

Efecto protector de *Petiveria alliacea* L. (Anamú) sobre la inmunosupresión inducida por 5-fluoruracilo en ratones Balb/c

[Protecting effect of *Petiveria Alliacea* (Anamu) on the immunosuppression induced by 5-fluoruracil in Balb/c mice]

Alexander BATISTA DUHARTE¹ Imilsis URDANETA LAFFITA¹, Meredis COLÓN SUÁREZ¹,
Juan ESMÉRIDO BETANCOURT¹, Edgar PUENTE ZAPATA¹, Alfredo ALFONSO CASTILLO¹,
Hilario SALAS MARTÍNEZ¹ y Marta Zoe LEMUS RODRÍGUEZ²

¹Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Santiago de Cuba 90400, PO Box 4033, Cuba.

²Laboratorio Farmacéutico Oriente. Santiago de Cuba, Cuba

*Contactos / Contacts: Alexander BATISTA DUHARTE E-mail address: a.batista@toxi.scu.sld.cu

Abstract

A preclinical study was carried out to determinate the protective properties of *Petiveria alliacea* Linn on 5-Fluoruracilo (5-FU)-immunosuppressed animals, a cytostatic drug often used in cancer treatment. Were use five groups of female Balb/c mice (5 mice/group). Two groups were treated with 400 and 1200 mg/kg of *P. alliacea* leaves and stems powder respectively, and a third group was treated with carboxymethyl cellulose as vehicle. Two additional control groups were set up: a 5-FU treated group, as immunosuppression control, and a NaCl solution (0.9 %) treated group. Animals were treated daily for five days and then a unique dose of 150 mg/kg of 5-FU was administered and the treatment continued for another four days. At termination blood and tissue samples were collected for leukocyte total count, analysis of bone marrow cellularity, thymus weight and total IgG antibody forming cells. Our results show that the group treated with the highest dose of *P. alliacea*, was less affected by 5-FU-induced immunosupresion compared with the other treated groups. The results derived from this study suggest that *P. alliacea*, a medicinal plant product, could be used in patients under antineoplastic regimens to avoid the deleterious adverse effects of the immunosuppressive drugs.

Keywords: inmunosupresion, *P. alliacea* L, anamú, inmunostimulation, 5-fluoruracilo

Resumen

Se realizó un estudio preclínico para la determinación de las propiedades protectoras de la planta *Petiveria alliacea* Linn sobre la inmunosupresión inducida por la droga citostática 5- Fluoruracilo (5-FU), la cual se utiliza muy frecuentemente en la terapia contra el cáncer. Se utilizaron cinco grupos de ratones hembras Balb/c (5 ratones por grupo) que incluyeron dos grupos de tratamiento con dos niveles de dosis del polvo de las hojas y tallos de la planta: 400 y 1200 mg/kg así como grupos controles con solución de NaCl y con el vehículo (solución de carboximetil celulosa) por vía oral, aplicados durante 5 días, luego una administración única de 150 mg/kg de 5-FU y la continuación del tratamiento en los restantes 5 días. En las variables: conteo global y diferencial de leucocitos celularidad de la médula ósea, peso del timo y Células Formadoras de Anticuerpos (CFA) IgG totales, se pudo observar que el grupo de mayor dosis de *P. alliacea* tuvo una menor afectación por la inmunosupresión inducida por 5-FU, en comparación con el resto de los grupos tratados. Estos resultados apoyan el uso de formulaciones de esta planta en pacientes que reciben tratamientos antineoplásicos para la protección contra la inmunosupresión.

Palabras Clave: inmunosupresión, *P. alliacea* L, anamú, inmunoestimulación, 5-fluoruracilo

Recibido | Received: 9 de Febrero de 2011.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 23 de Marzo de 2011.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2011.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Alexander BATISTA DUHARTE Imilsis URDANETA LAFFITA, Meredis COLÓN SUÁREZ, Juan ESMÉRIDO BETANCOURT, Edgar PUENTE ZAPATA, Alfredo ALFONSO CASTILLO, Hilario SALAS MARTÍNEZ, Marta Zoe LEMUS RODRÍGUEZ 2011. Efecto protector de *Petiveria alliacea* L. (Anamú) sobre la inmunosupresión inducida por 5-fluoruracilo en ratones Balb/c. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(3): 256 – 264.

INTRODUCCIÓN

Muchas enfermedades crónicas como el cáncer, las enfermedades degenerativas y alérgicas, los trastornos nutricionales, el envejecimiento, el stress, la exposición a radiaciones, determinados contaminantes ambientales y hábitos tóxicos, entre otras condiciones, se asocian a trastornos de inmunodeficiencia, lo cual predispone a estos pacientes a las infecciones que con frecuencia constituyen la causa directa de muerte, siendo las neumonías las complicaciones infecciosas más frecuentes en estos casos (Abbas *et al.*, 2007; Beers *et al.*, 2006; De Souza y Bonorino, 2009).

La búsqueda de sustancias que modulen la respuesta inmune y que tengan un bajo costo de producción resulta de gran interés, ya que los trastornos inmunológicos son muy frecuentes en la población y los medicamentos que se encuentran actualmente en el mercado son altamente costosos. Varias formulaciones a base de plantas medicinales han sido utilizadas para mejorar el estado inmunológico de pacientes con cáncer y otras enfermedades así como la calidad de vida y la respuesta al tratamiento convencional. (Diwanay *et al.*, 2004; Osadebe y Omeje, 2009; Hernández *et al.*, 2010)

En Cuba se desarrollan importantes investigaciones para la obtención de productos de origen natural con actividad inmunomoduladora. En este sentido los productos derivados de plantas han tenido una prioridad atendiendo a la rica flora que posee nuestro país y entre las plantas que han recibido mayor atención ha sido la *Petiveria alliacea* L., más conocida en muchos países como anamú, en la cual ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* su efecto inmunoestimulante y antitumoral entre otras propiedades, lo cual ha permitido que se elaboren distintos tipos de preparados a base de esta planta para su uso médico (Lemus *et al.*, 2004).

El anamú (*Petiveria alliacea* Linn) es una planta de la familia Phytolaccaceae conocida con distintos nombres en diferentes países de Centro y Sur América, el Caribe y África. Se describe como una hierba perenne de tallo recto, poco ramificado de 0,5 a 1 m de alto, con hojas alternas de forma elíptica y de 6 a 19 cm de largo. Sus flores son pequeñas de color blanco y el fruto es una baya cuneiforme que presenta cuatro ganchos doblados hacia abajo (Illnait, 2007). Es una planta natural de la América tropical, específicamente de la selva amazónica, cultivada y naturalizada en regiones tropicales. En Cuba crece como hierba silvestre y muy abundante en toda la isla, pero preferiblemente en áreas fértiles del interior.

También puede ser encontrada en las demás Antillas, Florida, América tropical continental, norte de México y África (Roig, 1974, Lemus *et al.*, 2004).

Aunque tradicionalmente se le adjudican muchas propiedades, sus principales efectos son: analgésico-antipirético, antiinflamatorio, anestésico, antiespasmódico, antidispéptico, hipoglucemiante, inmunoestimulante, antitumoral y antimicrobiano (Germano *et al.*, 1993; Lad, 1997; Benevides *et al.*, 2001; Lemus *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009).

Estudios fitoquímicos realizados en las hojas y tallos de la planta han evidenciado la existencia de taninos, polifenoles y bencil-2-hidroxi-5-etil-trisulfuro, así como los oligoelementos: selenio (Se), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y magnesio (Mg), los cuales tienen diversas acciones sobre el sistema inmunológico (Lemus *et al.*, 2004; Illnait, 2007).

En la presente investigación, se realizó un estudio farmacológico preclínico de la *P. alliacea* donde se evaluó el efecto del polvo seco de las hojas de esta planta sobre la inmunosupresión inducida por el 5-fluoruracilo, una droga citostática de amplio uso en la clínica oncológica, con el objetivo de contribuir a la caracterización de la planta como agente inmunoestimulante. Con estos resultados se pueden obtener evidencias a favor del uso de formulaciones de *P. alliacea* como tratamiento adyuvante, para mejorar la calidad de vida y el pronóstico de enfermedades donde existan trastornos de inmunodeficiencia, como ocurre en los pacientes bajo tratamiento oncoespecífico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación taxonómica de la planta

Nombre científico: *Petiveria alliacea* L.

Familia: *Phytolaccaceae*; Género: *Petiveria*

Especie: *alliacea*

Autor: Linneo

Nombre común en Cuba: anamú.

Recolección, identificación y preparación de los productos a evaluar

Las plantas de anamú previamente identificadas se recolectaron en la zona montañosa de Guantánamo, según las normas establecidas en el Laboratorio Farmacéutico de Oriente, Santiago de Cuba, en el período de seca, seleccionando las hojas y tallos jóvenes de la planta. La identificación y clasificación de los materiales vegetales recolectados fue confirmada y ava-

lada por especialistas del Centro Oriental para Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) en Santiago de Cuba, atendiendo a las características macro y micromorfológicas. Varias muestras de la planta se conservan en el herbario de esta institución. El material recolectado se lavó con abundante agua potable corriente y se sometió a un presecado en estufa a temperatura menor de 35° C. Luego se secaron a la sombra logrando una humedad residual de 5-6%. La masa seca se molió hasta obtener un tamaño de partícula promedio de 125 µm. Para la aplicación del producto se disolvió la cantidad calculada para cada dosis de anamú por animal, en una solución de carboximetilcelulosa (Whatman) en agua destilada al 0.5%. Para el grupo control de inmunosupresión se utilizó el producto: Flurox[®] (5 fluoruracilo) de la firma Lemery (Mexico). Se utilizó el polvo seco como producto a evaluar, teniendo en cuenta que la forma de presentación empleada del medicamento es una tableta comprimida de este material vegetal (Lemus *et al.*, 2004).

Animales

Ratones hembras de la línea Balb/c de 5 a 6 semanas de edad y un peso promedio de 20 g, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), alojados en el vivario de TOXIMED, mantenidos en condiciones convencionales a una temperatura de 22 ± 2° C y humedad relativa de 63% con iluminación artificial y ciclos de 10 horas luz y 14 de oscuridad, en cajas Makrolón, con cama de virutas de madera de pino no oleosa, alimentados con pellets de ratonina (CENPALAB, Cuba) agua acidulada pH 2,2 - 2,5 y *ad libitum*.

Diseño experimental

El ensayo fue realizado tomando como base la metodología para un control positivo de inmunosupresión realizado por Aportela y colaboradores (Aportela *et al.*, 2001) con pequeñas modificaciones.

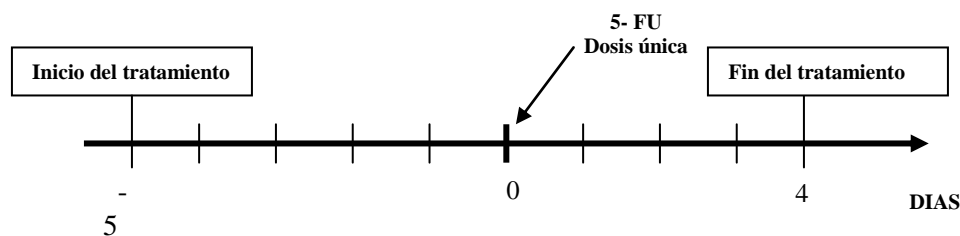
Se definieron 5 grupos de animales distribuidos de la siguiente forma:

Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales (n = 5 ratones Balb/c por grupo)

Grupos experimentales	Producto a aplicar	Vía de aplicación	Dosis/día
I Control negativo	S.S.F.	Oral	0.5 ml
II Control inmunosupresión (5-FU)	S.S.F	Oral	0.5 ml
	5-FU	IP	150 mg/kg
III Control del vehículo (CMC)	Carboximetil celulosa (vehículo)	Oral	0.5 ml
IV Tratamiento 1 (Anamú 400 + 5-FU)	Anamú	Oral	400 mg/kg
	5-FU	IP	150 mg/kg
IV Tratamiento 2 (Anamú 1200 + 5-FU)	Anamú	Oral	1200 mg/kg
	5-FU	IP	150 mg/kg

S.S.F: solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 %,
5-FU: 5 fluoruracilo, CMC: carboximetilcelulosa, IP: intraperitoneal

Ruta crítica del experimento



Se aplicaron a los grupos experimentales las correspondientes dosis de solución salina fisiológica (SSF), solución de Carboximetil celulosa y *P. alliacea*. Transcurridos 5 días de suministradas estas dosis, se le aplicó el 5-FU a los grupos correspondientes (tabla 1) y se continuó el tratamiento durante los restantes 3 días. Al cuarto día se realizó extracción de muestras de sangre por vía retroorbital y luego la eutanasia a cada animal por dislocación cervical seguido de la necropsia.

Necropsia y peso de órganos

Se realizó la necropsia observando los posibles cambios macroscópicos de todos los órganos con particular énfasis en el timo y el bazo de los animales en cada grupo. Se extrajo el timo y el bazo separando cuidadosamente el tejido conectivo y adiposo asociado en una placa Petri con 2 ml de solución salina fisiológica, luego se secó cada órgano con papel de filtro y se pesaron en balanza analítica.

Determinación de parámetros hematológicos

Con la sangre extraída se realizaron las siguientes determinaciones: Conteo total de leucocitos y Conteo absoluto de leucocitos, según los procedimientos normalizados de trabajo para estas técnicas. Para cuantificar la celularidad de la médula ósea en cámara de Neubauer, se cortaron las epífisis del fémur de la pata derecha y luego se realizó un lavado con 1 ml de solución salina fisiológica a través del canal medular en la diáfisis, por medio de una jeringuilla estéril, cosechándose la suspensión celular en tubos estériles.

ELISPOT (del inglés: Enzyme Linked Immunospot Assay)

Se obtuvo una suspensión celular del bazo en una placa de Petri conteniendo solución de Tampón Fosfato Salino (TFS) estéril. A cada bazo se le realizó una pequeña incisión en uno de sus extremos y se

realizó presión gentil utilizando una espátula fina. La suspensión se filtró a través de una gasa colocada dentro de una jeringuilla ambos previamente esterilizados y se realizaron 3 lavados con TFS alternando con centrifugaciones a 1000 RPM y a 4° C durante 10 min. Los hematíes fueron lisados con solución de cloruro de amonio 0.17 M después del primer lavado. Luego del tercer lavado se realizó conteo de la viabilidad celular con Tripan azul para garantizar una viabilidad superior al 90 %. En una placa comercial NUNC de 96 pozos, con fondo plano conteniendo papel de nitrocelulosa, se procedió al recubrimiento con 200 µl de anti IgG monoclonal de ratón (Sigma) a una concentración de 5 µg /ml. Se incubó en cámara húmeda por 2 horas a 37° C. Luego se decantó el exceso de líquido y se lavó tres veces con TFS. Se bloqueó con RPMI 1640 al 10% de Suero Fetal Bovino y se incubó 30 minutos a 37° C. Se extrajeron 90 µl de cada pocillo. Se añadió después 50 µl de la suspensión celular por pozo y se incubó 4 horas a 37° C y 5% de CO₂. Posteriormente se decantaron las células y se lavó tres veces con TFS y dos veces con TFS-Tween 20, eliminándose el exceso de líquido. Se añadió 100 µl por pozo de anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido 1: 1000 y se incubó en cámara húmeda a 4° C. Durante 16 horas, lavándose después dos veces con TFS-Tween y tres con TFS. Se añadió 100 µl por pozo de sustrato conteniendo Peróxido de hidrógeno (Fluka) y como cromógeno 3'3'Diaminobencidina (Sigma), esta última disuelta previamente en solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) (BDH), diluidos ambos en Tampón sustrato a pH 5 y se dejó reaccionar 25 minutos en la oscuridad. Se lavó la placa y se dejó sumergida en agua 3 horas. Los puntos revelados se cuantificaron en un microscopio estereoscópico a 40 x correspondiendo a # de Células Formadores de Anticuerpos IgG (CFA)/ millón de células.

Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética para la experimentación animal y fueron realizados cumpliendo los Procedimientos Normalizados de Trabajo para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio establecidas en TOXIMED.

Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar. Se realizó la comprobación de la homogeneidad de la varianza por la prueba de Bartlett, así como un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por un test *post hoc* de Dunnet para determinar las diferencias estadísticas entre el grupo control II tratado con 5-FU solamente y el resto de los grupos. La diferencia fue considerada

significativa cuando $P < 0.05$. Los datos fueron procesados por medio del programa estadístico SPSS 16.

RESULTADOS

En la tabla No 2 se observan las medias de los valores de leucocitos en los diferentes grupos experimentales. Se observó una diferencia significativa entre el grupo V tratado con la dosis más alta de anamú y el grupo II control de inmunosupresión para una $p < 0.05$, lo cual es una primera evidencia de un efecto inmunoprotector o inmunoestimulante del anamú. No se observó diferencia significativa con el grupo IV de menor dosis de *P. alliacea*. Como era de esperar, también hubo diferencias significativas entre el grupo II y el grupo I.

Tabla 2. Conteo global de leucocitos y absoluto de poblaciones leucocitarias en sangre periférica de los grupos experimentales de ratones Balb/C

* Representa los grupos que difieren significativamente del grupo II (5-FU) para una $P < 0.05$

Grupos	Conteo global de leucocitos x $10^9/L$	Conteo absoluto poblaciones leucocitarias x $10^9/L$		
		Linfocitos	Neutrófilos	Monocitos
I Control negativo	6.12 \pm 1.57 *	1.56 \pm 0.07*	3.64 \pm 0.08*	0.13 \pm 0.006*
II Control inmunosupresión (5-FU)	1.7 \pm 0.17	0.013 \pm 0.00003	0.020 \pm 0.0003	0.007 \pm 0.0007
III Control del vehículo (CMC)	1.7 \pm 0.26	0.027 \pm 0.0003	0.022 \pm 0.0002	0.006 \pm 0.0007
IV Tratamiento 1 (Anamú 400 + 5-FU)	1.82 \pm 0.61	0.039 \pm 0.00002*	0.022 \pm 0.0001	0.008 \pm 0.0001
V Tratamiento 2 (Anamú 1200 + 5-FU)	2.36 \pm 0.35*	0.055 \pm 0.0003 *	0.059 \pm 0.001*	0.008 \pm 0.0001

Al evaluar el comportamiento de cada una de las células por separado podemos observar que con las dosis más altas de anamú hubo una elevación de las cifras totales de linfocitos y neutrófilos en relación con el grupo control con 5-FU solamente. Los monocitos no evidenciaron variación significativa. Por otro lado,

la celularidad de la médula ósea también evidenció una mayor recuperación en el grupo tratado con 1200 mg/kg de anamú, en comparación con el resto de los grupos, en correspondencia con los resultados obtenidos en el conteo celular en sangre periférica (Tabla 3).

Tabla 3. Celularidad de la médula ósea de los grupos experimentales de ratones Balb/c.

Grupos Experimentales	Celularidad x 10 ⁵ /ml
I Control negativo	300 ± 10.7*
II Control inmunosupresión (5-FU)	32.8 ± 10.1
III Control del vehículo (CMC)	42.2 ± 43.9
IV Tratamiento 1 (Anamú 400 + 5-FU)	48.4 ± 25.6
IV Tratamiento 2 (Anamú 1200 + 5-FU)	149.8 ± 16.7 *

*Representa los grupos que difieren significativamente del grupo II (5-FU) para una P < 0.05

A pesar de las modificaciones encontradas en sangre periférica y en la médula ósea, cuando se estudió el peso relativo del timo y el bazo no pudieron detectarse diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control con 5-FU, aunque en el caso del timo, la media general fue superior en el grupo donde se aplicó la mayor dosis de la planta, las fluctuaciones individuales influyeron en que no fuera significativa la diferencia obtenida por el programa estadístico (Figura 1).

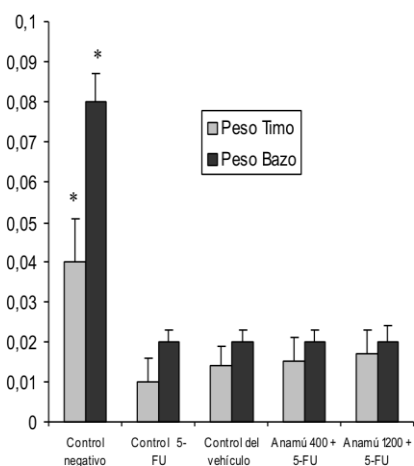


Figura 1. Comportamiento del peso relativo del timo y el bazo en los grupos experimentales de ratones Balb/C

* Representa los grupos que difieren significativamente del grupo II (5-FU) para una P < 0.05

En cambio las Células Formadoras de Anticuerpos IgG totales en bazo, evidenciaron un incremento significativo en el grupo tratado a la mayor dosis de la planta. El grupo con la menor dosis no mostró diferencias significativas aunque la media fue superior al grupo control II (Figura 2).

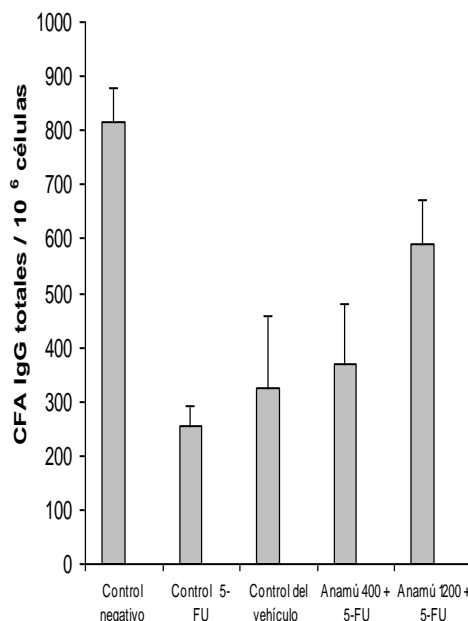


Figura. 2 Cuantificación de Células Formadoras de Anticuerpos IgG totales en bazo de ratones Balb/C por ELISPOT

Los grupos I (Control negativo) y V (Anamú 1200 +5-FU) difieren significativamente del grupo II (5-FU) para una P < 0.05.

DISCUSIÓN

El sistema inmune juega un papel esencial en la defensa contra agentes patógenos y tumores. La afectación de este sistema en diversas situaciones clínicas puede comprometer sensiblemente la evolución de una enfermedad determinada, como por ejemplo: el cáncer, por lo que el uso de inmunomoduladores constituye una vía para mejorar la evolución y la calidad de vida de los pacientes (Batista, 2003)

Existen numerosos estudios que han puesto en evidencia la capacidad inmunoestimulante de la *P. alliacea* o anamú. Entre estos es posible mencionar los realizados por Ledón sobre los efectos inmunoestimulantes de la planta (Ledón, 1990), y por Del Valle y colaboradores, quienes informaron el efecto *in vitro* de un extracto alcohólico del anamú sobre la proliferación de linfocitos humanos, lo cual se explicó por la propiedad co-sinérgica de la planta y la fitohemaglutinina purificada (PHA-P) a través de la estimulación de una subpoblación linfocitaria o del total de células mononucleares del cultivo (Del Valle et al., 1993).

Estos y otros estudios han sido realizados en animales o células supuestamente normales o moderadamente inmunodeprimidos, sin embargo, no se había realizado un estudio que pusiera de manifiesto el efecto de la planta en condiciones de una potente inmunosupresión inducida por una droga citostática. Con esta investigación nos trazamos como objetivo evaluar el efecto inmunoprotector sobre una dosis alta de 5-FU, una de las drogas citotóxicas más utilizadas en oncología y cuyo efecto inmunosupresor está muy bien caracterizado en animales de laboratorio (Schoorman et al 1994).

Teniendo en cuenta que el efecto inmunosupresor del 5-FU se logra a altas dosis, para poder observar el efecto farmacológico hubo que emplear también altas dosis de la planta, por esta razón se emplearon dos niveles de dosis elevadas una de 400 mg/kg y otra de 1200 mg/kg aplicados cada día por vía oral. Este constituye un sistema de estudio en condiciones extremas ya que normalmente las drogas citostáticas se emplean por debajo de su dosis farmacológica más efectiva, para evitar los efectos adversos (Hoekman, 1999), pero constituye una herramienta de gran valor para evidenciar el efecto farmacológico inmunoestimulante de la planta en estas condiciones.

Cuando analizamos los resultados podemos observar una correspondencia entre los resultados obtenidos en las poblaciones leucocitarias en sangre

periférica y la celularidad de la médula ósea. Los linfocitos y los neutrófilos muestran una mayor recuperación en el grupo tratado con la mayor dosis de la planta. En un estudio realizado por Quadros en 1999 se demostró que *P. alliacea* incrementa los niveles de actividad de factores estimulantes de colonias en suero, así como se incrementa el número de unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos en un modelo animal de infección por *Listeria monocitogenes* en ratones genéticamente susceptibles a la infección, los cuales recibieron aplicaciones diarias de extractos hidroalcohólicos de la planta durante 5 días antes de la infección (Quadros et al., 1999).

En adición, el incremento de las cifras de linfocitos también está en correspondencia con el reporte de que *P. alliacea* es capaz de estimular la proliferación linfocitarias en estudios realizados *in vitro* (De la Guardia, 1995). Otros estudios también han mostrado que la proliferación celular estimulada por esta planta, está asociada a la activación linfocítica con la liberación de citoquinas tanto del patrón Th1 como Th2, lo que produce un efecto activador en una amplia gama de poblaciones celulares como las células NK, los linfocitos T citotóxicos y otros importantes indicadores de respuesta inmune celular (Marini et al., 1993, Queiroz et al., 2000).

Esta actividad de *P. alliacea* sobre la médula ósea y poblaciones leucocitarias reviste una gran importancia, si tenemos en cuenta que los citostáticos afectan severamente este tejido, por ser un sitio de intensa proliferación celular (Opferman, 2007). De hecho, la aplasia medular, constituye una de las más graves complicaciones cuando se usan a altas dosis, o cuando el paciente que recibirá el tratamiento tiene afectado su sistema inmune antes del inicio del tratamiento como consecuencia de la enfermedad, el estrés u otros factores asociados, de ahí la importancia de utilizar agentes citoprotectores que minimicen estos efectos (Hoekman et al., 1999).

Cuando se realizó el estudio a nivel de los órganos timo y bazo se observó que no existen diferencias significativas entre los grupos tratados y el control 2 en relación con el peso de los órganos. Esta es una variable que no tiene una alta sensibilidad para la evaluación de productos con efectos ligeros o moderados sobre la inmunidad por lo que si tenemos en cuenta que se utilizó una dosis alta de 5-FU, es probable que el efecto de la planta no haya sido suficiente como para modificar significativamente el peso de estos órganos, aunque en el caso del timo sí

hubo una tendencia a la recuperación en el grupo de mayor dosis de la planta.

Sin embargo, resultó de gran interés el resultado obtenido sobre las CFA IgG totales en el bazo ya que fue posible comprobar que *P. alliacea* aplicada antes y después del 5-FU protege contra el bloqueo en la generación de CFA producida por esta droga. Si tenemos en cuenta que para la generación de CFA, es necesario la cooperación celular mediada por células T auxiliaadoras con la intervención de citoquinas como la IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 entre otras (Calame *et al.*, 2003), todos estos factores ya se ha discutido que son favorecidos por la acción de la planta. Este resultado sobre las CFA, también pone de manifiesto que a pesar de que el bazo no modificó significativamente su peso en los grupos tratados con la planta, sí a nivel celular hubo un beneficio funcional.

Como en toda planta medicinal, resulta difícil poder atribuir un efecto farmacológico a un solo componente en particular, ya que, como en este caso, se utilizan formulaciones que contienen mezclas complejas de elementos con actividad biológica (Alvi, 2000). A pesar de esto, se ha reportado que las propiedades inmunoestimulantes de la planta, se le atribuyen a los taninos, polifenoles y bencil-2-hidroxi-5-etil-trisulfuro, todos los cuales se encuentran presentes en las hojas jóvenes de la planta, parte activa utilizada en esta formulación (Lemus *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

Luego de estos resultados podemos concluir que el pretratamiento y tratamiento posterior con *P. alliacea* evidencia un nivel de protección sobre biomarcadores hematológicos e inmunológicos tanto a nivel central como periférico en ratones que recibieron una dosis tóxica de 5-FU. Esto es una evidencia que apoya el uso de formulaciones de esta planta en pacientes que reciben esta droga para la protección contra la inmunosupresión y pudiera ser un punto de partida de nuevas investigaciones para determinar si también es útil en pacientes inmunodeprimidos por otras causas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es un resultado de la colaboración entre la fábrica de tabletas del Laboratorio Farmacéutico Oriente y el Centro de Toxicología y Biomedicina perteneciente a la Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Los autores agradecen al Dr. Oviedo Orta de la Universidad de Surrey, Guildford, UK, por su contribución en la redacción del artículo.

REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman, AH, Pillai S. 2007. **Cellular and molecular immunology**: (6th Edition). Philadelphia: Elsevier Saunders USA.
- Alvi KA. 2000. Strategy for rapid identification of novel therapeutic leads from natural products In: Cutler SJ and Cutler HG **Biologically active natural products**. Pharmaceuticals. CRC Press LLC.
- Aportela GP, Batista DA, Esmérico B, Juan, Fong LO, Colón, M, Urdaneta, LI. 2001. Efecto de dosis única de Baytex sobre el sistema inmune en ratones B6D2F1. **An Toxicol** 1: 78 - 84.
- Batista DA. 2003 Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. **MEDISAN** 7: 75 - 88.
<http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_2_03/san11203.htm. [Consultado enero 15, 2011].
- Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL, Berkwitz M. 2006. **The Merck Manual of diagnosis & therapy**. 18th ed. Merck & Co., Inc USA.
- Benevides PJ. 2001 Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. **Phytochemistry** 57: 743 -747.
- Calame KL, Linn KI, Tunyaplin C. 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. **Ann Rev Immunol** 21: 205-230.
- De la Guardia O. 1995. Efecto del extracto de *Petiveria alliacea* Linn sobre la respuesta inmune. **Trabajo para optar por el título de Especialista de Primer Grado en Inmunología**. Instituto de Ciencia Básicas y Preclínicas Victoria de Girón. Ciudad Habana, Cuba.
- De Souza AP, Bonorino, C. 2009. Tumor immunosuppressive environment: Effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses. **Expert Rev Anticancer Ther** 9: 1317 - 1332.
- Del Valle L, Macías C, Cruz C, Rivero R, Nadal E. 1993. Efecto de un extracto de *Petiveria alliacea* sobre la proliferación de linfocitos humanos. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter** 9: 134 - 135.
- Diwanay S, Chitre D, Patwardhan B. 2004. Immuno-protection by botanical drugs in cancer chemotherapy. **J Ethnopharmacol** 90: 49 - 55.
- Germano DHP, Caldera TTO, Mazella AAG, Sertie JAA, Bacchi EM. 1993. Topical

- Anti-inflammatory activity and toxicity of *Petiveria alliacia*. **Fitoterapia** 64: 459 - 462.
- Hernandez ES, Batista AD, Portuondo D, Tamayo VO, Mora NG, Morris JQ, Martinez CM 2010. Immunorestorative in immunosuppressed Balb/c mice and cytotoxic activity of water extract from *Trichilia hirta* root. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 457 - 464.
- Hoekman K, Van der Vijgh, J, Vermorken, J. 1999. Clinical and preclinical modulation of chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer. **Drugs** 57: 133 - 155.
- Illnait JF. 2007. Principales referencias etnomédicas sobre el anamú (*Petiveria alliacia* Linn) y principios activos encontrados en la planta. Un acercamiento al tema. **Rev CENIC Cs Biol** 38: 27 - 30.
- Lad W. 1997. Immunological activity of *Petiveria alliacia*. **Phytother Res**; 11: 251 - 253.
- Kim S, Kubec R, Musah RA. 2006. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacia* L. **J Ethnopharmacol** 104: 188 - 192.
- Lemus RZ, García P ME, Batista DA, de la Guardia PO, Alfonso CA. 2004. La tableta de anamú: un medicamento herbario inmunoestimulante. **MEDISAN** 8: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_3_04/san10304.htm. [Consultado enero 15, 2011].
- Ledón Ramos E, Melo Navarro AC. 1990. **Patente Cubana 22360**. Forma farmacéutica estable con efecto sobre el sistema inmunológico. Procedimiento de obtención: Oficina Cubana de Propiedad Industrial. La Habana, Cuba.
- Marini S, Jovicevic L, Milanese C, Giardina B, Leone MG. 1993. Effects of *Petiveria alliacia* L. on cytokine production and natural killer cell activity. **Pharmacol Res** 27: 107 - 108.
- Opferman JT. 2007. Life and death during hematopoietic differentiation. **Curr Opin Immunol** 19: 497 - 502.
- Osadebe PO, Omeje EO. 2009. Comparative acute toxicities and immunomodulatory potentials of five Eastern Nigeria mistletoes. **J Ethnopharmacol** 126: 287 - 293.
- Queiroz ML, Quadros MR, Santos LM. 2000. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocitogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacia* extract. **Immunopharmacol Immunotoxicol** 22: 501 - 518.
- Quadros MR, Souza A, Queiroz ML. 1999. *Petiveria alliacia* L extract protects mice against *Listeria monocitogenes* infection-effects on bone marrow progenitor cell. **Immunopharmacol Immunotoxicol** 21: 109 - 124.
- Roig JT. 1974. **Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba**. La Habana, Cuba: Ciencia y Técnica. Instituto Cubano del Libro.
- Schuurman HJ, Kuper FC, Vos JG. 1994. Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. **Toxicology** 86, 187 - 212.
- Williams LA, Rosner H, Levy HG, Barton EN 2007. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacia* L (guinea hen weed, anamu). **West Ind Med J** 56: 17 - 21.
- Williams LA, Barton EN, Kraus W, Rösner H. 2009. Implications of dibenzyl trisulphide for disease treatment based on its mode of action. **West Ind Med J** 58: 407 - 409.