/dérmico/vascular	Etanol
B / hembras	10	Postratados	B	Sostén/dérmico/vascular	Etanol
B / machos	10	Postratados	B	Sostén/dérmico/vascular	Etanol
C / hembras	10	Pretratadas	C	Sostén/dérmico	Acuoso

C / machos	**10**	**Pretratados**	**C**	**Sostén/dérmico**	**Acuoso**
C / hembras	**10**	**Postratadas**	**C**	**Sostén/dérmico**	**Acuoso**
C / machos	**10**	**Postratados**	**C**	**Sostén/dérmico**	**Acuoso**
D / hembras	**10**	**Solo tumor**	**D**		**Agua**
D / machos	**10**	**Solo tumor**	**D**		**Agua**

Análisis estadístico

Se registraron las fechas de muerte en los grupos de ratones inmunosuprimidos con el linfoma murino L5178Y, tanto los que recibieron agua como los grupos que recibieron tratamiento con los diferentes extractos de *L schottii*. Las evaluación estadística de las curvas de sobrevida fueron analizados mediante la Prueba de Kaplan-Meier y la prueba Log Rank. El nivel de significancia fue $p<0.05$.

Resultados

La DL_{50} no se determinó concretamente, ya que las dosis mayor de 5000 mg no se pudo diluir en el volumen de dosificación (0.2 ml). Pero a la dosis de 500 mg de los tres extractos, los ratones no presentaron ninguna alteración conductual o fisiológica establecida por las normas toxicológicas (Loomis, TD., 1982; Kent, 1998). Los animales se dejaron en observación por más de 3 meses y nunca se presentó ningún signo de alteración fisiológica. Por lo que consideramos utilizar la concentración de 5 mg/kilogramo de peso corporal en un volumen de 0.1 ml de agua como dosis experimental administrado oralmente.

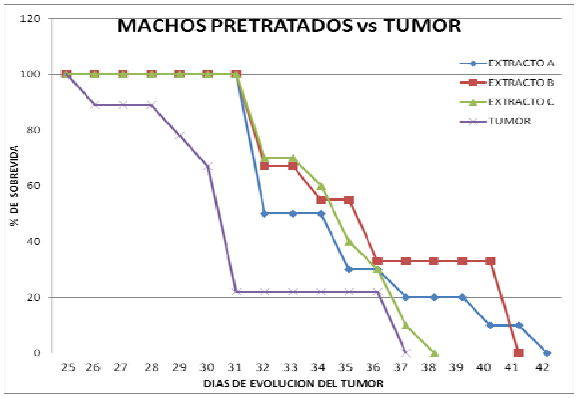
Una vez tratados los ratones con los diferentes extractos y variables de sexo y modo de administración, pre y postratados, encontramos lo siguiente:

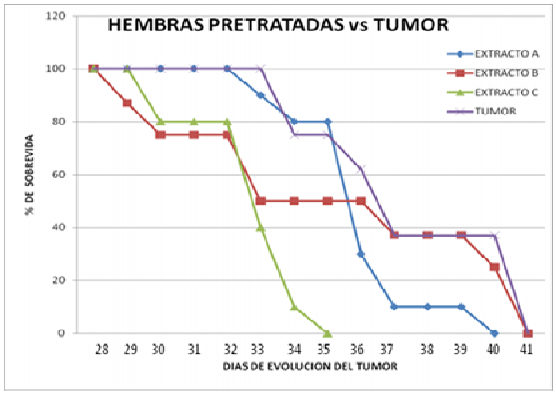
1. Existe una diferencia estadística entre los grupos de ratones tratados y los no tratados.
2. No hay diferencia entre las formas de tratamiento, en los grupos de ratones machos, el efecto protector de los tres extractos es igual tanto si se administra antes como a la vez de la inoculación del tumor. Aunque se observa una clara
3. Hay una clara diferencia en el efecto de los extractos, como en el comportamiento del desarrollo del tumor en relación al sexo. La hembras con tumor sin tratamiento viven más tiempo que los machos; de la misma manera, el efecto de los extractos promueve la muerte más rápida en las hembras tratadas.
4. En relación a la actividad antitumoral de los extractos, se observa que el extracto C (tejido sostén y dérmico en infusión) presenta un menor efecto que los otros dos extractos. Podría ser a que las sustancias extraídas con propiedades antitumorales sean de menor polaridad por lo que no son extraídas por el agua.

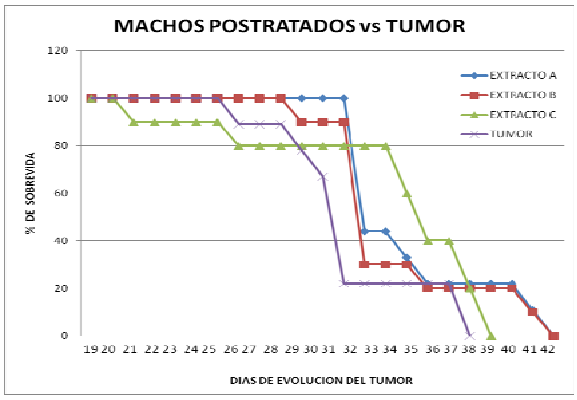
Conclusiones

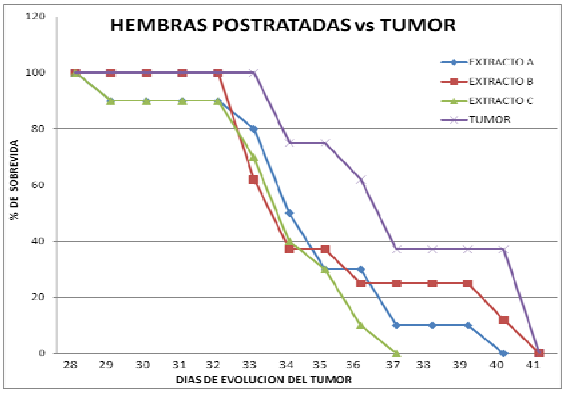
Con los datos obtenidos podemos concluir que los extractos etanólicos de *L schottii* promovieron significativamente un aumento en la sobrevida de los ratones machos inoculados con el linfoma murino L5178Y. Cabe mencionar que los cánceres producen una serie de mecanismos que les permite evadir o inmovilizar al sistema inmunológico del hospedero lo que se manifiesta con un deterioro de la salud de

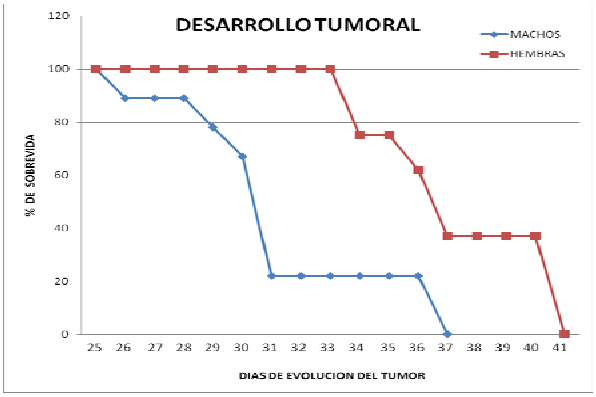
individuo terminando, la mayoría de la veces con la muerte de éste. Es nuestro interés continuar con los estudios inmunológicos que nos permita elucidar el mecanismo biológico por el cual estos extractos permiten un aumento de la sobrevida. También es importante demostrar que efectos presentan las hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) en el desarrollo diferencial de este linfoma en los distintos sexos, así como identificar como actúan estos extractos de *L schottii* con la fisiología de estas hormonas ya que en el análisis de la sobrevida de las hembras parece que hay un sinergismo entre estos extractos y los mecanismos biológicos propios del desarrollo del linfoma, provocando una disminución significativa en el porcentaje de la sobrevida.











Bibliografía

Abbas, A, A, Lichtman. 2003. *Celular and molecular inmunology*. 5th ed. Saunders. United State of America. 563 pp.

Aguilar, A; Camacho, J.; Chino, S.; Jacquez, P.; López, E. 1996. *Plantas Medicinales del Herbario IMSS*. 1ª reimpresión. IMSS. Méx.

Alexander, P. 1962. On the mode of action of some treatments that influence the radiation sensitivity of cells. Trans.N.Y.Acade. Sci. Series II, 24:966-978.

Argueta-Villamar, A, L.M, Cano-Asseleih, M.E, Rodarte. 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana II*. Instituto Nacional Indigenista. México. 1028 pp.

Barnes, S. 1991. *"El Árbol, fuente de vida"* . FAO. México. 26 p.

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

Bravo-Hollis, H, L, Scheinvar. 1999. *El Interesante mundo de las cactáceas*. Fondo de Cultura Económica – Conacyt. México. 155-165 pp.

Bye, R.; Linares, E. 1999. Plantas Medicinales del México Prehispánico. *Revista Arqueología Mexicana*. **VII** (39) 4-13 pp.

Emmart, E.W. 1940. *The Badianus Manuscript (Codex Barberini, Latin 241). Vatican Lybrary ; an aztec herbal of 1552*. Introduction, translation and annotations by E.W. Emmart. The Johns Hopkins Press. Baltimore.

Encarnación, D. R. 1992. *Medicina Tradicional y Popular de Baja California Sur*. Secretaría de Educación Pública y Artes Gráficas, UABCS, México. p.122.

Kent, C. 1998. *Basics of Toxicology*. Willey & Sons.

Kircher, H.W. 1969. The distribution of sterols, alkaloids and fatty acids in senita cactus, *Lophocereus schottii*, over its range in Sonora, México. *Phytochemistry*, **8**: 1481-1488.

Linares E, Flores B, Bye R. 1990. *Selección de plantas medicinales de México*. Limusa. México. 125 pp.

Loomis T. D. 1982. *Fundamentos de Toxicología*. Zaragoza, Esp. Acribia.

Lozoya, X. 1997. *Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy*. Investigación y Ciencia. (254) 4-10 pp.

Morales Rubio M.E., J. Verde Star, A Oranday Cárdenas, C Rivas Morales, K Arévalo Niño, J.F.Treviño Neávez, P. Carranza Rosales, D. E Cruz Vega. 2006. Actividad Biológica de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose. **En:** 2° Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, Qro. No. 59. RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición. www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007

Orozco-Barocio, A. 1998. *Modulación de la respuesta inmune de ratones Balb/c con linfoma murino L5178Y tratados con acíbar de Aloe vera (L)* Tesis Doctoral, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. 52 pp.

Ramírez-León, G A. 2006. *Efecto inmunomodulador de Amphypterygium adstringens (Schlect) Standl. En la respuesta immune cellular de ratones BALB/c con linfoma murino L5178Y*. Tesis de Maestría, CUCS, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. 53 pp.

Valdez-Aguilar, R, A, Aguilar-Contrera, M.E, Lopez-Villafranco, S, Xolalpa-Molina. 2002. *Herbolaria Mexicana*. CONACULTA, México D.F. 17, 19, 43 pp.

Wagner, H, N.R, Farnsworth. 1994. *Economic and Medicinal Plant Research,* Vol 6. Academic Press Limited, Estados Unidos de América. 189-226 pp.

Wani, M.C., J.B. Thompson, H.L. Taylor, M.E. Wall, R.W. Miller, A. T. Mc Phail. 1980. X- ray crystal and molecular structure of the racemic dímeric tetrahydroisoquinoline alkaloid lophocine, probably an artifact, from *Lophocereus schottii*. *Journal of Chemical Research- S*. (1):15.

Wagner H. 2004. Natural products chemistry and Phytomedicine research in the new millenium: new developments and challenges. *ARKIVOC*. (7) 277-284.

West, L., J.L. Mc Laughlin, W.H. Earle. 1975. Cactus alkaloids**.** Part XXV. Pilocereine from *Lophocereus schottii* formae monstrosus and mieckleyanus. *Phytochemistry*, **14**: 291-292.