

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Análisis *in vitro* de la actividad inmunomoduladora de extractos
acuosos de plantas sonorenses



TESIS

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Paola Carolina Curiel Gutiérrez

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



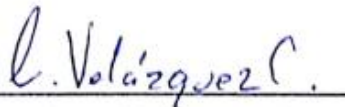
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Paola Carolina Curiel Gutiérrez, lo ha encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en ciencias de la Salud.



Dra. Adriana Garibay Escobar
Director Académico



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Vocal



Dra. Verónica Mata Haro
Suplente

Agradecemos el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: “Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales (PDCPN)” clave 2013-01 215469.

DEDICATORIA

A mi familia...

Mi pilar y motivo para seguir adelante.

Mamá y Papá, les dedico con todo mi corazón este trabajo de tesis, que sin duda no se habría llevado a cabo sin todo su apoyo.

Las enseñanzas que me han dado a lo largo de mi vida me han ayudado a formarme como persona y profesional. Los valores que han depositado en mi persona son invaluable, gracias por cada uno de ellos, el respeto, honestidad, gusto por el trabajo, responsabilidad, tolerancia y, por supuesto lo que considero más importante, el amor. Gracias por ser un ejemplo de vida y lealtad para mí, la mejor herencia que pudieron brindarme.

A ustedes les debo mi primer acercamiento a las ciencias, todos esos días en los que plantaron en mi la curiosidad por seguir aprendiendo y todas esas charlas motivadoras que me fueron acercando más a esta área, que sin duda es una de las mejores decisiones que he tomado en mi vida.

Dedico esta tesis a todos los que, en algún momento de su vida se han sentido flaquear o que no pueden más. La fuerza del hombre proviene de su espíritu, sigan adelante no desistan ante la adversidad, ninguna batalla está perdida hasta que dejas de intentarlo. Siempre hay razones para ir tras tus metas.

“PUES DIOS NO NOS HA DADO UN ESPÍRITU DE TEMOR Y TIMIDEZ,
SINO DE PODER, AMOR Y AUTODISCIPLINA”

Timoteo 1:7

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme desarrollar este proyecto, por darme salud y fuerza para seguir adelante.

Un agradecimiento especial a la Universidad de Sonora y al posgrado en Ciencias de la Salud, por abrirme las puertas de su institución a lo largo de mi formación. Por brindarme todas las herramientas para ejercer como un profesional y ahora maestro en ciencias distinguido, no solo académicamente, también una persona empática que contribuirá a dejar un granito de arena a la sociedad.

A mis profesores, los cuales transmitieron su amplio conocimiento y amor al área.

A la Dra. Adriana Garibay Escobar, por la oportunidad de desarrollar este trabajo y por transmitirme todo el conocimiento necesario para llevarlo a cabo.

A mi comité sinodal, el Dr. Carlos Arturo Velázquez, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda y la Dra. Verónica Mata Haro, por su disponibilidad, sus recomendaciones, sugerencias y conocimientos para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, agradezco a cada uno de ellos por dejar una huella en mi persona, por sus grandes enseñanzas y trabajo en equipo.

Al TB team, gracias por sus consejos, su apoyo y el tiempo que brindaron en mí persona.

A mis amigos, que son la familia que tuve la oportunidad de escoger: Alejandra Magaña, Carmen Reyna, Juan Martínez, Gustavo Hernández, Héctor Valdez, Dacia Barrón, Cinthia Hernández, Gaby Villa, Denisse García, Estrella Marrón, Gaby Valenzuela, Alan Rosales, Pedro Balderrama, Alejandro Urrea, Juan Alemán, Salvador Meneses, Luisa Rascón, Jaqueline Cepeda, Francisco González, gracias por brindarme su legítima y honesta amistad. Por el infinito

apoyo e impulso a ser mejor día a día, agradezco sus palabras cada una de ellas se quedarán plasmadas en mis memorias y corazón.

A mis compañeros de generación de maestría, gracias por todos los momentos, las horas de estudio y el conocimiento compartido.

Finalmente agradezco a todas las personas involucradas en este proyecto que por una u otra cosa olvidé mencionar, este trabajo no podría haberse desarrollado sin el apoyo y experiencia de cada una de ellas. ¡Infinitas gracias!

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
OBJETIVOS	XI
General.....	XI
Particular.....	XI
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
Sistema inmunitario.....	4
Linfocito T.....	5
Actividad inmunomoduladora de productos naturales.....	8
Actividad inmunomoduladora de plantas sonorenses.....	10
<i>Acacia cochliacantha</i>	11
<i>Euphorbia albormaginata</i>	11
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	12
<i>Sambucus nigra</i> L.....	12
<i>Schinus molle</i> L.....	13
<i>Rhynchosia precatória</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Preparación del extracto acuoso.....	15
Reactivos.....	15
Aislamiento, cultivo y activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's).....	15
Ensayo de viabilidad en PBMC's.....	16
Análisis de marcador de activación temprana CD69.....	17
Ensayo de producción de IFN- γ	17

Reacción de Griess para la evaluación de nitritos.....	18
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS	19
Ensayo de viabilidad celular de extractos acuosos de plantas sonorenses.....	19
Ensayo activación celular por medio de la expresión de la molécula de activación temprana CD69.....	19
Modulación de interferón-gamma (IFN- γ) y óxido nítrico (NO) producido por PBMC's expuestas a extractos acuosos sonorenses.....	23
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
REFERENCIAS	32
ANEXOS	41

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
I	Viabilidad (%) de las PBMC's tratadas por 44h con el extracto acuoso de: <i>Sambucus nigra</i> L, <i>Schinus molle</i> L y <i>Rhynchosia precatória</i> por el ensayo óxido-reducción con resazurina.	20

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (T _H 1/T _H 2).	7
2	Expresión del marcador CD69 en PBMC's tratadas por 24 h con el extracto acuoso de: A) <i>Sambucus nigra</i> L, B) <i>Schinus molle</i> L y C) <i>Rynchosia precatoria</i> .	22
3	Producción de IFN- γ en PBMC's tratadas por 24, 48 y 72 h con el extracto acuoso de: A) <i>Sambucus nigra</i> L, B) <i>Schinus molle</i> L y C) <i>Rynchosia precatoria</i> .	24
4	Producción de NO en PBMC's tratadas por 24, 48 y 72 h con el extracto acuoso de: A) <i>Sambucus nigra</i> L, B) <i>Schinus molle</i> L y C) <i>Rynchosia precatoria</i> .	26

OBJETIVOS

General

Analizar la actividad inmunomoduladora de extractos acuosos de plantas Sonorenses en células mononucleares de sangre periférica de individuos saludables.

Particulares

1. Evaluar la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) expuestas a los extractos acuosos de las plantas seleccionadas.
2. Determinar la modulación de la respuesta inmunitaria por los extractos acuosos de las plantas seleccionadas en PBMC's por medio de la expresión de la molécula CD69, IFN- γ y NO.

RESUMEN

La inmunomodulación implica cualquier cambio de la respuesta inmunitaria que involucra la expresión, amplificación o inhibición de alguna fase de ella. Hoy en día el uso de productos naturales es una herramienta importante para tratar enfermedades, rescatando el uso tradicional de diferentes etnias alrededor de México. La etnia Mayo en Sonora, consume infusiones acuosas de plantas *Acacia cochliacantha*, *Euphorbia albomarginata*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Rhynchosia precatória*, *Sambucus nigra*, *Schinus molle* L para el tratamiento de enfermedades respiratorias e inflamatorias. Su mecanismo de acción aún es desconocido; sin embargo, uno posible podría ser la potenciación o modulación de la respuesta inmune en estos individuos, mediante activación, diferenciación y proliferación de linfocitos T_{H1} secretores de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ e IL-2, responsables de eliminar bacterias intracelulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad inmunomoduladora de extractos acuosos de plantas sonorenses. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) de individuos sanos, que se expusieron a los extractos acuosos de las plantas y en coestimulación con fitohemaglutinina (PHA-L). Se determinó la viabilidad celular con resazurina, la expresión de CD69 (citometría de flujo), la producción de IFN- γ por ELISA y NO por reacción de Griess a 24, 48 y 72 h. Los extractos con porcentajes de viabilidad mayores al 80% fueron seleccionados, los extractos citotóxicos fueron eliminados. Los extractos de *A. cochliacantha*, *E. albomarginata*, *R. precatória*, *S. nigra* L y *S. molle* L, presentaron un porcentaje de viabilidad $\geq 80\%$ [400-12.5 $\mu\text{g/mL}$], el extracto *E. camaldulensis* disminuyó la viabilidad en 400 y 200 $\mu\text{g/mL}$ a un 60%. La expresión de CD69 e IFN- γ , se vio disminuida en células co-estimuladas con los extractos de *S. nigra* L, *S. molle* L y *R. precatória* con PHA-L, a 24 y 48 h. A las 72 h ninguno de los extractos mostró

diferencias significativas (* $p < 0.05$) comparándose con el control de PHA-L. Los extractos acuosos también mostraron la capacidad de reducir el nitrito a las 24 horas. Los extractos mostraron actividad anti-inflamatoria, regulando negativamente la expresión de CD69 y la producción de IFN- γ inducida por PHA-L. Los extractos de *S. nigra* L, *S. molle* L y *R. precatória* mostraron la mayor actividad anti-inflamatoria.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son ampliamente utilizados en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diferentes enfermedades. México tiene etnias que utilizan la flora de la región para curar diversas afecciones. Sonora se caracteriza por contar con una amplia diversidad de plantas las cuales son muy representativas de su región por ser una zona árida y desértica. Las características climáticas y del suelo les proporcionan a las plantas la capacidad de producir metabolitos que le confiere resistencia y nutrientes necesarios a utilizar en periodos de escases o estrés. Estas propiedades, además de los conocimientos empíricos y etnobotánicos, de las etnias como la Mayo, han promovido su uso tradicional, su incorporación a la alimentación cotidiana y consumo en forma de infusiones de tipo acuoso o hidroalcohólico. Plantas como: *Acacia cochliacantha*, *Euphorbia albomarginata*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Rhynchosia precatória*, *Sambucus nigra*, *Schinus molle* L, son utilizadas para tratar enfermedades relacionadas con vías respiratorias e inflamatorias. Aún se desconoce la explicación científica necesaria para elucidar el mecanismo que las plantas ejercen sobre los individuos y ayudar a que puedan recuperarse. Actualmente se tienen reportadas una amplia gama de actividades biológicas relacionadas a estas plantas como: antimicrobiana, antimicobacteriana, antiinflamatoria, antioxidante, antiparasitaria, antihelmíntica, antimicótica, antiproliferativa, anticancerígena y también inmunomoduladora, siendo esta última la de nuestro interés (Coronado y col., 2016).

Los agentes inmunomoduladores actúan induciendo un cambio en el sistema, que activan o debilitan su función; pueden utilizarse como una alternativa o conjuntamente con la terapia convencional para tratar una amplia variedad de enfermedades, especialmente cuando las defensas del hospedero tienen que activarse en condiciones de alteración de la respuesta inmune (Mukherjee y col., 2012), el responsable de contrarrestar los agentes patógenos

causantes de enfermedades; compuesto por el sistema innato y el adaptativo, que trabajan en conjunto, con la ayuda de diversos elementos y células efectoras.

Debido a la amplia gama de enfermedades que comprometen al sistema inmunitario y los nuevos casos de resistencia a fármacos, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que contribuyan a la eliminación efectiva de enfermedades con los menores efectos adversos. La búsqueda de alternativas de origen natural con posibles propiedades inmunomoduladoras es prometedora y dicha investigación actualmente se encuentra en ascenso.

Los extractos acuosos de las plantas Sonorenses, además de ser utilizados ampliamente por la etnia Mayo como parte de su medicina tradicional, son una estrategia importante como terapia en conjunto con los medicamentos comunes, ya que pueden direccionar o potenciar la respuesta inmunitaria en individuos que se encuentren inmunocomprometidos.

ANTECEDENTES

Sistema Inmunitario

El sistema inmunitario es el responsable de brindar protección a los organismos frente a moléculas o patógenos. Está compuesto por diversas células y mediadores moleculares que interactúan para eliminarlos y trabaja en una serie de respuestas coordinadas entre sí que mantienen la homeostasis y protección al hospedero. Principalmente se dividen en respuesta inmune innata (natural, parcialmente específica) y adaptativa (adquirida, muy específica) (Abbas y col., 2007; Murphy y col., 2008).

La respuesta innata está compuesta por barreras fisicoquímicas y biológicas, células circundantes y tisulares, moléculas y diversas proteínas. Las principales y más abundantes células implicadas en esta clase de inmunidad, células citolíticas naturales (NK) que provienen de estirpe linfocítica y, los provenientes de estirpe mielocítica las células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos), y fagocitos mononucleares (monocitos-macrófagos y células dendríticas o presentadoras de antígeno) que actúan protegiendo al hospedero de moléculas extrañas o patógenos, una vez que alguna barrera epitelial, tejido o circulación se haya encontrado afectado, secretando diversos factores como: colectinas, ficolinas, proteínas de fase aguda, sistema de complemento, quimiocinas y citocinas.

Los fagocitos mononucleares ocupan un lugar central entre la inmunidad innata y la adaptativa, su principal función es la presentación de antígenos y fagocitosis, son los macrófagos los principales, provienen de un precursor presente en circulación llamado monocito.

La inmunidad adaptativa está mediada por células provenientes de la estirpe linfoide. Entre los linfocitos se encuentran los B, responsables de la

inmunidad humoral, los T de la inmunidad celular y las células dendríticas o células profesionales en presentar antígenos. Un par de subpoblaciones son los linfocitos T CD8+ citotóxicos y linfocitos T CD4+ cooperadores. Es de suma importancia la interacción de mediadores de la respuesta innata y adaptativa, ya que a partir de esta se hará la presentación del antígeno previamente procesados por células dendríticas (Abbas y col., 2007; Murphy y col., 2008).

Linfocito T

Linfocitos T vírgenes se encuentran en órganos linfáticos periféricos esperando ser expuestos a algún antígeno presentado por células dendríticas. Estos linfocitos salen a periferia esperando esta presentación y de no ser así vuelven a su lugar origen. Es en este lugar donde las células dendríticas ya cargadas con algún antígeno, se transportan y presentan a los linfocitos para iniciar su activación. Tras la activación los linfocitos empiezan su expansión a células específicas de antígeno y diferencian a las diferentes poblaciones (Abbas y col., 2007; Murphy y col., 2008).

Existen dos poblaciones de linfocitos T, CD8+ o citotóxicos, cuya función principal es eliminar células infectadas por virus o células cancerosas que han sufrido alguna modificación y, los linfocitos T CD4+ o cooperadores, que se dividen en varias subpoblaciones como los T_{H1}, T_{H2} y la T_{H17} y T reguladoras. Los T_{H1} se caracteriza por montar una respuesta pro-inflamatoria, que se desencadena principalmente en presencia de microorganismos intracelulares y enfermedades de inflamación crónica, en dicha respuesta se producen las citocinas IFN- γ y TNF- α , que activan a macrófagos. La secreción de IFN- γ promueve varias señales bioquímicas como la fusión de lisosomas con fagosomas y generan gran cantidad de metabolitos sumamente tóxicos como óxido nítrico, producido por la enzima óxido nítrico sintasa inducible, que es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, el oxígeno molecular y NADPH

como donador-sustrato, promoviendo un ambiente ideal para la eliminación de patógenos (Gorocica y col., 1999).

La actividad de los macrófagos es regulada por la secreción de IFN- γ secretada por los linfocitos T efectores activados. El control de la síntesis de IFN- γ se regula por medio del mRNA que codifica esta citocina, ya que contiene una región inestable (AUUUA), que reduce su vida media y el periodo de su producción (Murphy y col., 2008). También esta subpoblación puede estimular la producción de anticuerpos contra patógenos extracelulares produciendo señales coestimuladoras para linfocitos B indiferenciados y activados por antígeno, a inducir el cambio de clase para generar anticuerpos de distintos isotipos.

Por otra parte, la respuesta T_H2 se produce principalmente en respuesta a microorganismos extracelulares como parásitos los cuales producen una estimulación persistente o repetida por los linfocitos T esta respuesta es anti-inflamatoria, la principal citocina que interviene en esta respuesta es la IL-4, también la IL-5, IL-10 y la IL-13, también IgE un anticuerpo generado por linfocitos B cuya función es combatir este tipo de microorganismos (Figura 1).

Los linfocitos T_H17 son inducidos en fases tempranas de la inmunorreacción hacia bacterias extracelulares, activando a neutrófilos que contienen a este tipo de bacterias. Sus principales citocinas secretoras son: TGF- β , IL-6, IL-17. Las células T reguladoras tienen como función suprimir las respuestas de linfocitos T, importantes para limitar las inmunorrespuestas o respuestas exacerbadas y así prevenir reacciones autoinmunitarias (Ladecola y col., 2011).

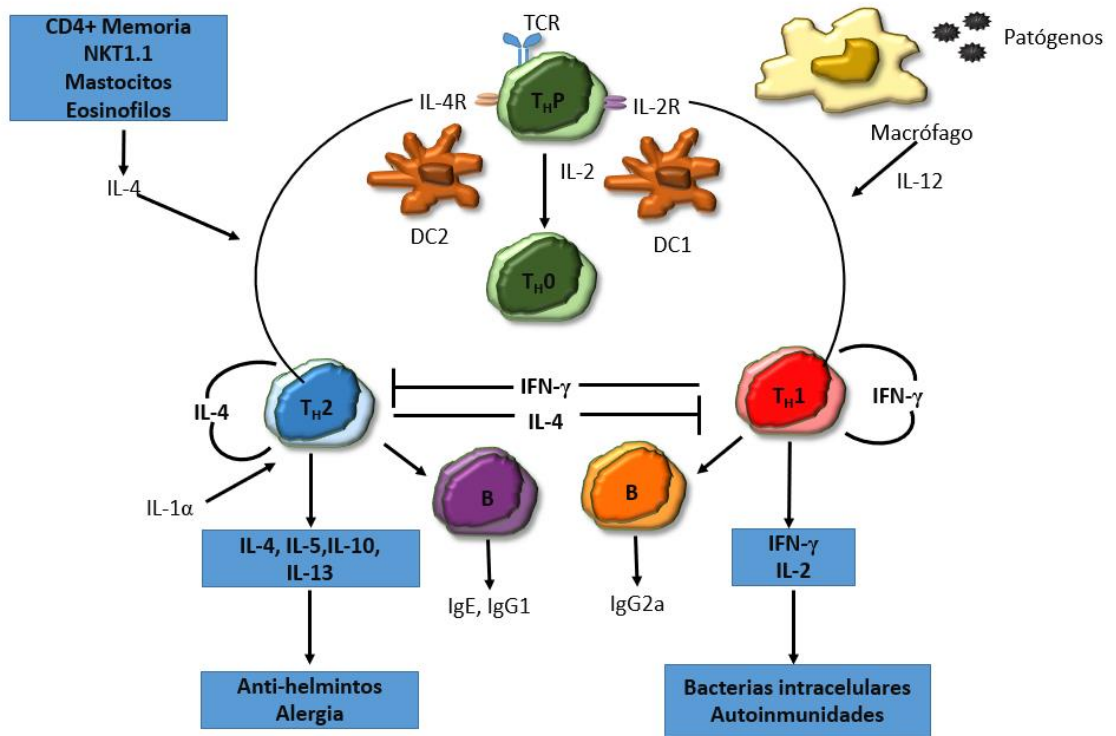


Figura 1. Subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (T_H1/T_H2).

Actividad Inmunomoduladora de Productos Naturales

La inmunomodulación está relacionada a gran variedad de enfermedades y su cambio en la respuesta inmune. Dentro de los inmunomodulación se encuentra la inmunoestimulación que restaura y aumenta las funciones del sistema inmune cuando existen procesos de inmunosupresión o inmunocompromiso (cáncer, SIDA, enfermedades crónico degenerativas y/o infecciosas, etc.) y la inmunoinhibición o inmunosupresión, que inhiben una respuesta inmune sobre expresada, como es el caso de procesos inflamatorios (enfermedades autoinmunes, infecciones crónicas, etc.), (Majdalawieh y col., 2015). La inmunomodulación puede implicar inducción, expresión, amplificación o inhibición de cualquier fase o parte de esta respuesta (Lee y col., 2011). Se monitoriza por medio de diversos análisis como: viabilidad, proliferación celular, expresión de diversas moléculas de activación, citocinas anti y pro-inflamatorias o por mecanismos efectores celulares como la fagocitosis o quimiotaxis (Mlungisi y col., 2016).

Reportes de actividad inmunomoduladora de compuestos derivados de plantas han surgido como una alternativa o conjuntamente con una terapia convencional para tratar una variedad de enfermedades, especialmente cuando las defensas del hospedador tienen que ser activadas bajo las condiciones de una respuesta inmune alterada (Mukherjee y col., 2012), todo esto ha sido monitorizado llevando un análisis científico riguroso para determinar la eficacia y la seguridad. Mezclas complejas de hierbas medicinales con propiedades inmunomoduladoras, pueden incluir varios compuestos bioactivos que exhiben actividad contra diferentes blancos o incluso pueden tener efectos sinérgicos (Licciardi y col., 2011; Lee y col., 2011). Análisis de estructura actividad reportan que los compuestos mayormente relacionados con actividad inmunomoduladora son los compuestos polifenólicos como los flavonoides glucosilados extraídos por

solventes polares como agua y alcoholes (Martínez y col., 2016; Giang y col., 2015).

La amplia reactividad de flavonoides, hacen que tengan alta afinidad a polímeros biológicos, iones de metales pesados y moléculas expresadas en las células que pueden catalizar el transporte de electrones, captar radicales libres, importantes para detener el proceso oxidativo de las células, capacidad estrechamente relacionada a la actividad anti-inflamatoria.

Existen actualmente algunos remedios estandarizados ya utilizados y comercializados para esta actividad. UMakhonya®, un refuerzo inmune africano utilizado para “limpiar la sangre” y para controlar la diabetes, la presión arterial alta, la neumonía, las culebrillas, las úlceras y las hemorroides, mejora la secreción de citocinas pro-inflamatorias y aumenta los niveles de sIL-2R en pacientes inmunosuprimidos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC´s) tratadas con PHA a dosis no citotóxicas. En las concentraciones más altas el efecto es adverso con valores de IC₅₀ de 512.08, 500 y 487.91 µg/mL para las PBMC´s estimuladas con PHA y con *Staphylococcus aureus* (PG-S) (Mlungisi y col., 2016).

PBMC´s previamente aisladas de individuos saludables, fueron expuestas 18 horas a extractos herbales de *Echinacea purpurea* y *Astagulus membranaceus*. El extracto de *E. purpurea* indujo la expresión de mRNA de IFN-γ y de IL-1β, *A. membranaceus* indujo la expresión de mRNA de IL-6 e IL-8, en conjunto estos dos extractos herbales indujeron la expresión de citocinas pro-inflamatorias, apuntando una actividad inmuno-estimuladora en el caso de alguna infección que requiera alguna de estas citocinas para la eliminación de algún microorganismo intracelular, los fitoterapéuticos contienen varios constituyentes activos diferentes que trabajan sinérgicamente para producir los efectos terapéuticos deseados (Ruiz y col., 2016).

A su vez el extracto acuoso de *Centella asiática* y *Rhinacanthus nasutus* utilizados en la medicina tradicional tailandesa, incrementó significativamente la proliferación de linfocitos humanos, comparándolos con linfocitos expuestos a fitohemaglutinina (PHA: 5 µg/ml), esto de una manera dosis dependiente (10, 100, 200 µg/mL). En cuanto a la producción de IL-2 y TNF-α, se vio incrementada en la coestimulación de PHA con 500 µg/mL de *C. asiática*, para *R. nasutus* solo se aumentó para el caso de TNF-α, al compararse con el control estimulado con PHA solamente (Punturee y col., 2005). *Silybum marianum*, *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis*, *Cichorium intybus* y *Dracocephalum kotschyi*, plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional iraní y utilizados también en Asia y Europa, han aumentado la proliferación de linfocitos aislados de individuos sanos, en concentraciones desde 0.1–800 µg/mL, con un índice de estimulación ($IS \leq 0.05$) (Amirghofran y col., 2000).

Los extractos etanólicos crudos de *Dioscorea membranacea* Pierre, estimularon significativamente la actividad de las células NK contra células K562 a concentraciones menores de 10 y 100 ng/mL, pero no a concentraciones mayores. Estos mismos no mostraron efecto observable sobre la proliferación de linfocitos extraídos de individuos saludables (Panthong y col., 2014).

Actividad Inmunomoduladora de Plantas Sonorenses

Sonora cuenta con una gran diversidad biológica, ya que se han registrado más de 1800 especies de plantas nativas. Más del cincuenta por ciento se consume para algún propósito terapéutico. La etnia Mayo consume los géneros *Acacia*, *Euphorbia*, *Eucalyptus*, *Rhynchosia*, *Sambucus*, *Schinus* se utilizan para tratar enfermedades del tracto respiratorio, enfermedades inflamatorias y mejorar el sistema inmunitario (Yetman y col., 2002; Coronado y col., 2016).

Acacia cochliacantha

Arbusto o árbol pequeño, encontrado en lugares con clima cálido entre los 240 y los 1300 metros, proveniente de la familia fabaceae (EFSA Journal, 2012). En la especie *Cochliacantha* aún no se le ha reportado actividad inmunomoduladora, sin embargo, se tienen datos de otras especies. El extracto acuoso de *Acacia nilotica* reportó un porcentaje de proliferación mayor en esplenocitos de ratón, cuando estuvo en coestimulación con Concanavalina A (Con A) en las concentraciones de 31.25 y 62.5 µg/mL, comparándolo cuando se aplicó solo extracto. Se reportó un 70.22% de proliferación en las concentraciones mayores (125, 250, 500 µg/mL). En cuanto a la citocina IL-10, se vio inhibida en 13.85, 2.42, 6.59, 10.78, y 21.09% cuando los esplenocitos fueron tratados con 31.25, 62.5, 125, 250, y 500 µg/mL del extracto más Con A, siendo comparado con su control positivo de esplenocitos con Con A (Sharma y col., 2014).

En un modelo murino tumoral, se evaluaron distintos parámetros inflamatorios en suero, al administrarse el extracto metanólico de *Acacia ferruginea*, se encontró una reducción significativa de TNF- α , iNOS, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, IFN- γ y IL-2, a los 15 y 30 días, comparándolos con el ratón sin tratar con el extracto (Murugesan y col., 2013).

Euphorbia albomarginata

Es una planta proveniente de la familia Euphorbiaceae, puede alcanzar una longitud de 25 cm, se encuentra en zonas áridas o secas (EFSA Journal, 2012).

Extractos hexánicos de diferentes especies de *Euphorbia* fueron probados en linfocitos aislados de individuos saludables, se evaluó la proliferación y secreción de citocinas. El extracto de *E. microciadia* a la concentración de 1 µg/mL, aumentó la proliferación (132.7 \pm 4.5%) comparándolo con el control positivo con

PHA ($203.9 \pm 19.04\%$), al igual que *E. heteradenia* que aumentó la proliferación a un porcentaje de proliferación de ($115 \pm 1.26\%$). *E. microciadia* (29.6 ± 0.6 pg/ml) y *E. osyridea* (28.5 ± 0.3 pg/ml) incrementaron significativamente la secreción de IL-4 en presencia de PHA, comparándolo con el control positivo (5.17 ± 0.2 pg/ml), *E. heteradenia* no tuvo efecto significativo en esta citocina. Sólo *E. osyridea* incrementó la secreción de IFN- γ en presencia de PHA (178.2 ± 2.6 pg/ml) comparada con el control negativo (74.2 ± 20.9 pg/ml) (Boroujerdnia y col., 2014).

Eucalyptus camaldulensis

Árbol ampliamente extendido por el mundo proveniente de Australia, forma parte de la familia Myrtaceae (EFSA Journal, 2012). No existen antecedentes de actividad biológica en modelos *in vitro*. Estudios moleculares *in silico* encontraron interacciones fuertes entre moléculas aisladas de *Eucalyptus tereticornis* con receptores inmunomoduladores humanos como: NF- κ B, P50, IL-10, Factor necrosis tumoral alfa (TNF- α), subunidad alfa reguladora de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la cyclooxygenasa-2 (COX-2) (Maurya y col., 2012).

Sambucus nigra L

Es un árbol o arbusto que mide alrededor de 4-6 m (raramente 10 m) de altura, es nativo de Europa, noroeste de África y sudoeste de Asia. Es comúnmente conocido como saúco o saúco negro, canillero. Su hábitat son zonas húmedas, como ríos y lagos (EFSA Journal, 2012).

Se evaluó un modelo inflamatorio de LPS/ IFN- γ en macrófagos murinos RAW 264.7 durante 24 horas. El extracto etanólico de hojas de *Sambucus australis* a 100 μ g/mL disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) la secreción de TNF- α y óxido nítrico (NO). También mostró la supresión del factor de transcripción

NF- κ B a $12.8 \pm 2.6\%$ y $20.4 \pm 3.5\%$, en concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Benevides y col., 2017).

Análisis estructura actividad de flavonoides y antocianinas aislados del género *Sambucus*, se asocian con actividad inmunomoduladora (Giang y col., 2015). El remedio herbal Sambucol que contiene 38% de *Sambucus nigra* L, promueve la secreción de citocinas como IL-8 e IL-10 (Barak y col., 2012). Se realizó un análisis genético de PBMC's expuestas al extracto *Sambucus cerulea* y se obtuvo la expresión de mediadores de activación, migración y moléculas inflamatorias (Denzel y col., 2010).

Schinus molle L

Schinus molle es un árbol perteneciente a la familia Anacardiaceae, originaria del sur de Brasil, Uruguay y Argentina; puede llegar a medir alrededor de 15 metros de altura (EFSA Journal, 2012). Actualmente no se tienen antecedentes de actividad inmunomoduladora de esta especie, sin embargo, se han identificado diferentes moléculas de tipo flavonoide con reportes de actividad antioxidante que en análisis estructura-actividad están relacionados a actividad anti-inflamatoria (Bendaoud y col., 2010, Marzouk y col., 2006, Hänsel y col., 1994, Hierman y col., 1989).

Rhynchosia precatória

Planta con flores, perteneciente a la familia Fabaceae, distribuido en América y África, se encuentra en pastizales, bosques abiertos, colinas secas (EFSA Journal, 2012).

El extracto etanólico de las semillas de *Rhynchosia nulubilis*, Yak-Kong conocido en la medicina tradicional china, redujo significativamente la inflamación en el modelo de edema de pata de ratón con carragenina. También se obtuvo inhibición significativa en el modelo de edema de oreja con ácido araquidónico, a

una concentración menor en comparación con el control de indometacina después de 3 horas de inducción de inflamación (Yim y col., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del Extracto Acuoso

Las plantas fueron seleccionadas de la etnofarmacopea Mayo, basado en su uso tradicional: asma, bronquitis, tos, tuberculosis, inflamación y enfermedades respiratorias en general. Fueron recolectadas en los municipios donde reside esta etnia: Álamos, Navojoa, Etchojoa y Huatabampo, en el periodo septiembre 2012 a enero del 2015. Fueron identificadas por el Profesor José Sánchez Escalante, responsable del herbario de la Universidad de Sonora. Se utilizaron 10 gramos de planta seca y pulverizada, la cual se mezcló con 100 mL de agua destilada, para posteriormente llevarla a punto de ebullición por 5 minutos. Por último, fue filtrada con papel de algodón y liofilizada en un sistema Lacónico, Freeze Dry systems/Freeze 4.5. Se realizó una solución madre de 16 mg/mL, que se esterilizó con membranas milipore 0.22 μm y se almacenó en congelación a -20°C .

Reactivos

Histopaque-1077®, densidad: 1.077 g/ml (Sigma-Aldrich Co. United Kingdom), Roswell Park Memorial Instituto (RPMI-1640) suplementado con L-glutamina (2 mL), aminoácidos no esenciales (2 mL), HEPES (25 μM), and 5% (v/v) suero fetal bovino inactivado (SFB). Fitohemaglutinina, [10-1.25 $\mu\text{g/mL}$] (Roche, Applied science. Germany). Sal de resazurina, 10% (v/v) (Sigma-Aldrich. Set Louis, MO, EUA).

Aislamiento, Cultivo y Activación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC's)

Se obtuvo muestra sanguínea en tubos heparinizados de individuos aparentemente saludables de sexo masculino, entre 20-30 años de edad, que

contaran con consentimiento informado (ANEXO 2). Se aislaron las PBMC's por medio de estratificación con Histopaque-1077. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de RPMI-1640 y se determinó su viabilidad por medio del método de exclusión con azul de tripano. Se colocaron 1×10^5 células por pozo en placas de 96 pozos, las cuales fueron estimuladas con PHA-L a (10, 2.5 y 1.25 $\mu\text{g/mL}$) (ANEXO 3), y con los extractos en concentraciones desde 400.0 hasta 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de extracto acuoso y en presencia o ausencia de PHA-L (1.25 $\mu\text{g/mL}$). Fueron incubadas a 37° C, en presencia de humedad y 5% de CO₂ por 24 horas.

Ensayo de Viabilidad en PBMC's

Después de mantener las células en 24 horas de cultivo, se añadió 10% v/v de resazurina, durante 20 horas a 37° C, en presencia de humedad y 5% de CO₂. Fluorescencia fue determinada a las 44 horas, por medio del equipo Fluoroskan Ascent® & FL (Thermo Scientific. Finland), y la placa fue leída con una longitud de excitación de 530 nm y longitud de onda de emisión de 590 nm. Los resultados fueron analizados por Ascent Software, y fueron expresado en porcentaje de viabilidad (%), estos fueron comparado con el control de células tratadas con PHA-L (media de pozos por triplicado). La fórmula utilizada para evaluar el porcentaje de viabilidad (%) fue la siguiente:

Porcentaje de viabilidad (%)

$$= \frac{\text{media fluorescencia pozos tratado} - \text{media fluorescencia pozos blanco tratado}}{\text{media fluorescencia control crecimiento} - \text{media fluorescencia blanco control}} \times 100$$

Donde:

Blanco tratado: RPMI con extractos.

Blanco control: RPMI con resazurina.

Control de crecimiento: Células con RPMI.

Análisis del Marcador de Activación CD69

Las PBMC's fueron incubadas en placas de 96 (Costar, Cambridge, USA) a una densidad celular de 1×10^5 células por pozo. Se trataron con concentraciones no-citotóxicas previamente evaluadas de 50.0, 25.0 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$, de los extractos acuosos de *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L y *Rhynchosia precatória*, en presencia de PHA-L a 1.25 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas. Dichas células fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD69 acoplado a ficoeritrina (PE), para el marcaje de la molécula de activación CD69 (Becton Dickinson, USA).

Un total de 10,000 eventos por tubo fueron adquiridos con el citómetro de flujo (FACSCanto, Becton-Dickinson, USA) y fueron analizados en el software FACSDiva 6.0 (Becton-Dickinson, USA). La población se seleccionó con base a los parámetros forward scatter (Tamaño) vs. side scatter (Complejidad) (ANEXO 4). Los resultados fueron expresados como porcentajes de expresión de CD69.

Ensayo de Producción de IFN- γ

1×10^5 células PBMC's por pozo fueron tratadas con extractos acuosos de *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L y *Rhynchosia precatória* en concentraciones no-citotóxicas previamente evaluadas de 50.0, 25.0 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$, en presencia de PHA-L a 1.25 $\mu\text{g/mL}$ durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se tomaron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C para su posterior análisis. Se tomaron 100 μL de anticuerpo de captura, los cuales fueron incubados en una placa de ELISA durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente se lavó 5 veces la placa con regulador de fosfatos PBS 1x con Tween 20 al 0.05%, después del último lavado se secó la placa en papel absorbente para remover cualquier residuo del regulador. La placa fue bloqueada con 200 μL de diluyente de ensayo con albúmina al 1% y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó nuevamente la placa acorde a lo anteriormente mencionado para proseguir a agregar 100 μL de las diluciones estándar preparadas con la proteína

recombinante IFN- γ proporcionada por la casa comercial, además de las muestras y controles requeridos. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente y agregó 100 μ L del anticuerpo de detección conjugado con estreptavidina y peroxidasa de rábano (SAv-HRP) a cada pozo y se incubó durante 1 hora. Se realizaron 7 lavados, para agregar 100 μ L de la solución sustrato (ABTS) durante 15 minutos y se prosiguió a realizar la lectura de absorbancia a 415 nm. Los resultados fueron calculados realizando un análisis de regresión lineal, la cual generó una ecuación que se utilizó para obtener la concentración de IFN- γ de las muestras y los estándares.

Reacción de Griess para la Evaluación de Nitritos

Se evaluaron sobrenadantes previamente generados con las condiciones anteriormente predichas. Se agregaron 50 μ L de sobrenadante con cada condición a una placa de 96 pozos por triplicado. Se agregó la misma cantidad del reactivo de Griess (1% sulfamida 0.1 M/ 1 HCl y 0.1% de N-(1-naphtinela)di clorhídrico). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 540 nm. Los resultados fueron calculados realizando un análisis de regresión lineal, por medio de la curva generada con nitrito de sodio. Dicha curva generó una ecuación que se utilizó para obtener la concentración de nitritos de las muestras y los estándares.

Análisis Estadístico

Todos los valores fueron expresados en medias \pm DS, de tres experimentos independientes. Se realizaron comparaciones utilizando la prueba U de Mann-Whitney para datos cuantitativos, se consideró una $*P \leq 0.05$ y $**P \leq 0.01$ como significativos, este análisis fue realizado con el paquete estadístico IBM SPSS versión 20.0 (IBM, Armonk, New York. USA).

RESULTADOS

Ensayo de Viabilidad Celular de las PBMC's Tratadas con los Extractos Acuoso de Plantas Sonorenses

Se evaluó la viabilidad de las PBMC's expuestas a seis extractos acuosos de plantas sonorenses consumidas por la etnia Mayo por su posible efecto inmunomodulador. La viabilidad de *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L, *Rhynchosia precatória*, *Acacia cochliacantha*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Euphorbia albormaginata*, se evaluó a las concentraciones desde 400.0 hasta 12.5 µg/mL sobre PBMC's humanas, en presencia y ausencia de PHA-L (1.25 µg/mL) durante 44 horas de cultivo. Para los subsecuentes estudios, se conservaron y evaluaron los extractos que mantuvieron la viabilidad celular a un porcentaje ≥ 80 .

Los extractos de *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L y *Rhynchosia precatória* presentaron un porcentaje de viabilidad mayor al 80% en las concentraciones de 50.0 µg/mL hasta 12.5 µg/mL, en ausencia y/o presencia de PHA-L (Tabla I). Estos extractos se seleccionaron para los siguientes experimentos.

Los extractos de *Acacia cochliacantha*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Euphorbia albormaginata* disminuyeron la viabilidad de más del 20% de las células en cultivo, en todas las concentraciones probadas, en presencia y/o ausencia de PHA-L, por ello fueron descartados (Datos no mostrados).

Ensayo de Activación Celular por Medio de la Expresión de la Molécula CD69

Para determinar si los extractos acuosos de las plantas seleccionadas generan un efecto inmunomodulador en las PBMC's, se evaluó la expresión de la lectina tipo C, CD69 tras 24 horas de incubación con dichos extractos. La molécula CD69

Tabla I. Viabilidad (%) de las PBMC's tratadas por 44h con el extracto acuoso de: *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L y *Rhynchosia precatória* por el ensayo óxido-reducción con resazurina.

PLANTA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)		
<i>Sambucus nigra</i> L	50	25	12.5
[µg/mL]			
Extracto	102±8.92	104±1.46	102±6.60
Extracto + PHA-L	107±7.61	112±3.86*	110±7.33*
<i>Schinus molle</i> L	50	25	12.5
[µg/mL]			
Extracto	99±4.45	99±4.58	98±3.49
Extracto + PHA-L	99±2.04	99±2.41	96±1.90
<i>Rhynchosia precatória</i>	50	25	12.5
[µg/mL]			
Extracto	92±6.54	95±4.10	92±1.90
Extracto + PHA-L	116±9.24*	118±3.10*	115±4.47*
SIN ESTÍMULO	100±0		
PHA-L	107±10.57		
[1.25 µg/mL]			

se expresa en las PBMC's tras la estimulación celular desde los 30 minutos y hasta las 48 horas. Los extractos *per se* no indujeron la expresión del marcador CD69 en las PBMC's (datos no mostrados). La PHA-L (1.25 µg/mL) indujo la expresión de CD69 en las PBMC's de todas las muestras probadas a las 24 horas con un porcentaje de 39.96 ± 4.11 .

Como se puede observar en la figura 2A, *Sambucus nigra* L indujo la expresión de CD69 en el $38.6 \pm 5.8\%$ de las PBMC's coestimuladas con 50.0 µg/mL de extracto, las PBMC's coestimuladas con 25.0 y 12.5 µg/mL de extracto, mostraron porcentajes de 44.5 ± 0.1 y $42.1 \pm 11.7 \%$ respectivamente. Mientras que $39.68 \pm 8.4\%$ de las PBMC's estimuladas con PHA-L expresaron CD69. Las concentraciones de extracto de 25 y 50 µg/mL mostraron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$) comparadas con las células estimuladas con PHA solamente.

Por su parte, *Schinus molle* L (figura 2B) indujo la expresión de CD69 en el 40.9 ± 5.2 y 40.9 ± 4.5 de las PBMC's coestimuladas con 50.0 y 25.0 µg/mL de extracto, las PBMC's coestimuladas con 12.5 µg/mL de extracto, mostraron un porcentaje de $44.45 \pm 0.21\%$. El $44.2 \pm 5.0\%$ de las PBMC's de las PBMC's estimuladas con PHA-L expresaron CD69. No se observaron diferencias estadísticamente significativas comparadas con las células estimuladas con PHA solamente.

Rhynchosia precatória (figura 2C), indujo la expresión de CD69 en el 26.2 ± 0.42 , 27.45 ± 0.63 y $29.5 \pm 2.12\%$ de las PBMC's coestimuladas con 50.0, 25.0 y 12.5 µg/mL respectivamente, comparadas con $36 \pm 7.35 \%$ de las células estimuladas solo con PHA. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

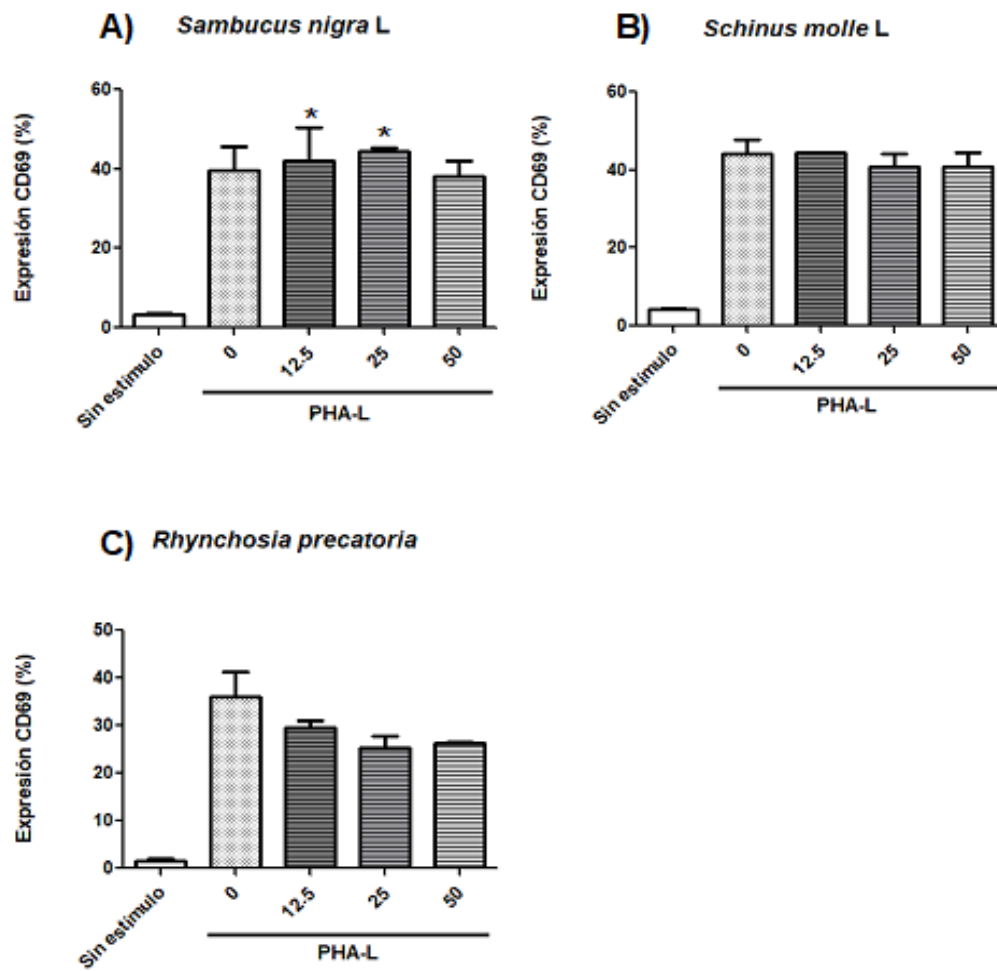


Figura 2. Expresión del marcador CD69 % en PBMC´s tratadas por 24 h con el extracto acuoso de: A) *Sambucus nigra* L, B) *Schinus molle* L y C) *Rynchosia precatória*. Valores expresados en media \pm DS (n=3). Significancia estadística basada en la comparación de células estimuladas con PHA-L, *p \leq 0.05.

Producción de Interferón-Gamma (IFN- γ) Producido por PBMC's Expuestas a Extractos Acuosa Sonorenses

Para determinar si los extractos seleccionados fueron capaces de modular a las PBMC's hacia una respuesta de tipo pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, se evaluaron los mediadores IFN- γ por ELISA y NO por el ensayo de Griess.

La producción de IFN- γ se midió en los sobrenadantes de cultivo de las PBMC's coestimuladas con PHA-L y los diferentes extractos. Los extractos acuosa sin estimulación con PHA-L no produjeron IFN- γ y NO (datos no mostrados).

Sambucus nigra L, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la producción de IFN- γ por las PBMC's inducido por PHA-L, tal como se muestra en la figura 3A. Esta disminución fue observada a todos los tiempos en los que se midió el IFN- γ y a todas las concentraciones de extracto evaluadas.

Schinus molle L disminuyó la producción de IFN- γ por las PBMC's inducido por PHA-L, tal como se muestra en la figura 3B. Esta disminución solo fue significativa ($p < 0.05$) a todos los tiempos, a todas las concentraciones de extracto evaluadas.

Por su parte, *Rhynchosia precatoria* disminuyó la producción de IFN- γ por las PBMC's inducido por PHA-L, según se muestra en la figura 3C. Esta disminución solo fue significativa ($p < 0.05$) a todos los tiempos, a todas las concentraciones de extracto evaluadas.

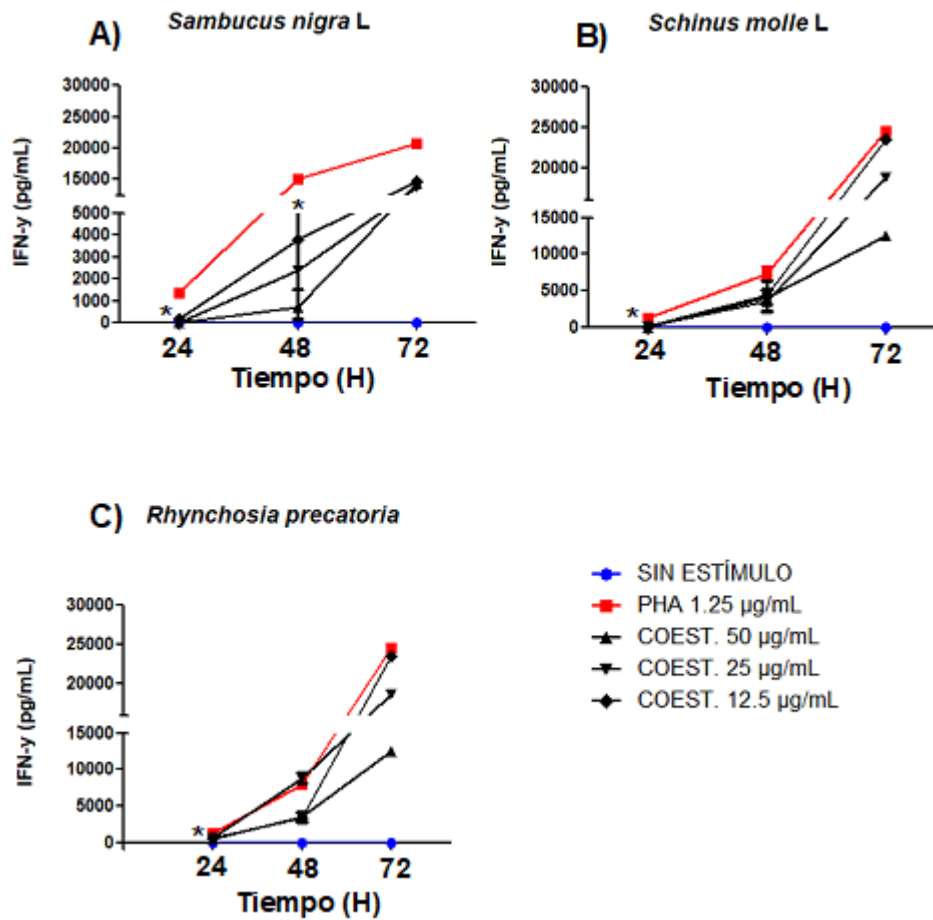


Figura 3. Producción de IFN- γ en PBMC's tratadas por 24, 48 y 72 h con el extracto acuoso de: A) *Sambucus nigra* L, B) *Schinus molle* L y C) *Rynchosia precatorea*. Valores expresados en media \pm DS (n=3). Significancia estadística basada en la comparación de células estimuladas con PHA-L, * $p \leq 0.05$.

Producción de Óxido Nítrico (NO) Producido por PBMC's Expuestas a Extractos Acuáticos Sonorenses

La producción de nitritos por la reacción de Griess solamente fue detectable a las 24 h de exposición. Para las condiciones de 48 y 72 h no se detectó la producción de nitritos en ninguna de las concentraciones probadas, estimuladas o no con PHA-L.

Sambucus nigra L indujo un 1.26 ± 0.06 μ M de nitrito a la concentración de 25 μ g/mL como se muestra en la figura 4A. Esto fue una disminución significativa (* $p \leq 0.05$) a 24 horas, con respecto a PHA-L.

Schinus molle L indujo un 2.06 ± 0.76 μ M de nitrito en la coestimulación de 12.5 μ g/mL como se muestra en la figura 4B. Esto fue una disminución significativa (* $p \leq 0.05$) a 24 horas, con respecto a PHA-L.

Rhynchosia precatória indujo un 5.55 ± 0.74 μ M de nitrito en la coestimulación de 50 μ g/mL como se muestra en la figura 4C. Esto fue una disminución significativa (* $p \leq 0.05$) a 24 horas, con respecto a PHA-L.

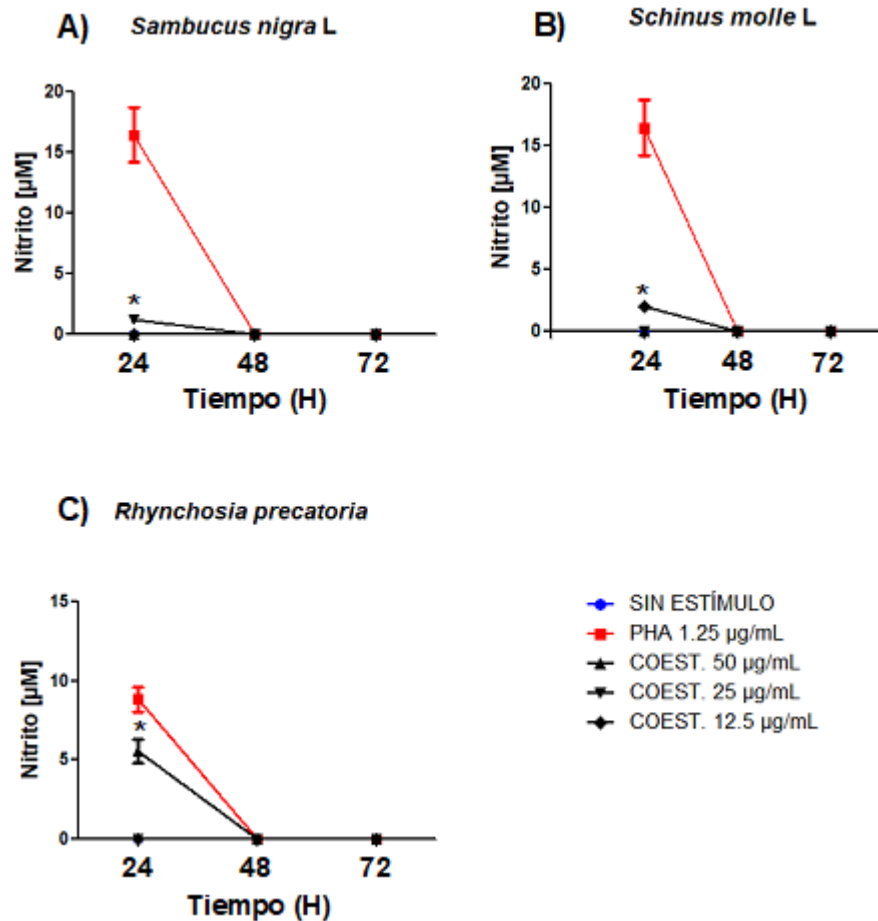


Figura 4. Producción de NO en PBMC's tratadas por 24, 48 y 72 h con el extracto acuoso de: A) *Sambucus nigra* L, B) *Schinus molle* L y C) *Rynchosia precataria*. Valores expresados en media \pm DS (n=3). Significancia estadística basada en la comparación de células estimuladas con PHA-L, *p \leq 0.05.

DISCUSIÓN

Los extractos acuosos de *S. nigra* L, *S. molle* L y *R. precatoria*, tienen la capacidad de modular la respuesta de PBMC's expuestas a fitohemaglutinina (PHA-L), además de no afectar la viabilidad de PBMC's a las concentraciones evaluadas. Estos extractos promovieron también la actividad metabólica de las PBMC's y por consecuencia la activación celular.

La activación se reflejó por la expresión de CD69 que es un receptor de membrana tipo lectina C del cual aún se desconoce su ligando. Se expresa en muchas células del sistema inmune tales como NK, células B, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y su expresión es constitutiva en timocitos y plaquetas. Tiene una escasa expresión en linfocitos T en reposo, pero tras la activación celular este se induce rápidamente en 30 minutos a 48 horas (Ziegler y col., 1994). Es ampliamente reportada como molécula de activación, transducción de señales e inmunorregulación. En sitios de inflamación crónica, la expresión de esta proteína, contrarresta el proceso inflamatorio, regulando de manera negativa los genes relacionados con la síntesis de mediadores inflamatorios como citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IL-23, TNF- α e IFN- γ , quimioatrayentes, y moléculas activadoras de otros tipos celulares como proteína activadora de macrófagos MIP-1 α , MIP-1 β y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Martín y col., 2010; González y col., 2013). Aun así, se ha reportado que la activación y proliferación no se ve comprometida en células deficientes de esta molécula. En nuestro trabajo, *R. precatoria* (extracto acuoso) parcialmente inhibió la expresión de CD69, IFN- γ y NO inducida por PHA-L en las PBMC's, resultado que indica su actividad anti-inflamatorio. Además, para esta especie, nuestro grupo de investigación ha reportado su actividad antimicobacteriana a través de las moléculas precatorina A, lupinifolin y cajanona (Coronado y col., 2017).

Existen reportes para diferentes especies de *Rhynchosia*, en los que señalan que su actividad biológica, va desde la anti-proliferativa, anti-hipertensiva, anti-oxidante y anti-inflamatoria, siendo esta última de nuestro particular interés, ya que respaldan lo encontrado en nuestro sistema (Kinjo y col., 2001; Kim y col., 2004; Yim y col., 2009; Jia y col., 2015). En nuestro conocimiento aún no existen reportes de actividad anti-inflamatoria para *R. precatória*, por lo que este estudio sería el primero.

Schinus molle L, aún no cuenta con estudios que confirmen su actividad anti-inflamatoria, sin embargo, otras especies del género han mostrado esta actividad. La actividad anti-inflamatoria ha sido reportada con base a su capacidad de reducir IL-6, TNF- α e IFN- γ y aumentar a IL-4, IL-10, TGF- β , que suprime la diferenciación de células T_{H1} y T_{H17} (Davicino y col., 2010).

En nuestro estudio *S. molle* L reguló negativamente el efecto de la PHA-L en las PBMC's, ya que su extracto acuoso disminuyó al IFN- γ y el NO inducido por PHA-L-, apuntando a que es un agente anti-inflamatorio, lo que motiva a seguir con el estudio de los mecanismos de acción implicados.

En la bibliografía, el género *Sambucus* está ampliamente estudiado por ser utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias e inflamatorias en forma de infusión o decocción (Rogerio y col., 2010; Scopel y col., 2010; Souza y col., 2013; Kšonžekova y col., 2015; Benevides y col., 2017). Estos estudios han relacionado su uso tradicional con su actividad biológica *in vitro*, asociándolo a actividad antioxidante, antibacteriana y principalmente la anti-inflamatoria. En diversos modelos biológicos de inflamación, algunos autores han reportado la capacidad de este género para modular negativamente esta respuesta, disminuyendo la expresión de NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , NO (Barak y col., 2002; Denzler y col., 2010; Thi y col., 2017).

Actualmente, ya se cuenta con remedios estandarizados que contienen a *Sambucus nigra* L en su fórmula (Sambucol, black ELDERBERRY syrup, Sambucol for Kids y Sambucol Active Defense) utilizados para potenciar el sistema inmunitario.

Nuestro estudio confirma lo reportado en la bibliografía, que *S. nigra* L tiene actividad anti-inflamatoria, toda vez que reguló negativamente la producción de IFN- γ y NO inducido por PHA-L.

Algunos reportes indican que la actividad anti-inflamatoria está mediada por metabolitos secundarios contenidos en los extractos acuosos, los más estudiados son los compuestos polifenólicos como flavonoides y antocianinas que, por su actividad antioxidante, son efectivos eliminando radicales libres de oxígeno y nitrógeno además de su capacidad anti-inflamatoria (Fedel y col., 2014; Bendaoud y col., 2010; Salem y col., 2016).

Existe una amplia investigación en la búsqueda de agentes anti-inflamatorios que traten la gran variedad de enfermedades en donde la respuesta inflamatoria es exacerbada y difícil de tratar. Nuestros resultados apuntan a *Schinus molle* L y *Rhynchosia precatória* como dos anti-inflamatorios que destacan por mantener la viabilidad de las PBMC's y por no ser reportados anteriormente en la bibliografía, por lo que resulta sumamente interesante continuar con la investigación científica de estas plantas a fin de aislar y caracterizar las moléculas responsables de esta actividad.

CONCLUSIONES

Los extractos acuosos de *S. nigra* L, *S. molle* L y *R. precatória* no mostraron actividad citotóxica a las concentraciones evaluadas.

S. nigra L, *S. molle* L y *R. precatória* mostraron actividad anti-inflamatoria debido a la disminuci3n de IFN- γ y NO en el sistema *in vitro*.

RECOMENDACIONES

Evaluar la composición química de los extractos acuosos y así conocer el tipo de moléculas responsables de la actividad anti-inflamatoria.

Ampliar la evaluación de citocinas (pro-inflamatorios y anti-inflamatorios).

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., Saunders. Cellular and Molecular Immunology. 6ta. Edición, pp.572. 2007.
- Afsar, T., Trembley, J., Salomon, C., Razak, S., Khan, M., Ahmed, K. Scientific Reports. Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: Involvement of multiple signal transduction pathways. Vol. 6, pp. 23077, 2016.
- Al-Faifi¹, Z., Masrahi¹, Y., Sayed Aly, S., Al-Turki, A., Dardeer, T. Asian Pacific Journal Cancer Preview. Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of *Euphorbia Triaculeata* Forssk. Extract. Vol. 18 (3), pp. 771-777, 2017.
- Amirghofran, Z, Azadbakht, M, Karimi, H. Journal of Ethnopharmacology. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. Vol, 72, pp. 167-172, 2000.
- Badescu, M., Badulescu, O., Badescu, L., Ciocoiu, M. Pharmaceutical Biology. Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. Vol, 53, pp. 533–539, 2015.
- Barak, V., Birkenfeld, S., Halperin, T., Kalickman, I. Israel Medical Association Journal. The Effect of Herbal Remedies on the Production of Human Inflammatory and Anti-inflammatory Cytokines. Vol, 4, pp. 919-921, 2002.
- Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J., Cazaux, S., Bouajila, J. Journal of Food Science. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. Vol, 75, pp. -, 2010.
- Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J., Cazaux, S., Bouajila, J. Journal of Food Science. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant

Activities of *Schinus molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries
Essential Oils Vol. 75, pp. 6, 2010.

Benevides, J., Martins, F., Moreira, M., Souza, T., Kondratyuk, T., Endringer, D.,
Scherer, R., Fronza, M. *Pharmaceutical Biology*. Potential anti-
inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*.
Vol, 55:1, pp. 991-997, 2017.

Boroujerdnia, M., Khosravi, N., Malek-Hosseini, S., Amirghofran, Z.
Pharmaceutical biology. Augmentation of lymphocytes activation and T cell
modulation by the extracts from some Euphorbia species. Vol, 52(11), pp.
1471–1477, 2014.

Coronado, E., Gigliarelli, G., Garibay, A., Robles, R., Curini, M., López, J., Espitia,
C., Superchi, S., Vergura, S., Marcotullio, M. *Journal of Ethnopharmacology*.
New Isoflavonoids from the extract of *Rhynchosia precatorea* (Humb. &
Bonpl. ex Willd.) DC. and their antimycobacterial activity. Vol, 206, pp. 92–
100, 2017.

Coronado, E., Sánchez, J., López, J., Robles, R., Velázquez, C., Sánchez, D.,
Garibay, A. *Journal of Ethnopharmacology*. Antimycobacterial activity of
medicinal plants used by the Mayo people of Sonora, Mexico. Vol, 190, pp.
106–115, 2016.

Davicino, R., Mattar, M., Casali, Y., Anesini, C., Micalizzi, B.
Immunopharmacology and Immunotoxicology. Different activities of *Schinus*
areira L.: anti-inflammatory or pro-inflammatory effect. Vol, 32, pp. 620–627,
2010.

Denzler, K., Waters, R., Jacobs, B., Rochon, Y., Langland, O. *Plos One*.
Regulation of Inflammatory Gene Expression in PBMC's by
Immunostimulatory Botanicals. Vol, 5, pp. 1-15, 2010.

European Food Safety Authority. European Food Safety Authority (EFSA) Parma, Italy. Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. Vol, 10, pp. 2663, 2012.

Fedel, L., Kassuya, C., Auharek, S., Formagio, A., Cardoso, C., Mauro, M., Cunha, A., Monreal, A., Vieira, M., Oliveiraa, R. Revista Brasileira Farmacognosia. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. Vol, 24, pp. 565-575, 2014.

Giang, T., Abeeda, A., Yuan, Z., Torun, A., Helle, W., Hilde, B. Carbohydrate Polymers. Structure–activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries. Vol, 125, pp. 314–322, 2015.

Gorocica, P., Chávez, R., Lascurain, R., Espinosa, B., Zenteno, E. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Óxido nítrico, una molécula multifuncional. Vol, 12, pp. 300-304, 1999.

González, R., Cortés, J., Sánchez, F., Martín, P. Trends in Molecular Medicine. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? 2013.

Hac-Wydro, K., Szydło, K. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. The influence of environmentally friendly pesticide – Eucalyptol –alone and in combination with terpinen-4-ol – on model bacterial membranes. Vol. 146, pp. 918–923, 2016.

Hänsel R., Killer K., Rimpler H., Schneider G. Hager's. Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 5. Auflage, Band 6, Drogen P-Z. Vol, -, pp. 627–640, 1994.

- Hiermann, A. Scientific Pharmacology. Die Untersuchung potentieller Wirkstoffe in *Epilobium* Arten. Vol, 51, pp. 158–167, 1983.
- Hong, S., Sim, M., Chu, Y. Toxicological Research. Melanogenesis-Promoting Effects of *Rhynchosia nulubilis* and *Rhynchosia volubilis* Ethanol Extracts in Melan-a Cells. Vol. 32, (2), pp. 141-147, 2016.
- Jæger, D., Simpson, B., Chi, N., Jäger, A., Crocoll, C., Møller, B., Weinstein, P., Semple, S. Natural Product Research. Biological activity and LC-MS/MS profiling of extracts from the Australian medicinal plant *Acacia ligulata* (Fabaceae). Vol.-, pp.-, 2017.
- Jia, X., Zhang, C., Qiu, J., Wang, L., Bao, J., Wang, K., Zhang, Y., Chen, M., Wan, J., Su, H., Han, J., He, C. Carbohydrate Polymers. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root. Vol. 132, pp. 67–71, 2015.
- Jiang, H., Parthasarathy, D., Torregrossa, C., Mian, A., Bryan, S. Journal of Visualized Experiments. Analytical Techniques for Assaying Nitric Oxide Bioactivity. Vol.64, pp.-, 2012.
- Kim, J., Um, S., Woo, J., Kim, J., Kim, H., Jang, K., Kang, S., Lim, B., Kang, I., Choue, R., Cho, Y. Life Sciences. Comparative effect of seeds of *Rhynchosia volubilis* and soybean on MG-63 human osteoblastic cell proliferation and estrogenicity. Vol. 78, pp. 30– 40, 2005.
- Kinjo, J., Nagao, T., Tanaka, T., Nonaka, G., Okabe, H. Biology Pharmacological. Bulletin. Antiproliferative Constituents in the Plant 8. Seeds of *Rhynchosia Volubilis*. Vol.24, pp. 1443—1445, 2001.
- Kumar, A., Kumar, A., Kumar, S., Rahal, A. Veterinary Medicine International. Studies on Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of Hot Aqueous Extract of *Acacia nilotica* L. Leaves against Common Veterinary Pathogens. Vol. -, pp.-, 2014.

- Ladecola, C., Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Vol, 17, pp.796-808, 2011.
- Lee, H-K. Journal of Ethnopharmacology. Immunomodulation and traditional medicines: a reductionist or holistic approach? Vol, pp. 136-377, 2011.
- Licciardi, P., Underwood, J. International Immunopharmacology. Plant-derived medicines: a novel class of immunological adjuvants. Vol, 11, pp. 390-398, 2011.
- López, J., Kuceková, Z., Humpolíček, P., Miček, J., Sáha, P. Molecules. Polyphenolic Extracts of Edible Flowers Incorporated onto Atelocollagen Matrices and Their Effect on Cell Viability. Vol. 18, pp. 13435-13445, 2013.
- Majdalawieh, A., Muneera, W. Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. Vol, 28, pp.295-304, 2015.
- Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Matesanz, A., Cortés, J., Ramírez, M., Barreiro, O., López, P., Gutiérrez, C., Fuente, H., Cruz, A., Sánchez, A. Journal Allergy Clinical Immunology. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. Vol. 126, pp. 355-65, 2010.
- Martinez, V., Mestre, T., Rubio, F., Girones-Vilaplana, A., Moreno, D., Mittler, R., Rivera, R. Frontiers in Plant Sciences. Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. Vol, 15, pp. 838, 2016.
- Marzouk, M., Moharram, M., Haggag, E., Ibrahim, M., Badary, O. Phytotherapy Research. Antioxidant Flavonol Glycosides from *Schinus molle*. Vol. 20, pp. 200–205, 2006.
- Maurya, A., Khan, F., Dnyaneshwar, U., Kumar, D., Kumar, S. European Journal of Pharmaceutical Sciences. QSAR, docking and in vivo studies for

- immunomodulatory activity of isolated triterpenoids from *Eucalyptus tereticornis* and *Gentiana kurroo*. Vol, 47, pp.-, 2012.
- Mlungisi, N., Nceba, G. BMC Complementary and Alternative Medicine. Evaluation of the immunomodulatory effects of a South African commercial traditional immune booster in human peripheral blood mononuclear cells. Vol, 16, pp. 300, 2016.
- Mukherjee, P., Nema, N., Bhadra, S., Mukherjee, D., Braga, F., Matsabisa, M. Indian Journal of Traditional Knowledge. Immunomodulatory leads from medicinal plants. Vol, 13, pp.235-256, 2012.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. Mac Graw Hill. Inmunobiología de Janeway 7ma. Edición, pp. 928. 2008.
- Murugesan, K., Guruvayoorappan, C. *Asian Pacific Journal Cancer Preview*. *Acacia ferruginea* Inhibits Tumor Progression by Regulating Inflammatory Mediators-(TNF-a, iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2, GM-CSF) and Pro-Angiogenic Growth Factor- VEGF. Vol, 14 (6), pp. 3909-3919, 2013.
- Ngcobo, M., Gqaleni, N. BMC Complementary and Alternative Medicine. Evaluation of the immunomodulatory effects of a South African commercial traditional immune booster in human peripheral blood mononuclear cells. Vol. 16, pp. 300, 2016.
- Palharini, J., Richter, A., Silva, M., Ferreira, F., Pirovani, C., Naves, K., Goulart, V., Mineo, T., Silva, M., Santiago, F. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties. Vol. 7, pp.-, 2017.
- Panthong, S., Ruangnoo, S., Thongdeeying, P., Sriwanthana, B., and Itharat, A. BMC Complementary and Alternative Medicine. Immunomodulatory activity of *Dioscurea membranacea* Pierre rhizomes and of its main active constituent Dioscorealide B. Vol, 14, pp. 403, 2014.

- Piknova, B., Park, W., Cassel, S., Gilliard, N., Schechter, N. Journal of Visualized Experiments. Measuring Nitrite and Nitrate, Metabolites in the Nitric Oxide Pathway, in Biological Materials using the Chemiluminescence. Vol, 118, pp.-, 2016.
- Punturee, K., Wild, C., Kasinrerak, W., Vinitketkumnuen, U. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Immunomodulatory Activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus*. Vol, 6, pp.-, 2005.
- Rogério, A., Nunes, A., Faccioli, L. Pharmacological Research. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. Vol. 62, pp. 298–307, 2010.
- Ruiz, G., Nelson, E., Kozin, A., Turner, T., Waters, R., Languard, J. PLoS ONE. A Lack of Bioactive Predictability for Marker Compounds Commonly Used for Herbal Medicine Standardization. Vol, 11, pp.-, 2016.
- Salem, M., Zayed, M., Ali, H., El-Kareem, M. Journal of Wood Science. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Schinus molle* wood branch growing in Egypt. Vol. 62, pp. 548–561, 2016.
- Scopel, M., Mentz, L., Henriques, A. Planta Medica. Comparative analysis of *Sambucus nigra* and *Sambucus australis* flowers: development and validation of an HPLC method for raw material quantification and preliminary stability study. Vol.76, pp.1026-1031, 2010.
- Sharma., A, Kumar, A., Kumar, S., Rahal, A. Veterinary Medicine International. Studies on Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of Hot Aqueous Extract of *Acacia nilotica* L. Leaves against Common Veterinary Pathogens. Vol., - pp. 9, 2014.
- Souza, M., Castro, M., Oliveira, A., Almeida, A., Almeida, T., Reis, L., Medeiros, A., Brito, A., Pereira, V. Microbial Pathogenesis. Cytokines and NO in

- American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. Vol. 57, pp. 27-32, 2013.
- Spiridonov, N., Arkhipov, V., Foigel, A., Shipulina, L., Fomkina, M. Protonophoric and Uncoupling Activity of Royleanones from *Salvia officinalis* and Euvimals from *Eucalyptus viminalis*. Vol. 17, pp. 1228–1230, 2003.
- Thi, G., Wangensteen, H., Barsett, H. International Journal of Molecular Sciences. Elderberry and Elderflower Extracts, Phenolic Compounds, and Metabolites and Their Effect on Complement, RAW264.7 Macrophages and Dendritic Cells. Vol, 18, pp. 584, 2017.
- Vuorinen, A., Seibert, J., Papageorgiou, V., Rollinger, J., Odermatt, A., Schuster, D., Assimopoulou, A. Planta Medica. *Pistacia lentiscus* Oleoresin: Virtual Screening and Identification of Masticadienonic and Isomasticadienonic Acids as Inhibitors of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. Vol. 81, pp. 525-32, 2015.
- Yadav, V., Mishra, K., Singh, D., Mehrotra, S., Singh, V. Immunopharmacology and Immunotoxicology. Immunomodulatory Effects of Curcumin. Vol. 27, pp. 485–497, 2005.
- Yetman, D., Van Devender, T.. Mayo ethnobotany: land, history, and traditional knowledge in Northwest Mexico. University of California Press, Oakland, California, United States of America, 2002.
- Yim, J., Lee, O., Choi, U., Chan, Y. International Journal of Molecular Sciences. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Ethanolic Extracts of *Glycine max* (L.) Merr and *Rhynchosia nulubilis* Seeds. Vol, 10, pp. 4742-4753, 2009.
- Zahra, A., Hossein, A., Mohammad, K., Fathollah, K., Nasser, G., & Zahra, M. Pharmaceutical Biology. In vitro inhibitory effects of thymol and carvacrol on dendritic cell activation and function. Vol, 54(7), pp. 1125-1132, 2015.

Ziegler, S., Ramsdell, F., Alderson, S. Stem Cells. The Activation Antigen CD69.
Vol, 12, pp.456-465, 1994.

ANEXOS

Anexo 1

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Célula NK	Célula asesina natural
Con A	Concavalina A
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito monocito
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria al 50%
IFN- γ	Interferón gamma
IL-	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
IS	Índice de estimulación
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LT (CD4+)	Linfocito T cooperador
LT (CD8+)	Linfocito T citotóxico
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP-1 α , MIP-1 β	Proteína activadora de macrófagos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NO	Óxido nítrico
PBMC's	Células mononucleares de sangre periférica
PHA-L	Fitohemaglutinina-L
T _{H1}	Linfocito T cooperador 1
T _{H17}	Linfocito T cooperador 17
T _{H2}	Linfocito T cooperador 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN ESTUDIO TITULADO

“Análisis de la actividad inmunomoduladora de plantas sonorenses”

Directora de tesis: Dra. Adriana Garibay Escobar

Sede donde se realizará el estudio: UNIVERSIDAD DE SONORA,
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIÓLOGICAS

Nombre _____ del _____ participante:

El grupo de estudio: _____ solicita su participación en la investigación con nombre “Análisis de la actividad inmunomoduladora de plantas sonorenses” con el fin de conocer el efecto que pueda tener la exposición de extractos acuosos de diversas plantas de Sonora, México, a células involucradas en el sistema inmunitario. Su participación será de alrededor de 1 año con 6 meses.

Antes de decidir si usted acepta o no participar en este proyecto debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas para saber si usted es apto para participar en esta investigación, determinando si cursa una infección o inflamación aparente, si está consumiendo algún medicamento y/o sustancia nociva a su salud y su edad. Comprometiéndonos a que en dicho estudio habrá un manejo adecuado de los datos personales del individuo en estudio con base a la “Ley federal de protección de datos personales en posesión de los particulares” DOF 21-12-2011.

Los procedimientos a utilizar serán: recolección de sangre venosa heparinizada con sistema vacutainer BD para posteriormente separar células mononucleares de sangre periférica y realizar cultivo de estas exponiéndolas con los extractos acuosos de las plantas seleccionadas.

Como procedimiento alternativo se requerirá una muestra de sangre venosa con EDTA para analizarla por medio de una citometría hemática con el fin de conocer los valores de leucocitos manejados de cada persona.

El procedimiento para venopunción es la siguiente:

- El sitio se limpia con un desinfectante (antiséptico).
- Se coloca una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo con el fin de aplicar presión en la zona.
- Se introduce una aguja en la vena.
- Se recoge la sangre en un frasco hermético o en un tubo adherido a la aguja.
- La banda elástica se retira del brazo.
- Se saca la aguja y el sitio se cubre con un vendaje para detener el sangrado.

RIESGOS Y MOLESTIAS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Los riesgos hacia estos procedimientos son mínimos y depende de cada persona. (La molestia que se puede presentar al momento de realizar la venopunción, ya que es un procedimiento medianamente invasivo, debido a la utilización de jeringa o aguja, que penetrara en piel hasta puncionar la vena y tomar los tubos requeridos).

ACLARACIONES

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio utilizado para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad.

En caso de dudas o aclaraciones recurrir a:

Q.B.C. Paola Carolina Curiel Gutiérrez.

Teléfono: 662-222-89-80.

Correo electrónico: paolac.curielgu@gmail.com

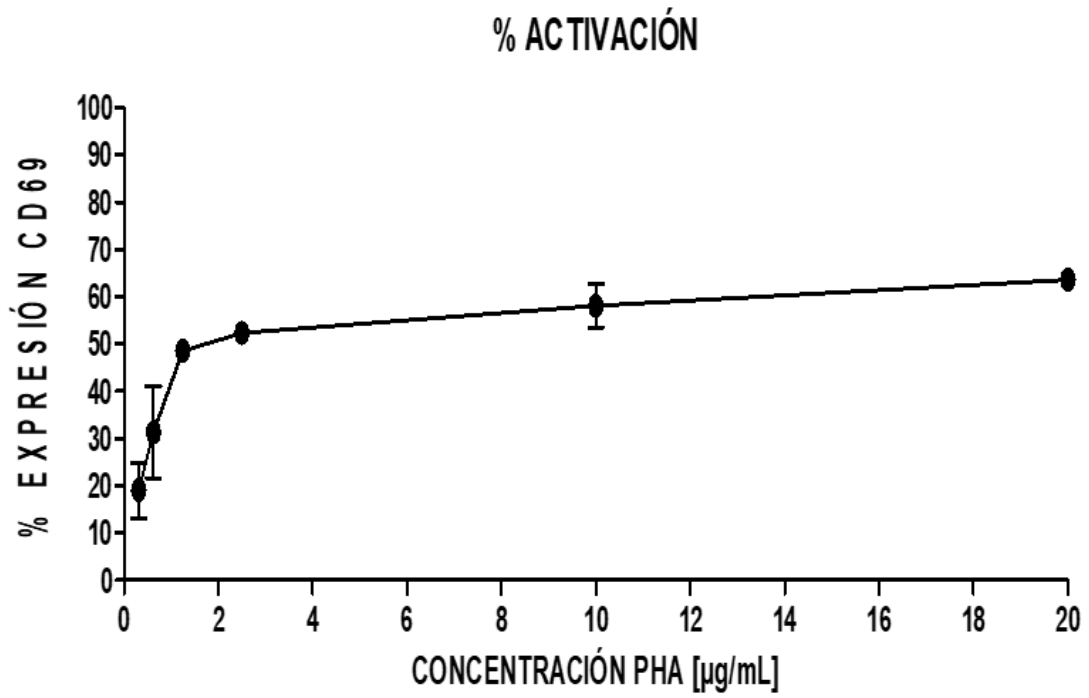
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar esta Carta de Consentimiento Informado.

Firma Participante

Firma Responsable

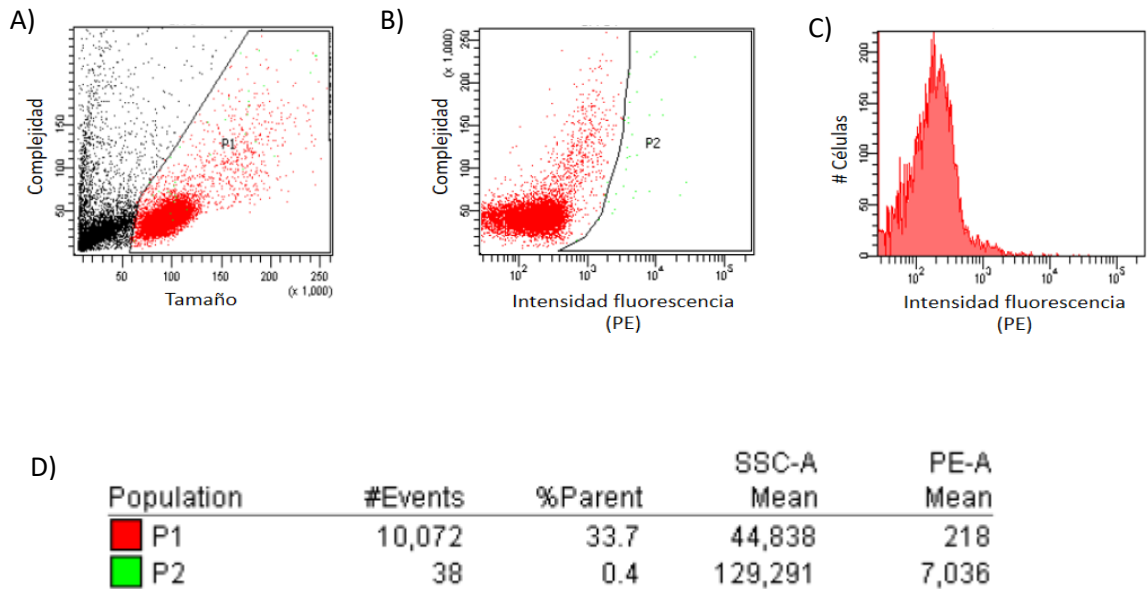
Anexo 3

Titulación de PHA-L para la selección de dosis óptimas y sub-óptimas.



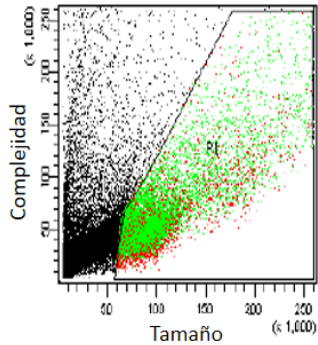
Anexo 4

Análisis de expresión de la molécula de activación temprana CD69.

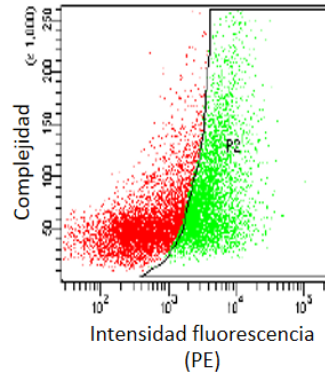


Citogramas de puntos del análisis de la expresión de la molécula CD69 en células sin estimular (Experimento representativo). A) Selección de células mononucleares (linfocitos y monocitos) de acuerdo al tamaño y complejidad (P1). B) Selección de células que expresan CD69 acorde a la intensidad de Fluorescencia de fluorocromo ficoeritrina (P2). C) Histograma de número de células e intensidad de fluorescencia expresada por células CD69+. D) Porcentajes de expresión e intensidad de fluorescencia expresada por células CD69+.

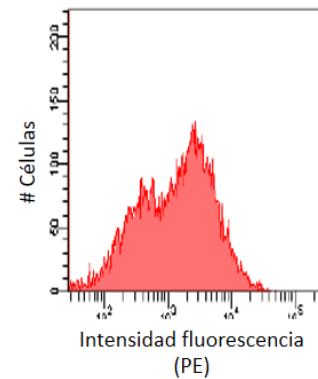
E)



F)



G)



H)

Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	PE-A Mean
■ P1	10,330	21.6	65,650	2,679
■ P2	4,714	45.6	79,696	5,082

Citogramas de puntos del análisis de la expresión de la molécula CD69 en células estimuladas con PHA-L 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Experimento representativo). E) Selección de células mononucleares (linfocitos y monocitos) de acuerdo al tamaño y complejidad (P1). F) Selección de células que expresan CD69 acorde a la intensidad de Fluorescencia de fluorocromo ficoeritrina (P2). G) Histograma de número de células e intensidad de fluorescencia expresada por células CD69+. H) Porcentajes de expresión e intensidad de fluorescencia expresada por células CD69+.

Anexo 5

Immunomodulatory activity from Sonoran Plants

^{2,3}Paola Curiel-Gutiérrez, ¹Verónica Mata-Haro, ³Carlos Velázquez-Contreras,
³Ramón Robles-Zepeda, ³Adriana Garibay-Escobar*

The affiliations are listed at the end of the article.

Abstract

There is a lot of medicinal plants consumed by Sonoran ethnicities. Mayo ethnicity consume: *Acacia cochliacantha*, *Euphorbia albomarginata*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Rhynchosia precatoria*, *Sambucus nigra*, *Schinus molle* L., as aqueous infusions, for treatment of respiratory tract diseases, inflammatory diseases and improve their immune system. We take a heparinized blood for isolated the peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) of apparently healthy persons. The PBMC's was exposed to serial dilutions of extract, from 400.0 to 12.5 µg/mL and co-stimulation with phytohemagglutinin (PHA-L), to evaluate percentage of viability with resazurin assay and selected the non-cytotoxic extracts and concentrations for evaluated the early activation marker CD69 by flow cytometry and quantification IFN-γ by ELISA and nitrites by Griess assay. The aqueous extracts of: *S. nigra* L, *S. molle* L and *R. precatoria*, not showed a decrease in the viability of PBMC's, the cytotoxic extracts were discarded. *S. nigra* L, *S. molle* L and *R. precatoria* showed an anti-inflammatory activity, because these extracts can modulate PHA-L activity, decreasing IFN-γ and NO at 24 hours.

Keywords: Natural products, Mayo Ethnicity, Aqueous Extract, Immunomodulatory Activity.

Introduction

Natural products are traditionally use in ethnomedicine for the treatment of different diseases. Plants have represented an important source for drugs, and México possesses a great diversity of flora with potential for searching new compounds treatment [1]. Various ethnicities around Mexico consume this plants as part of their usual diet. Mayo is a Sonoran ethnicity with a big biological diversity, count with more than 1800 species of native plants, which more than fifty percent is consumed for some therapeutic purpose [2]. They consume the genus: *Acacia*, *Euphorbia*, *Eucalyptus*, *Rhynchosia*, *Sambucus*, *Schinus* as aqueous infusion in respiratory tract diseases, inflammatory diseases and improve their immune system.

Reports indicate natural products are an abundant source of bioactive compounds which may have a therapeutic potential [3, 4].

The most featured are phenolic compounds. Flavonoids are characterized with medium to high polarity, specifically glucoside flavonoids are soluble in polar dissolvent like: boil water, alcohols. These molecules founded naturally in plants, vegetables and fruits. Present a lot of biological effects, the most important, low toxicity [5], cell activation, cellular growth, proliferation, antioxidant and immunomodulation activity [6,7]. Immunomodulation related to many diseases, changing immune response; involving induction, expression, amplification, or inhibition of any phase or part of that response [8]. Immunomodulatory activity can have monitored by evaluated cell viability, expression of activation markers and inflammatory and anti-inflammatory cytokines [9].

Due to before reports mentioned is important to determine the viability and activation of the plant aqueous extracts. Possible may found the non-cytotoxic doses or contain non- toxic molecules can offer an immunomodulatory activity.

The aim of this work is to evaluate the immunomodulatory activity of the aqueous extracts from Sonoran plants in peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) from healthy individuals, with oxide-reduction resazurin assay, expression of the

early activation molecule CD69 with flow cytometry, quantification IFN- γ by ELISA and NO with Griess assay.

Results

To define the optimal doses and conditions for future experiments of activation and quantification of cytokines in human PBMC's, we incubated with increases doses of the six different aqueous extracts, from 400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in presence or absence of phytohemagglutinin (PHA-L) at 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Our results showed *Sambucus nigra* L and *Rhynchosia precatória* showed a same activity in cells treated only with the extract, but in co-stimulation showed an increased in viability compared with the non-stimulated control, indicating a positive metabolic activity. *Schinus molle* L present a maintenance in the viability in evaluated doses in both conditions, with a viability percentage like the non-stimulated control. (Table I).

Acacia cochliacantha, *Euphorbia albormaginata* and *Eucalyptus camaldulensis* present a decrease in viability of more than 20% of the cells in culture, in all concentrations tested, in presence and/or absence of PHA-L, compared with PHA-L control (* $p \leq 0.05$) (Data not show).

We select the aqueous extracts with viability percentages higher than 80%: *Sambucus nigra* L, *Rhynchosia precatória* and *Schinus molle* L in three optimal concentrations 50.0, 25.0 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in co-stimulation with PHA-L 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for evaluated the expression of the early activation molecule CD69 and IFN- γ , NO metabolites.

Sambucus nigra L, showed a small, non-significant decrease in the expression percentage of CD69 molecule at 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration in co-stimulation with 38.6 \pm 5.8%, comparing to PHA-L control with 39.68 \pm 8.4%. The concentrations of 25.0 and 12.5 increased this percentage statistically significant (* $p \leq 0.05$), respect to PHA-L, with 44.5 \pm 0.1 and 42.1 \pm 11.7% respectively (Figure 1A).

Sambucus nigra L, decrease the amount of IFN- γ secreted for co-stimulation cases, in the three concentrations used 50.0, 25.0, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ at 24 hours. This effect was maintained at 48 y 72 hours at all evaluated concentrations (Figure 2A). A small NO secretion (1.26 ± 0.06) was presented in co-stimulation at 25.0 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3A).

Although *Schinus molle* L decreased CD69 expression at concentrations of 50.0 and 25.0 $\mu\text{g/mL}$ when the cells were co-stimulated, with percentages of 40.9 ± 5.2 and 40.9 ± 4.5 respect to PHA-L $44.2 \pm 5.0\%$, which were not statistically significant, as was the smallest extract concentration, maintained a similar percentage to PHA-L with $44.45 \pm 0.21\%$ (Figure 1B). Only at 24 hours showed a statistical significantly decreased ($*p \leq 0.05$) of IFN- γ in co-stimulation concentrations 50.0, 25.0, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ compared to PHA-L (Figure 2B). For NO secretion, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (2.06 ± 0.76) showed a decrease compared to PHA-L control (16.46 ± 2.28) (Figure 3B).

Rhynchosia precatória presented a dose-dependent trend in co-stimulation concentrations of 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ with values of 26.2 ± 0.42 , 27.45 ± 0.63 and $29.5 \pm 2.12\%$, decreasing the expression of CD69, respect to the control of PHA-L $36 \pm 7.35\%$ (Figure 1C).

At 24 hours, *Rhynchosia precatória* presented a statistical significantly decreased ($*p \leq 0.05$) of IFN- γ in co-stimulation concentrations 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ compared to PHA-L (Figure 2C). *Rhynchosia precatória* presented 5.55 ± 0.74 of NO in co-stimulation 50 $\mu\text{g/mL}$ at 24 hours, decreasing slightly comparing it with the PHA-L control at 8.83 ± 0.76 (Figure 3C).

Discussion

Many medicinal plants can modulate cellular and humoral immune response [12]. Immunomodulation using traditional medicinal plants can be used as an alternative to, or in conjunction with, conventional therapy for a variety of

diseases, especially when host defenses must be activated under the conditions of impaired immune response [13].

Mayo ethnicity usually consumed some Sonoran flora for the treatment of respiratory diseases and inflammation, but it's not clear how these plants act. When they are infected with different pathogens, maybe their immune response is boosted. Therefore, we made different experiments to confirm this activity. For instance, we evaluate the viability or metabolic activity of the PBMC's exposed to the six different aqueous extracts. *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L and *Rhynchosia precatória* extracts were selected that showed greater viability than $\geq 80\%$. The extracts with cytotoxic capacity were eliminated.

Currently exist some standardized remedies already used and marketed for immunomodulatory activity. uMakhonya®, an African immune booster used for the “cleanse the blood” and to control diabetes, high blood pressure, pneumonia, shingles, ulcers, and hemorrhoids, improve the secretion of pro-inflammatory cytokines and increase sIL-2R levels in immunosuppressed and PHA-treated PBMC's at non- cytotoxic doses but in higher doses the effect is adverse with IC50 values of 512.08, 500, and 487. 91 $\mu\text{g/mL}$ recorded for immunosuppressed, PHA-stimulated, and aureus-stimulated (PG-S) PBMC's, respectively [14]. This information indicates of *in vivo* toxicity at excessively higher equivalent doses, and the importance to indicate the persons the consumption of these products with carefully. In other way, we found a relation between the expression of CD69 and the measurement of IFN- γ and Nitrite in the supernatant of the PBMC's exposed to these extracts. The tree extracts can modulate PHA-L response, decreasing inflammatory molecules IFN- γ and NO, targeting its anti-inflammatory activity. Confirming the activity already reported for *Sambucus nigra* L and exhibiting two new agents *Schinus molle* L and *Rhynchosia precatória*.

In some studies of *Sambucus nigra* L demonstrated the ability to express genes related with activation (CD69), migration and inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α) [17].

The herbal remedy Sambucol, with 39% content of the fruit of *Sambucus nigra* L increased de production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and TNF- α) in monocytes isolated from healthy apparently individuals [15].

From other species of *Schinus*, investigators find an anti-inflammatory activity in carrageenan-Induced ear and paw edema in mice model. This species may reduce synthesis of prostaglandins from arachidonic acid with the involvement of the enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2), IL 1 β , TNF- α inflammation factors [19, 20].

There's no studies about immunomodulatory activity from *Rhynchosia*, but some reports indicate a proliferative effect in osteoblasts and melanocytes related to activation and CD69 expression, a molecule involve in the consequent secretion of various inflammatory cytokines related to Th1 lymphocytes (IL-2 and INF- γ) expressed in the infection against intracellular bacterias [21, 22, 23].

In other hand, there are many bioactive compounds present in this plants with pharmacological potential. We can find them in different extracts depending the polarity of the dissolvent. The aqueous extract of plants can present diverse types of molecules, the most frequent are glucosides and phenolic compounds like anthocyanins and flavonoids. Reports indicated a lot of biological activities of phenolic compounds, the most mentioned are antioxidant, low toxicity, cell activation. Analysis of the structure–activity indicate a relationship between phenolic compounds and immunomodulatory activity.

Plant extracts are natural substances that can be used for the treatment of different diseases. The knowledge of the viability percentage allows us to conclude the importance to determinate the doses of consume and corroborate the potential toxic of the plants and the molecules present. Activation and modulation of IFN- γ and NO in PBMC's exposed to these plants can approach us

to determinate an anti-inflammatory activity and they are potential candidates for the treatment of diseases where the immune system is compromised.

Materials and methods

Plant material

The plants were selected from the Mayo ethnopharmacopoeia based in on their traditional use: asthma, bronchitis, cough, inflammation, tuberculosis, respiratory diseases. The plants collected in municipalities where Mayo ethnicity lives, Álamos, Navojoa, Etchojoa and Huatabampo, from September 2012 to January 2015. The plants were identified by Professor José Jesús Sánchez Escalante, responsible for the herbarium of the University of Sonora, where a specimen of each plant was deposited [10].

10 grams of the plant (dyed and powdered) were dissolved with 100 mL of distilled water. This mixture was boil at 100°C for five minutes. Were filtered with cotton paper and freeze-dried (Labconco, Freeze Dry system/Freezone 4.5).

Isolation of PBMC's, culture and activation

Blood was obtained from healthy male individuals, 20-30 years old. PBMC's were isolated from heparinized blood using Histopaque-1077®, (Sigma-Aldrich Co. United Kingdom). Was resuspended in 1 mL of RPMI-1640 medium. PBMCs viability was assessed by microscopic examination using trypan blue dye exclusion test.

PBMC's were stimulated with PHA-L (2.5 µg/mL) in 96 well-plates (Costar, Cambridge, MA) at 1×10^5 cells/well and were treated with six different aqueous

extract at concentrations 400 to 12.5 µg/mL. Cells were incubated at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air for the last 24 hours.

PBMC's viability assay

After 24 hours resazurin added to the cells at 10% of the volume of culture medium and incubated for another 20 hours at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Florescence was determinate using Fluoroskan Ascent® & FL (Thermo Scientific. Finland), plate was read with an excitation wavelength 530 nm and emission wavelength 590 nm. The results were analyzed with Ascent Software, and expressed in percentage of viability (%) in compared with our normal control with untreated cells (mean of triplicated wells). The formula used to evaluate percentage of viability (%) was [11]:

Percentage of viability (%)

$$= \frac{\text{mean fluorescence treatment wells} - \text{mean fluorescence treatment white wells}}{\text{mean fluorescence growth control wells} - \text{mean fluorescence white control}} \times 100$$

2.4 Early activation marker analysis

PBMC's were incubated in 96 well plates (Costar, Cambridge, USA) at 1x10⁵ cells/well. PBMC's treated with the non-cytotoxic concentrations [50, 25 and 12.5 µg/mL] of Sambucus nigra L, Schinus molle L and Rhynchosia precatorea aqueous extract and co-stimulation with 1.25 µg/mL PHA-L for 24 hours. Cells stained with phycoerythrin (PE)-anti-CD69, for early activation marker CD69, (Becton Dickinson, USA). A total of 10,000 events per tube was acquired on the flow cytometer (FACSCanto, Becton-Dickinson, USA) and analyzed with the aid of the software FACSDiva 6.0 (Becton-Dickinson, USA). The gate was set on light-scatter properties (forward scatter vs. side scatter). The results were expressed as percentages of stained cells and compared with the PHA-L stimulated control [1.25 µg/mL].

2.5 IFN- γ production assay

PBMC's were incubated in 96 well plates (Costar, Cambridge, USA) at 1×10^5 cells/well. PBMC's treated with the non-cytotoxic concentrations [50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$] of *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L and *Rhynchosia precatorea* aqueous extract and co-stimulation with 1.25 $\mu\text{g/mL}$ PHA-L for 24, 48 and 72 hours, culture supernatant was collected and stored at -80°C until tested. For determination, the ELISA kits were used to measured IFN- γ secretion in culture supernatant following the manufacturer's instructions.

2.6 Quantification of Nitrite with Griess reaction

PBMC's were incubated in 96 well plates (Costar, Cambridge, USA) at 1×10^5 cells/well. PBMC's treated with the non-cytotoxic concentrations [50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$] of *Sambucus nigra* L, *Schinus molle* L and *Rhynchosia precatorea* aqueous extract and co-stimulation with 1.25 $\mu\text{g/mL}$ PHA-L for 24, 48 and 72 hours, culture supernatant was collected and stored at -80°C until tested. Nitrite accumulation in the culture medium as an indicator of NO production was measured using

the Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% H_3PO_4 and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine in distilled water. Equal parts of Supernatant (50 μL) and Griess reagent (50 μL) was mixed and incubated for 15 min. The absorbance at 540 nm was measured in an ELISA plate reader and results were calculated by using a standard calibration curve prepared with sodium nitrite.

2.5 Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SD, of three independent experiments. Comparisons were assessed using the Mann–Whitney U-test for quantitative values

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered significant, this analysis was performed by statistic package IBM SPSS version 20.0 (IBM, Armonk, New York. USA).

Acknowledgements

We are grateful to the University of Sonora and CONACyT for the support to carry out the present work. Dr. Enrique W. Coronado-Aceves for providing the extracts.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] de Castro, S. Biomedicine Sciences. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. Vol, 3, pp. 49–83, 2001.

[2] Yetman, D, Van Devender, T. Mayo ethnobotany: land, history, and traditional knowledge in Northwest Mexico. University of California Press, Oakland, California, United States of America, 2002.

[3] Mehta, G, Murillo, G, Naithani, R, Peng, X. Pharmacology Research. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? Vol, 27, pp. 950–961, 2010.

[4] Yang, C, Wang, X, Lu, G, Picinich, S. Natural Review Cancer. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. Vol, 9, pp. 429–439, 2009.

[5] Lopez, R, Ballester, I, González, R, Romero, I, Suarez, M, Zarzuelo, A. Gastroenterology. Immunomodulatory effect of flavonoids on IEC18 cells a structure–activity relationship study. Vol, 132, pp.132–236, 2007.

[6] Martinez, V, Mestre, T, Rubio, F, Girones-Vilaplana, A, Moreno, D, Mittler, R, Rivera, R. Frontiers in Plant Sciences. Accumulation of Flavonols over

Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. Vol, 15, pp. 838, 2016.

[7] Giang, T, Abeeda, A, Yuan, Z, Torun, A, Helle, W, Hilde, B. Carbohydrate Polymers. Structure–activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries. Vol, 125, pp. 314–322, 2015.

[8] Lee, H-K. Journal of Ethnopharmacology. Immunomodulation and traditional medicines: a reductionist or holistic approach? Vol, pp. 136-377, 2011.

[9] Mlungisi, N, Nceba, G. BMC Complementary and Alternative Medicine. Evaluation of the immunomodulatory effects of a South African commercial traditional immune booster in human peripheral blood mononuclear cells. Vol, 16, pp. 300, 2016.

[10] Coronado, E, Sánchez, J, López, J, Robles, R, Velázquez, C, Sánchez, D, Garibay, A. Journal of Ethnopharmacology. Antimycobacterial activity of medicinal plants used by the Mayo people of Sonora, Mexico. Vol, 190, pp. 106–115, 2016.

[11] Escobar, M., Aristizábal, G. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Fluorometric assay for cell proliferation in human tumor cell lines application. Vol, 17, pp. 173-180, 2010.

[12] Alamgir, M, Uddin, S. Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents. Vol, -, pp. 227-244, 2012.

- [13] Mukherjee, P, Nema, N, Bhadra, S, Mukherjee, D, Braga, F, Matsabisa, M. Indian Journal of Traditional Knowledge. Immunomodulatory leads from medicinal plants. Vol, 13, pp.235-256, 2012.
- [14] Mlungisi, N, Nceba, G. BMC Complementary and Alternative Medicine. Evaluation of the immunomodulatory effects of a South African commercial traditional immune booster in human peripheral blood mononuclear cells. Vol, 16, pp. 300, 2016.
- [15] Barak, V, Birkenfeld, S, Halperin, T, Kalickman, I. Israel Medical Association Journal. The Effect of Herbal Remedies on the Production of Human Inflammatory and Anti-inflammatory Cytokines. Vol, 4, pp. 919-921, 2002.
- [16] López, J, Kuceková, Z, Humpolíček, P, Miček, J, Sáha, P. Molecules. Polyphenolic Extracts of Edible Flowers Incorporated onto Atelocollagen Matrices and Their Effect on Cell Viability. Vol, 18, pp. 13435-13445, 2013.
- [17] Denzler, K, Waters, R, Jacobs, B, Rochon, Y, Langeland, O. Plos One. Regulation of Inflammatory Gene Expression in PBMC's by Immunostimulatory Botanicals. Vol, 5, pp. 1-15, 2010.
- [18] Marzouk, M, Moharram, F, Haggag, E, Ibrahim, M, Badary, O. Phytotherapy Research. Antioxidant Flavonol Glycosides from *Schinus molle*. Vol, 20, pp. 200–205, 2006.
- [19] Fedel, L, Kassuya, C, Auharek, S, Formagio, A, Cardoso, C, Mauro, M, Cunha, A, Monreal, A, Vieiraf, M, Oliveiraa, R. Revista Brasileira Farmacognosia. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and

wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. Vol, 24, pp. 565-575, 2014.

[20] Taylor, A, Oyedeji, O, Aremu, I, Oyemitan, E, Gwebu, A, Oyedeji, B, Nkeh-chungag, B. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. Assessment of the analgesic, anti-inflammatory and sedative effects of the dichloromethanol extract of *Schinus molle* L. Vol, 20, pp. 372-380, 2016.

[21] Kim, J, Um, S, Woo, J, Kim, J, Kim, H, Jang, K, Kang, S, Lim, B, Kang, I, Choue, R, Cho, Y. Life Sciences. Comparative effect of seeds of *Rhynchosia volubilis* and soybean on MG-63 human osteoblastic cell proliferation and estrogenicity. Vol, 78, pp. 30 – 40, 2005.

[22] Hong, S, Sim, M, Young, C. Toxicological research. Melanogenesis-Promoting Effects of *Rhynchosia nulubilis* and *Rhynchosia volubilis* Ethanol Extracts in Melan-a Cells. Vol, 32, pp. 141-147, 2016.

[23] Wieland, E, Shipkova, M. Clinical Biochemistry. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. Vol, 49, pp. 347–354, 2016.

Legends for Figures

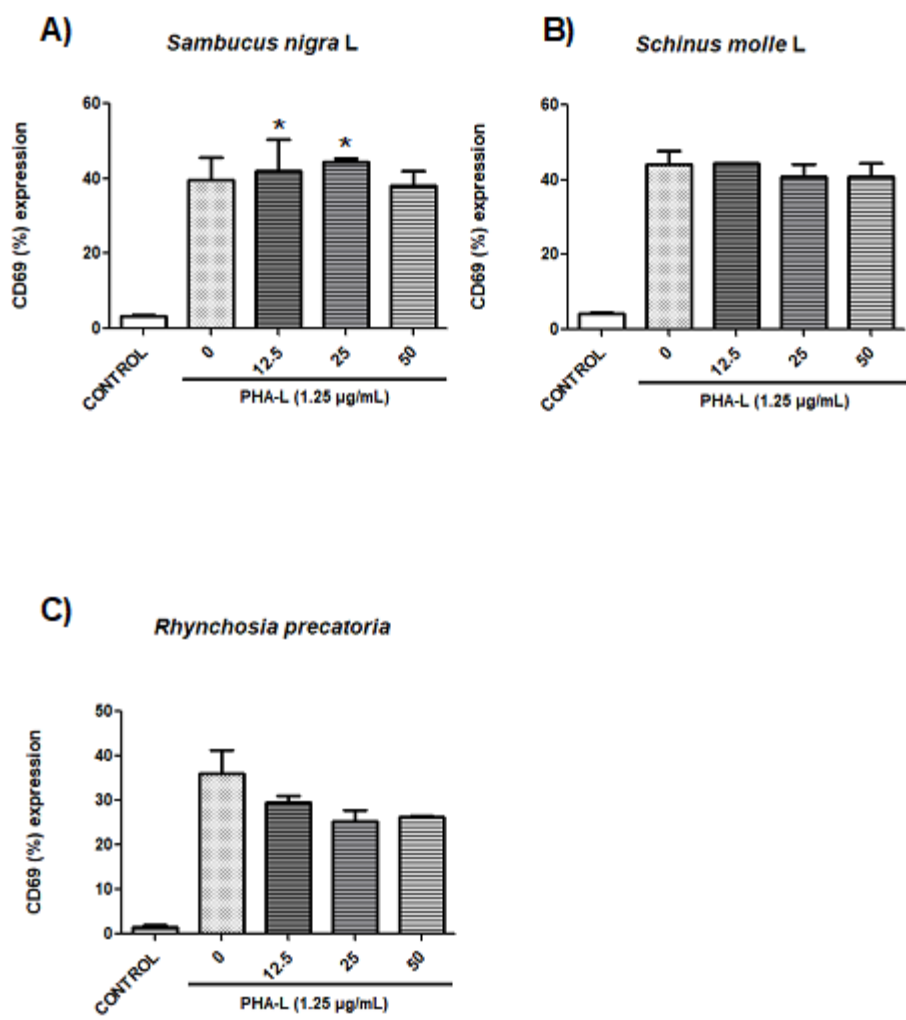
Table I. Effect of the treatment with: A) *S. nigra* L, B) *S. molle* L and C) *Rhynchosia precatória* aqueous extract on cellular viability of PBMC's, evaluated by resazurin oxide-reduction assay. Values expressed in mean \pm SD (n=3). Statistical significance based on comparison with cells stimulated with (PHA-L), *p \leq 0.05.

Figure 1. CD69 (%) expression of PBMC's exposed to aqueous extracts of A) *Sambucus nigra* L, B) *Schinus molle* L and C) *Rhynchosia precatória*. Values expressed in mean \pm SD (n=3). Statistical significance based on comparison with (PHA-L), *p \leq 0.05.

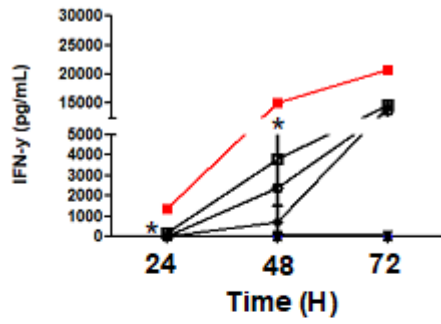
Figure 2. Production of IFN- γ produced for PBMC's exposed to aqueous extract of A) *S. nigra* L, B) *Schinus molle* L and C) *R. precatória*. Values expressed in mean \pm SD (n=3). Statistical significance based on comparison with (PHA-L), *p \leq 0.05.

Figure 3. Production of NO produced for PBMC's exposed to aqueous extract of A) *S. nigra* L, B) *Schinus molle* L and C) *R. precatória*. Values expressed in mean \pm SD (n=3). Statistical significance based on comparison with (PHA-L), *p \leq 0.05.

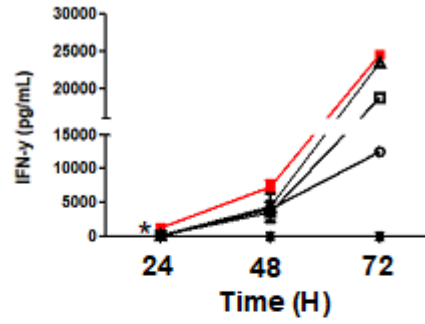
PLANT	CONCENTRATION ($\mu\text{g/mL}$)		
<i>Sambucus nigra</i>	50	25	12.5
L [$\mu\text{g/mL}$]			
Extract	102 \pm 8.92	104 \pm 1.46	102 \pm 6.60
Extract + PHA-L	107 \pm 7.61	112 \pm 3.86*	110 \pm 7.33*
<i>Schinus molle</i>	50	25	12.5
L [$\mu\text{g/mL}$]			
Extract	99 \pm 4.45	99 \pm 4.58	98 \pm 3.49
Extract + PHA-L	99 \pm 2.04	99 \pm 2.41	96 \pm 1.90
<i>Rhynchosia</i>	50	25	12.5
<i>precatoria</i>			
L [$\mu\text{g/mL}$]			
Extract	92 \pm 6.54	95 \pm 4.10	92 \pm 1.90
Extract + PHA-L	116 \pm 9.24*	118 \pm 3.10*	115 \pm 4.47*
CONTROL	100 \pm 0		
PHA-L	107 \pm 10.57		
L [1.25 $\mu\text{g/mL}$]			



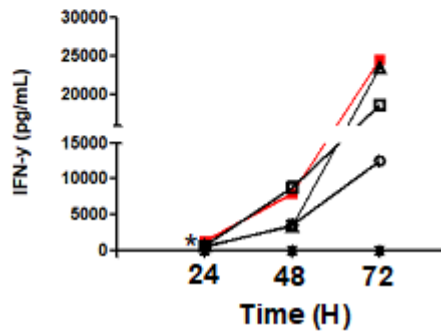
A) *Sambucus nigra* L (PIA)



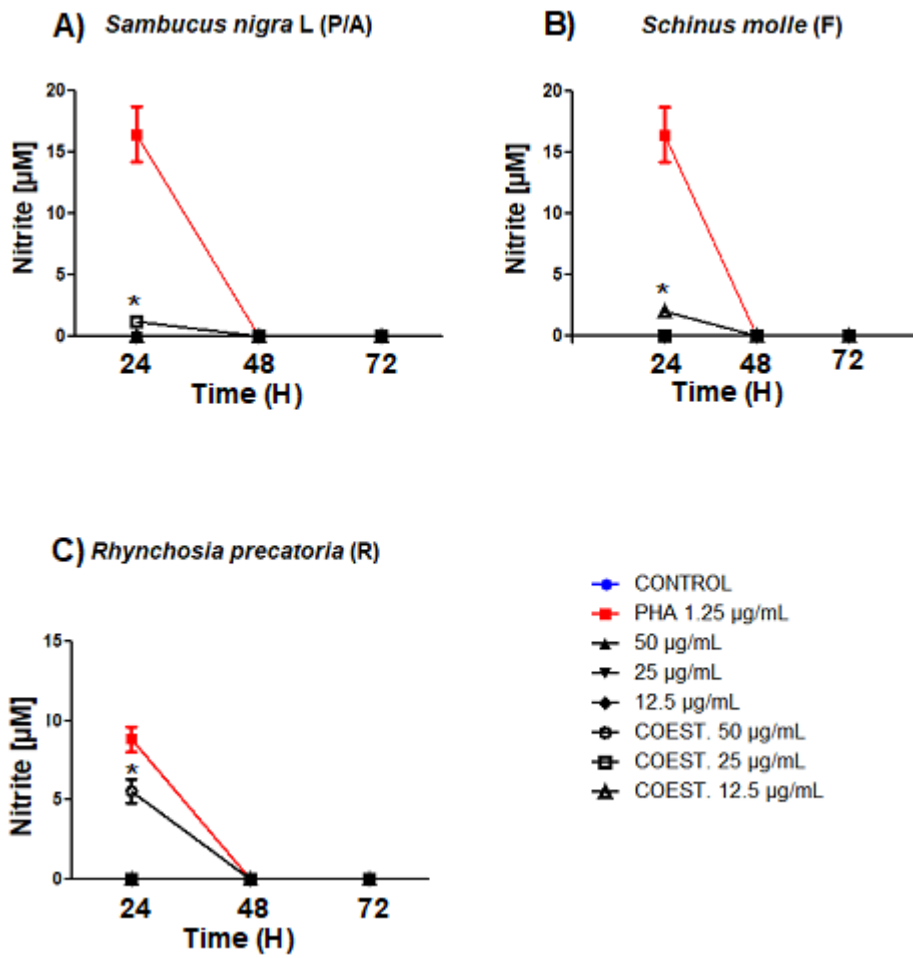
B) *Schinus molle* (F)



C) *Rhynchosia precatorea* (R)



- CONTROL
- PHA-L 1.25 $\mu\text{g/mL}$
- ▲ 50 $\mu\text{g/mL}$
- ▼ 25 $\mu\text{g/mL}$
- ◆ 12.5 $\mu\text{g/mL}$
- COEST. 50 $\mu\text{g/mL}$
- COEST. 25 $\mu\text{g/mL}$
- ▲ COEST. 12.5 $\mu\text{g/mL}$



Affiliations

¹Laboratorio Microbiología e Inmunología, Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6, 83304. Hermosillo Sonora, México.

²Maestría en Ciencias de la Salud. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales, Colonia Centro, 83000. Hermosillo, Sonora, México.

³Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales, Colonia Centro, 83000. Hermosillo, Sonora, México.

Author for correspondence*

Adriana Garibay-Escobar, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora 83000, México.

E-mail: agaribay@guayacan.uson.mx.

Telephone number: +52 (662) 259-21-63, +52 (662) 259-21-64.

Fax number: +52 (662) 259-21-63