

## Efecto de los extractos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera williamsii* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas

### Resumen

*Se describen los efectos que los extractos hidroalcohólicos de Phenax rugosus (nombre vulgar: esparietaria), Tabebuia chrysantha (cañahuate), Althernantera williamsii (sanguinaria) y Solanum dolichosepalum (frutillo) tienen sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas.*

*El estudio se efectuó en ratas inmunizadas con una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 20%. Se realizaron recuentos leucocitarios (neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos) y medición de los títulos de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero para valorar la respuesta humoral. El tratamiento por 10 días, administrando los extractos por vía oral a dosis de 1 g/kg de peso, produjo cambios diversos -según la especie vegetal- en los valores del leucograma y en la producción de anticuerpos, en comparación con el grupo control.*

*Los extractos hidroalcohólicos de Phenax rugosus produjeron aumentos estadísticamente significativos en el recuento total de leucocitos y en los linfocitos, monocitos y eosinófilos ( $p < 0.05$ ); no se presentaron cambios significativos en la producción de anticuerpos en comparación con el grupo control. Hubo una disminución significativa ( $p < 0.03$ ) en los valores del hematocrito.*

*La Tabebuia chrysantha produjo un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.03$ ) en los anticuerpos, pero no hubo cambios significativos en los otros valores.*

- Jorge Enrique Perez\*,
- Gustavo Isaza\*,
- Juan Gabriel Bueno,
- María Cristina Arango\*,
- Blanca Lucía Hincapié\*\*,
- Angela María Nieto\*\*,
- Diana Patricia Londoño\*\*

\* Profesores Depto de Ciencias Básicas para la Salud, Universidad de Caldas.

\*\* Estudiantes de VII semestre del Programa de Enfermería, Universidad de Caldas

*La Althernantera williamsii produjo cambios estadísticamente significativos en la disminución del hematocrito ( $p < 0.03$ ), sin cambios significativos en los otros valores.*

*El Solanum dolichosepalum mostró un incremento significativo ( $p < 0.03$ ) en el recuento leucocitario, en los linfocitos y los monocitos, pero no hubo ningún cambio con significancia estadística en los otros parámetros.*

**Palabras clave:** Etnofarmacología, Phenax rugosus, Tabebuia chrysantha, Althernantera williamsii, Solanum dolichosepalum.

**Recibido para publicación:** 11-10-2004

**Aceptado para publicación:** 29-10-2004

## Introducción

La Inmunología, como la rama de las ciencias biológicas, investiga los mecanismos moleculares del sistema inmune y las formas de intervenirlo con fármacos para estimular o inhibir este intrincado sistema de defensa y a veces de auto agresión (1,2).

Parte importante de estas investigaciones se refieren a plantas medicinales usadas en forma tradicional y empírica por la población en el tratamiento de múltiples patologías infecciosas (3-5). Desde hace algunos años se han desarrollado productos naturales o sintéticos que modulan la respuesta inmune y que pueden ser usados en inmunodeficiencias o en enfermedades infecciosas crónicas, en la infección por VIH y en el cáncer. Entre estos fármacos se destacan la timosina, las citocinas (interleuquinas, interferones, factores estimulantes de colonias y factor de necrosis tumoral), levamizol, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), glicofosfopeptical, isoprinosina, talidomida y roquinimex (6).

Sin embargo algunos de ellos presentan serios inconvenientes, tales como sus altos costos de

producción -las citoquinas son producidas por ingeniería genética- y sus reacciones adversas, y por ello su uso es aún limitado en la terapéutica.

También se han investigado para fines inmunomoduladores plantas medicinales como *Aloe vera*, *Morinda citrifolia*, *Epimedium hunanense*, *Boerhaavia diffusa*, *Alsophila spinulosa*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifera*, *Woodfordia fruticosa*, *Echinacea*, *Physalis angulata*, *Dichrocephala bicolor*, *Urtica dioica*, *Curcuma longa*, *Rudbeckia bicolor*, *Larrea divaricata*, entre muchas otras (7-11); éstas han mostrado capacidad para estimular la respuesta inmune, tanto desde el punto de vista celular como humoral, lo que abre posibilidades de moléculas novedosas en la terapéutica y para el diseño de fármacos, una vez se completen las fases de investigación preclínica y muestren eficacia e inocuidad aceptable en sus ensayos clínicos (12-14).

En las zonas dedicadas al cultivo del café ha sido frecuente el uso empírico de plantas medicinales para tratar diversas enfermedades, entre ellas las de tipo infeccioso, y no hay duda del fuerte apoyo que ello ha significado en la atención primaria en salud (15,16); tales usos empíricos y populares son además estimulados por la OMS en particular en los países en vía de desarrollo (17,18). Estudios etnofarmacológicos previos (15) han evidenciado la gran demanda que tienen las plantas como fuente de medicamentos en una parte importante de la población rural y urbana, lo cual genera un intercambio de cultivo y comercialización que además de facilitar el tratamiento medicamentoso en la atención primaria en salud, facilita la diversificación de cultivos lícitos y el cambio de los ilícitos (19).

La selección de las cuatro especies de esta investigación se hizo con base en un estudio etnofarmacológico realizado por nuestro grupo en 154 personas de 32 veredas de la zona rural del municipio de Villamaría y en 18 herbolarios de la zona urbana de Manizales y Chinchiná (región centro-occidental de Colombia). Mediante encuesta se indagó sobre el uso de plantas "tonificantes", preventivas de enfermedades, curativas

de infecciones, para tratar los “fuegos de la boca”, para aumentar las “defensas del organismo” o “infecciones de la garganta o gripa”; se trató así de explorar posibles efectos inmunoestimulantes o antiinfecciosos. Dado que las 4 especies de la presente investigación estaban entre las usadas por la comunidad en las condiciones enumeradas en la encuesta y sin antecedentes bibliográficos para estas indicaciones, se seleccionaron a fin de evaluarlas in vitro como antibacterianas, antimicóticas y posiblemente inmunoestimulantes (15,20). La presente investigación se diseñó con el fin de evaluar experimentalmente algunos de los posibles efectos inmunoestimulantes de los extractos hidroalcohólicos de cuatro especies vegetales, con base en los cambios en el leucograma y la respuesta en la producción de anticuerpos en ratas.

### **Materiales y métodos**

**Material vegetal:** hojas de *Phenax rugosus* (esparietaria), *Tabebuia chrysantha* (cañahuate), *Althernantera williamsii* (sanguinaria) y *Solanum dolichosepalum* (frutillo) se recolectaron en el municipio de Villamaría, departamento de Caldas, a 2.000 msnm, temperatura promedio de 20°C. Un ejemplar de cada una se conserva en el Herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas, con los números 010572, 1525, 1256 y 8755 respectivamente. Las hojas se secaron en estufa a 40°C, se pulverizaron y se sometieron a un proceso de extracción con una mezcla de alcohol y agua destilada (50:50) durante 48 horas. Luego, cada mezcla se concentró en rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 40°C.

**Animales de experimentación:** los efectos sobre el leucograma y la respuesta inmune humoral se midieron en ratas Wistar machos adultos con peso entre 250-350 g, provenientes del bioterio de la U. de Caldas. Se reunieron en 5 grupos de 6 animales cada uno; cuatro grupos recibieron cada uno un extracto para evaluar hematocrito, la producción de

anticuerpos y los efectos en el leucograma; un grupo adicional se destinó a grupo control. En consecuencia, cada uno de los extractos vegetales se evaluó independientemente y se compararon los resultados con el grupo control. Todos los animales tuvieron una luminosidad diaria de 12 horas, temperatura promedio de 18°C, y recibieron *ad libitum* agua y dieta de concentrado habitual para ratas (Purina®). El manejo de los animales, supervisado por el director del bioterio, se hizo basándose siempre en el código de ética sobre experimentación animal y en los principios éticos internacionales que guían la investigación biomédica con animales (21).

**Protocolo de experimentación:** con el fin de inducir la producción de anticuerpos, los días primero, tercero y quinto del ensayo se aplicó a todos los animales, por vía intraperitoneal, una suspensión de eritrocitos de carnero al 20%. El sexto día se extrajo la primera muestra de sangre a todos los animales (1 ml con anticoagulante EDTA) para evaluar la respuesta hematopoyética: recuento total de leucocitos, diferencial de leucocitos y hematocrito; otro tanto se recolectó sin anticoagulante, se centrifugó y se usó el suero para evaluar la respuesta humoral frente al antígeno inyectado.

A partir del séptimo día se empezaron a administrar los extractos de las plantas (1g/kg de peso) mediante sonda orogástrica, y al grupo control se le administró agua destilada (2ml/kg) durante 10 días. El día 17 se obtuvo nuevamente una muestra de sangre de todos los animales y se realizaron los mismos análisis.

Con las muestras de suero se realizó la prueba de microhemaglutinación directa según lo descrito en publicaciones previas (12,13,22), que básicamente consiste en que los eritrocitos de carnero, previamente lavados y procesados hasta una concentración del 5%, se ponen en contacto en una placa de microtitulación con diferentes diluciones del suero de rata, se incuban en baño maría a 37°C, se dejan sedimentar los glóbulos rojos y se observa la presencia de aglutinación microscópica, utilizando un microscopio invertido. Se establece como título final de anticuerpos aquella dilución en la que se presenta al menos el 50% de aglutinación.

El grupo control que se describe en las tablas como basal es el grupo que habiendo recibido los eritrocitos de carnero, se le toma muestras de sangre

el día sexto; a partir de allí recibe hasta el día 17 agua destilada y aparece en las tablas referido como control pos-tratamiento. Igualmente el grupo de tratamiento se describe como tratamiento basal hasta el día sexto y a partir de allí, cuando empieza a recibir el extracto vegetal, se describe en las tablas como pos-tratamiento.

El manejo estadístico se realizó con datos tabulados y procesados en el software SPSS para Windows. Las diferencias intraindividuales (pre-tratamiento vs pos-tratamiento) se compararon mediante estadística no paramétrica (test de Wilcoxon). Todos los test son de dos colas y se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$ .

## Resultados

En la tabla 1 se muestran los efectos de los extractos hidroalcohólicos de *Phenax rugosus* sobre el hematocrito, el leucograma y la respuesta en la producción de anticuerpos en ratas. Se observa un incremento estadísticamente significativo en los valores de leucocitos y en los de linfocitos, monocitos y eosinófilos ( $p < 0.046$ ,  $0.046$ ,  $0.03$  y  $0.03$ , respectivamente); no se presentaron cambios

**Tabla 1.** Efectos del extracto hidroalcohólico de *Phenax rugosus* sobre el hematocrito, el leucograma y en la producción de anticuerpos en ratas.

	CONTROLES (n=6)			Phenax r. (n=6)		
	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P
Hematocrito	53.5±1.9	53±3.1	0.6	60.8±3.8	47.8±1.5	0.03
Total leucocitos	14850±2040	16850±4854	0.92	15550±2790	25083±8537	0.046
Linfocitos	11968±1314	13857±4322	0.46	12959±2261	19606±5628	0.046
Neutrófilos	2408±738	1817±798	0.25	1979±1173	3442±1821	0.08
Monocitos	497±174	772±158	0.08	484±267	1089±635	0.03
Eosinófilos	278±158	405±180	0.12	418±161	737±271	0.03
Anticuerpos	3.33±1	4±1.3	0.16	2.33±0.8	3.33±2.4	0.32

significativos en la producción de anticuerpos en comparación con el grupo control basal. Hubo una disminución significativa ( $p < 0.03$ ) en los valores del hematocrito.

**Tabla 2.** Efectos del extracto hidroalcohólico de *Tabebuia chrysantha* sobre el hematocrito, el leucograma y en la producción de anticuerpos en ratas.

	CONTROLES (n=6)			Tabebuia ch (n=6)		
	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P
Hematocrito	53.5±1.9	53±3.1	0.6	54.5±4.9	51.3±1.8	0.21
Total leucocitos	14850±2040	16850±4854	0.92	18633±5680	20133±4973	0.92
Linfocitos	11968±1314	13857±4322	0.46	15144±4423	14725±4272	0.6
Neutrófilos	2408±738	1817±798	0.25	2570±819	3060±1008	0.35
Monocitos	497±174	772±158	0.08	497±396	1356±596	0.08
Eosinófilos	278±158	405±180	0.12	423±484	962±243	0.88
Anticuerpos	3.33±1	4±1.3	0.16	2.67±1	32±47.2	0.03

La *Tabebuia chrysantha* (tabla 2) produjo un incremento estadísticamente significativo en los anticuerpos ( $p < 0.03$ ).

No hubo cambios significativos en los otros parámetros evaluados.

En la tabla 3 se muestran los efectos del extracto de *Althernantera willamsii* sobre el hematocrito, leucograma y la producción de anticuerpos en ratas; produjo cambios estadísticamente significativos en

la disminución del hematocrito ( $p < 0.03$ ). No hubo cambios significativos en los otros valores.

**Tabla 3.** Efectos del extracto hidroalcohólico de *Althernantera willamsii* sobre el hematocrito, el leucograma y en la producción de anticuerpos en ratas.

	CONTROLES (n=6)			<i>Althernantera w.</i> (n=8)		
	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P
Hematocrito	53.5±1.9	53±3.1	0.6	55.2±1.5	50.7±3.1	0.03
Total leucocitos	14850±2040	16850±4954	0.92	16783±3022	23800±5888	0.08
Linfocitos	11868±1314	13857±4322	0.46	14156±3096	18853±4885	0.12
Neutrófilos	2408±738	1817±798	0.25	2011±845	2536±2908	0.75
Monocitos	497±174	772±158	0.08	330±241	912±549	0.12
Eosinófilos	278±150	405±180	0.12	288±162	680±537	0.25
Anticuerpos	3.33±1	4±1.3	0.16	2.7±1	3±1.1	0.48

En la tabla 4 se muestran los efectos de los extractos de *Solanum dolichosepalum* sobre los mismos parámetros; produjo un incremento significativo ( $p < 0.03$ ) en el recuento leucocitario, en los linfocitos y los monocitos, pero no hubo ningún cambio con significancia

estadística en los otros valores.

Los valores del grupo control basal no tuvieron cambios estadísticamente significativos cuando se comparan con los valores del grupo control pos-tratamiento.

**Tabla 4.** Efectos del extracto hidroalcohólico de *Solanum dolichosepalum* sobre el hematocrito, el leucograma y en la producción de anticuerpos en ratas.

	CONTROLES (n=6)			<i>Solanum d.</i> (n=8)		
	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P	Basal (μ±DE)	pos-tratamiento (μ±DE)	P
Hematocrito	53.5±1.9	53±3.1	0.6	47.7±7.6	43.5±6.8	0.25
Total leucocitos	14850±2040	16850±4954	0.92	18167±3785	25300±4500	0.03
Linfocitos	11868±1314	13857±4322	0.46	14154±2300	19786±3673	0.03
Neutrófilos	2408±738	1817±798	0.25	3058±1497	3581±1960	0.92
Monocitos	497±174	772±158	0.08	367±188	1321±476	0.03
Eosinófilos	278±150	405±180	0.12	532±236	622±411	0.6
Anticuerpos	3.33±1	4±1.3	0.16	3±1.1	3.7±2.34	0.48

### Discusión

La creciente aparición de infecciones reemergentes, las mutaciones de agentes patógenos, la resistencia presentada por los microorganismos frente a los agentes quimioterápicos, la epidemia del VIH y las enfermedades neoplásicas han dirigido la atención

de los diferentes investigadores hacia el desarrollo de fármacos con actividad inmunoestimulante, con el fin de buscar una forma adicional de defender más eficazmente el organismo contra las infecciones (6,22).

Múltiples estudios han evaluado sustancias sintéticas y de origen natural, buscando efectos inmunomoduladores. Los hallazgos de inmunoestimulantes no han sido tan exitosos como los de inmunosupresores, pues la ciclosporina, el sirolimus, el tacrolimus y otros más, son fármacos ampliamente usados en transplantes de órganos y otras patologías que requieren suprimir la respuesta inmune (23,24).

La modulación de esta respuesta se ha visto enriquecida con investigaciones *in vivo* como las más recientes con la talidomida, fármaco teratogénico retirado en la década de los 60's, pero que demostró posteriormente un efecto inmunomodulador importante, como es el de inhibir el factor de necrosis tumoral alfa, lo que lo hace promisorio como coadyuvante en el tratamiento del cáncer, artritis reumatoide, tuberculosis, eritema nodoso leproso y VIH; también inhibe la proliferación linfocítica en respuesta a estímulos alogénicos y mitogénicos y, por tanto, es promisorio como coadyuvante en transplantes de órganos; finalmente, es inhibidor de la angiogenesis, lo que lo haría útil en la neuropatía diabética, en la degeneración de la mácula, el cáncer y muchas otras patologías (25-27). También se ha investigado la actividad inmunomoduladora de los ácidos grasos n-3, capaces de modular la síntesis de lípidos precursores de citoquinas, de la activación de leucocitos y de la activación endotelial; su efecto modulador de la respuesta inmune ha permitido que se empleen ampliamente en cirugías y el efecto beneficioso sobre los pacientes se ha reconocido (28-30).

Muchos esquemas terapéuticos para el tratamiento del cáncer y la hepatitis -entre otras patologías- agregan un inmunoestimulante a los antineoplásicos o antivirales con el fin de mejorar la respuesta del paciente (27).

Estos son algunos de los ejemplos que ilustran la importancia de investigar plantas que por evidencias empíricas puedan tener un efecto sobre el sistema inmune. Por los antecedentes de principios activos

inmunoestimulantes en varias especies vegetales y de los resultados de un amplio uso de plantas en las comunidades, en la búsqueda de efectos farmacológicos y antiinfecciosos (15,31), es muy probable que se puedan encontrar principios activos nuevos en plantas de nuestra región y que posean tal actividad farmacológica.

Existe una tradición en nuestra cultura que consiste en el uso de plantas medicinales con fines curativos y paliativos de muchas enfermedades; dicha tradición ya no hace parte exclusiva de las generaciones anteriores, pues muchas plantas que fueron usadas de forma empírica cuentan hoy con un sustento científico y se usan y comercializan ampliamente (32-34). En nuestras universidades y en algunos institutos de investigación se han evaluado diversas plantas buscando efectos antibacterianos, antimicóticos y, unas pocas veces, antivirales, pero casi nada se ha hecho sobre el efecto de nuestra flora en relación con su actividad biológica en el sistema inmune. Por ello la presente investigación se enfocó a explorar mediante ensayos preliminares los efectos de los extractos en el hematocrito, recuento leucocitario y la producción de anticuerpos, de tal manera que si se observan cambios en ellos, sirvan como guía para investigar con mayor profundidad otros efectos en el sistema inmune.

El extracto hidroalcohólico de la planta *Phenax rugosus* mostró un aumento del recuento leucocitario, a expensas de linfocitos, monocitos y eosinófilos que también se incrementaron; es claro que este efecto aislado no puede tomarse como una respuesta inmunoestimulante; sin embargo, sería importante explorar si esta acción podría deberse a componentes similares al lipopolisacárido, a alquilamidas o polialquenos que se han encontrado con frecuencia en plantas medicinales antiinfecciosas y que activan la inflamación y actúan como un factor estimulante de colonias. De esta forma ejercerían una acción similar a la de las citoquinas hematopoyéticas y aumentarían en sangre periférica las tres líneas celulares antes mencionadas.

Otros aspectos que merecen explorarse en trabajos experimentales posteriores serían los efectos en otros parámetros de la respuesta inmune: ya sea porque la planta tiene acción quimiotáctica, porque estimula la producción de factores quimiotácticos, o porque incrementa la producción de diferentes citoquinas.

También sería recomendable explorar en estudios posteriores con este extracto los efectos en la hipersensibilidad inmediata, que permitan valorar de manera indirecta los niveles de Ig E y la acción de los mastocitos en la respuesta a diferentes alérgenos. Igualmente, se podría explorar la acción frente a las infecciones parasitarias por helmintos (1,2).

La *Althernantera willamsii* no presentó en nuestras condiciones experimentales efectos significativos en la producción de anticuerpos ni en la modificación del recuento leucocitario. Sin embargo, su uso popular empírico parece indicar que podría tener efectos antimicrobianos -lo cual está siendo evaluado por nuestro grupo- o bien en otros aspectos del sistema inmune, no evaluados en este trabajo. Por tanto, no es descartable que tenga efectos sobre el sistema inmune, razón por la cual se requeriría, para ésta y las otras especies estudiadas en la presente investigación, estudios en la respuesta inmune más complejos y sofisticados que los empleados en esta investigación, los cuales deben considerarse como estudios exploratorios preliminares.

La *Phenax rugosus* y la *Althernantera williamsii* requieren estudios adicionales para explicar las causas de la disminución del hematocrito que produjeron sus extractos; sin embargo, una disminución en este parámetro no indica de manera absoluta un efecto tóxico ya que al ser el hematocrito un valor relativo, está afectado por otros factores como el grado de hemoconcentración de los animales y la concentración de hemoglobina; por esta razón, para estudiar más ampliamente este efecto se deben medir la concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos.

*Solanum dolichosepalum* produjo una elevación importante del recuento leucocitario, a expensas de linfocitos y monocitos; las razones de este incremento las desconocemos, pero hipotéticamente serían similares a las expresadas arriba para la *Phenax rugosus*; si bien no produjo ningún efecto en la producción de anticuerpos, su uso empírico es bastante difundido como antiinfeccioso, lo que podría deberse a un efecto antibacteriano demostrado por nuestra línea de investigación en estudios complementarios antibacterianos (35).

El extracto hidroalcohólico de la planta *Tabebuia chrysantha* mostró un importante incremento en los anticuerpos, lo cual nos hace pensar que es una especie vegetal a la cual se le deberían hacer estudios más profundos sobre su efecto en el sistema inmune, pues tal como se expresó para *Phenax rugosus*, estos datos aislados sólo se pueden tomar únicamente como probables inmunoestimulantes. Pero para la *Tabebuia chrysantha* la investigación experimental podría dirigirse a detectar IgM, IgG y explorar la acción sobre linfocitos B, como cofactor estimulante en la producción de anticuerpos.

En nuestras condiciones experimentales, tres de las especies vegetales estudiadas no modificaron significativamente la respuesta de anticuerpos, aun cuando sí produjeron efecto en algunas de las células que tienen que ver con los mecanismos efectores de la respuesta inmune. Dado el amplio uso de estas plantas en forma empírica para tratar

diversos procesos infecciosos, no son descartables los efectos en el sistema inmune en la producción de interleuquinas, interferones, factor de necrosis tumoral, etc- que no son detectables en nuestro modelo experimental, pues para ellos se necesitan técnicas mucho más sofisticadas. Por otra parte creemos que son necesarios estudios preliminares como el presente, dada la gran importancia de los inmunoestimulantes y la carencia de especies vegetales con tales efectos en el Listado de Recursos Naturales Empíricos aceptados oficialmente por el INVIMA-Ministerio de la Protección Social (36,37),

pues dado el caso de que existieran, sería de gran valor en la atención primaria en salud y como recurso natural exportable.

### Agradecimientos

Al Dr. Carlos Alberto Isaza M, de la Universidad Tecnológica de Pereira, por su asesoría en los análisis estadísticos. A la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas, por el apoyo para estas investigaciones.

### Referencias bibliográficas.

1. Abbas AK, Lichtum AH, Pober JS. Inmunidad innata. En: Inmunología celular y molecular. 4ª edición. Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid 2002. pp 280-302.
2. Weir DM, Stewart J. Inmunidad innata. En: Inmunología. 3ª edición. Manual Moderno. México 1999. pp 15-34.
3. Aristizabal AG, Posada HR. Descripción de malezas en plantaciones de café. Cali V. Carvajal S. A., 1987. 350 pp.
4. Fonnegra R, Jiménez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia, 1999. 273 pp.
5. García Barriga H. Flora medicinal de Colombia. Bogotá. Imprenta Nacional. Tomos I, II y III. 1974
6. Isaza CA, Isaza G, Fuentes J, Marulanda T. Fundamentos de farmacología en terapéutica. 4ª edición. Editorial Postergraph, Pereira R. 2002. pp 478-495
7. Anesini C, Genaro A, Cremaschi G, Sterin et al. Immunomodulatory activity of Larrea divaricata. *Fitoterapia* 1996; 67(4): 329-333.
8. Lie CI, Yuh CK, Cheng JC. Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*. *J Nat Prod* 1999; 62(3): 405-408.
9. Wong CK, Leung KN, Fung KP, Coi YM. Immunomodulatory and anti-tumor polysaccharides from medicinal plants. *J Int Med Res* 1994; 22(6): 299-312.
10. Ziauddin M, Phanasalkar N, Patki P, Diwanay S, Patwardhan. Studies on the Immunomodulatory effects of Ashwaganda. *J Ethnopharmacol* 1996; 50: 69-76.
11. Mediratta PK, Sharma KK, Singhs L. Evaluation of immunomodulatory potencial of *Ocimum Sanctum* seed oil and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol* 2002; 80:15-20.
12. Fulzele SV, Bhurchandi PM, Kanoje VM et al. Immunostimulant activity of *Ashtamangal Ghrita* in rats. *Indian J Pharmacol* 2002; 34:194-197.
13. Subramoniam A, Evans DA, Rajasekharan S, Pushpangadan P. Effect of trichopus zeylanicus gaertn (active fraction) on phagocytosis by peritoneal macrophages and humoral immune response in mice. *Indian J Pharmacology* 2000; 32: 221-225.
14. Gordon M, Bihari B, Goosby E, et al. A placebo controlled trial of the immune modulator, lentinan (1-3 beta D-Glucano), in HIV positive patients: a phase I/II trial. *J Med* 1998; 29(5-6):305-30.
15. Bueno JG, Isaza G, Gutiérrez F, Carmona WD, Pérez JE. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente por posibles efectos inmuno estimulantes. *Rev Méd Risaralda* 2001; 7(1): 7-11.
16. Taylor VE. Tyler's Honest Herbal. The Haworth Herbal Press, 4th ed. 2000. pp 1-8.
17. Zang X. Traditional Medicine WHO. *Hardard Medicus* 1996; 39(3):103.
18. Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello-SECAB-(ed). 1998. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. Tomos I a XII. Editorial Guadalupe Ltda., Bogotá, Colombia.
19. Díaz, JA (ed). Informe Técnico. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Instituto Alexander Von Humboldt- El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá D.C., Colombia. 2003. 111 pp.
20. Isaza G, Bueno JG, Safón RF, Peñalosa CA et al. Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente en cuatro ciudades del centro-occidente colombiano. *MEDOMAI* 2(1):2001. 8-15.
21. Mrad Afife, Rosenkranz A. Guía para el uso de animales de laboratorio. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.E.1990.



22. CYTED (ed). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. 1995. p 105.
23. American Society of Health-System Pharmacists. American Hospital Formulary Services (AHFS). Drug Information 2003. pp 3580-3594
24. Timmermann W, Erhard J, Lange R et al. A randomized trial comparing the efficacy and safety of tacrolimus with microemulsified cyclosporine after liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2002, 34:1516-1518.
25. Singhal S, Mewhta J. Thalidomide in Cancer. *Biodrugs* 2001; 15(3):163-172.
26. Lee CH-K, Barlogie B, Munshi N et al. DTPACE: An effective, novel combination chemotherapy with Thalidomide for previously treated patients with Myeloma. *J Clin Oncol* 2003; 21:2732-2739.
27. Quilitz R. Thalidomide in oncology: The peril and the promise. <http://www.moffitt.usf.edu/pubs/ccj/v6n5/dept3.htm>. 24/09/2003.
28. Weiss G, Meyer F, Matthies M et al. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Brith J Nutr* 2002; 87(suppl.1): 589-594.
29. Pscheild E. Effects of n-3 fatty acids on gut integrity function. *Clin Nutr* 2002; 21 Suplement 2:47-51.
30. Tzianabos AO, Gibson FC, Cisneros RL, Kasper DL. Protection against experimental intraabdominal sepsis by two polysaccharide immunomodulators. *J Infect Dis* 1998;178(1):200-6
31. Zuluaga G. Panorama actual de las medicinas tradicionales. En: Seminario Internacional de Etnomedicina. Amazon conservation Team, Instituto de Etnobiología, Universidad El Bosque (ed). Bogotá, Colombia. 2002. pp 13-27.
32. Mukherjee PK. Quality Control of Herbal Drugs. Business Horizons (ed). New Delhi. 2002. 800 pp
33. Medical Economics Company (ed). 2003. PDR for Herbal Medicines. Montvale, New Jersey, 847 pp.
34. Blumenthal M, (ed). The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanic Council, Boston, USA, 1998. 684 pp.
35. Arango MC, Bueno JG, Isaza G. Efectos antibacterianos y antimicóticos de *Tabebuia chrysantha*, *Phenax rugosus*, *Solanum dolichocephalum*, *Alternanthera williamsii* y *Baccharis trinervis*- Manizales, abril 4-2004, informe final a Vicerrectoría de Investigaciones-Universidad de Caldas. Sin publicar
36. INVIMA. MINISTERIO DE SALUD (ed): Manual de Normas Farmacológicas de la República de Colombia. 4ª ed, 2001. 280 pp
37. INVIMA. MINISTERIO DE SALUD (ed): Comisión Nacional de Medicamentos. Comisión Revisora. [www.invima.gov.co](http://www.invima.gov.co). Actas y agenda 01 a 015 de 2002, 01-16 de 2003 y 01 a 010 de 2004.

