



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE EXTRACTOS Y  
FRACCIONES DEL FRUTO DE PAPACHE”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**LIC. MINERVA ALICIA RAMÍREZ MILLÁN**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTORES

**DRA. GABRIELA LÓPEZ ANGULO**

**DR. FRANCISCO DELGADO VARGAS**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A NOVIEMBRE DE 2023.



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## **UAS-Dirección General de Bibliotecas**

### **Repositorio Institucional Buelna**

#### **Restricciones de uso**

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”. Ambos laboratorios pertenecen a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Gabriela López Angulo y del Dr. Francisco Delgado Vargas, además de contar con la asesoría del Dr. Geovanni Romero Quintana, Dr. Rodolfo Bernal Reynaga y Dr. Julio Montes Avila. Esta investigación fue financiada por la Universidad Autónoma de Sinaloa a través del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) (PRO\_A2\_011) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (A1-S-32946). Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de maestría otorgada por CONACYT.

## DEDICATORIA

*A mis padres, por ser la motivación más grande en mi vida.*

*Dedico esta tesis a todas aquellas personas que en algún momento se han sentido insuficientes o que no pueden más; que sepan que no existe adversidad en la vida que no se pueda enfrentar, y que ninguna batalla está perdida hasta que dejas de intentarlo.*

*“Nuestros peores miedos se encuentran en la anticipación”*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS); en especial a la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, por permitirme ser parte de su programa y por la oportunidad de crecer académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto.

Al Laboratorio de Química de Productos Naturales (LPQN) y a la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra Kaethe Willms” por permitirme realizar esta investigación en sus instalaciones.

A los protagonistas de este proyecto: los ratones, por prestar su vida a favor de la ciencia.

A mis padres Minerva Millán Inda y Luis Alfredo Ramírez Mendoza, siempre lo he dicho y lo seguiré diciendo, cada logro es para y por ustedes, son mi motor de vida. A mi familia Ramírez Millán por su apoyo incondicional desde lejos y todo su cariño.

A mis directores de tesis, la Dra. Gabriela López Angulo y el Dr. Francisco Delgado Vargas por permitirme nuevamente realizar este proyecto bajo su asesoría. Gracias por el tiempo brindado, la paciencia, el apoyo, asesorías y la confianza de poder discutir y aclarar dudas. Para mí es un honor ser alumna de personas que tanto admiro.

A mi asesor el Dr. José Geovanni Romero Quintana por siempre tener la mejor disposición de compartir su conocimiento en esta materia tan compleja, por sus consejos y por la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Bernal Reynaga y Dr. Julio Montes Ávila por su disposición en la revisión del escrito; comentarios y sugerencias a la mejora del proyecto.

A la MC Maritza Zatarain Irigoyen por su gran apoyo y disposición en los ensayos *in vivo* y en la representación de datos estadísticos.

A mis compañeros del LQPN. A mi gran amigo, el Dr. Mario Leyva por brindarme su apoyo desde el día uno en este camino de la ciencia. A Fabricio Marín por su valiosa amistad y apoyo. A Fabiola, Katia, Kimberly, Yudith, Agustín y Eleazar por los consejos, experiencias, su amistad y por siempre sacarme una sonrisa en momentos difíciles y de estrés. A mis alumnas Pabela y Yadira por su ayuda en los ensayos y gran compañerismo. A Enrique, Alma, Antonio, Abraham y Alejandra por estar.

A mis hermanas de corazón, Susana Ramírez, Amaury Gutiérrez, Karla Astorga y Karla Ureta por distraerme, apoyarme, consentirme y brindarme su amor en cada momento de esta etapa y de toda la vida. A mis reales: Erandy, Marco, Ana, Alejandro, Jaime, Ramón y Alberto por siempre procurarme y brindarme su valiosa amistad.

A mi psicólogo Elihut Aceves por darme las herramientas para poder sobrellevar el estrés y los momentos de dificultad.

A mi gatito Bruno por acompañarme en cada noche de desvelo y demostrarme el valioso amor que te puede dar un ser tan chiquito y gordito.

Finalmente, a mis hermanos de maestría: Leslie Peinado, Edgar Estrada y Ricardo Mendoza. Desde las clases en línea se ganaron un lugar en mi vida; gracias por el apoyo, las pláticas interminables y por estar cuando nadie más estuvo. Sin ustedes este camino no hubiera sido tan gratificante.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XV
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Sistema inmunológico .....	6
4.2. Órganos inmunitarios .....	9
4.3. Componentes celulares y moleculares de la respuesta inmunológica...	11
4.4. Inmunomoduladores.....	18
4.5. Plantas con actividad inmunomoduladora .....	21
4.6. Familia Rubiaceae .....	25
4.6.1. Características generales .....	26
4.7. <i>Randia echinocarpa</i> .....	26
4.7.1 Características generales .....	26
4.7.2. Distribución geográfica.....	28
4.7.3. Composición química de <i>Randia echinocarpa</i> .....	28
4.7.4. Usos etnofarmacológicos de plantas de <i>Randia</i> spp.....	31
4.8. Antecedentes.....	32
4.8.1. Actividades biológicas de especies de <i>Randia</i> y de <i>Randia echinocarpa</i>	
32	
V. JUSTIFICACIÓN .....	34
VI. HIPÓTESIS .....	35

<b>VII. OBJETIVOS</b> .....	36
<b>7.3. Objetivo general</b> .....	36
<b>7.4. Objetivos específicos</b> .....	36
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
<b>8.1. Materiales</b> .....	37
<b>8.1.1. Material vegetal</b> .....	37
<b>8.1.2. Animales de laboratorio</b> .....	37
<b>8.1.3. Reactivos</b> .....	37
<b>8.2. Metodología</b> .....	38
<b>8.2.1 Preparación de harina de papache (<i>R. echinocarpa</i>)</b> .....	38
<b>8.2.2. Obtención de extractos y fracciones de papache</b> .....	38
8.2.2.1. Obtención de fracciones por el método de partición líquido-líquido ...	38
8.2.2.2. Obtención de extractos por el método secuencial .....	39
<b>8.2.3. Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i></b> .....	41
8.2.3.1. Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos ..	41
<b>8.2.4. Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i></b> .....	43
8.2.4.1 Efecto de la administración oral de las fracciones de papache .....	44
8.2.4.1.1 <i>Pesos corporales e índice de bazo e hígado</i> .....	44
8.2.4.1.2 <i>Medición de la proliferación de esplenocitos</i> .....	45
8.2.4.1.3 <i>Parámetros hematológicos y bioquímicos</i> .....	45
8.2.4.1.3.1 <i>Determinación de enzimas séricas</i> .....	45
8.2.4.1.3.2 <i>Determinación de urea y creatinina</i> .....	46
8.2.4.2 Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad celular de ratones inmunocomprometidos .....	47
8.2.4.2.1 <i>Pesos corporales e índice de timo, bazo e hígado</i> .....	50

8.2.4.2.2	Conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas .....	50
8.2.4.2.3	Determinación de citocinas en suero .....	50
8.2.4.2.4	Medición de la proliferación de esplenocitos.....	51
8.2.4.2.5	Medición de la actividad de MDA.....	51
<b>8.3</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>52</b>
<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>9.1.</b>	<b>Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>9.1.1.</b>	<b>Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos</b>	<b>56</b>
<b>9.2.</b>	<b>Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>9.2.1.</b>	<b>Efecto de la administración oral de las fracciones de papache .....</b>	<b>58</b>
9.2.1.1.	Pesos corporales e índice de bazo e hígado.....	58
9.2.1.2.	Medición de la proliferación de esplenocitos .....	58
9.2.1.3.	Parámetros hematológicos y bioquímicos .....	58
<b>9.2.2.</b>	<b>Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad celular de ratones inmunocomprometidos.....</b>	<b>62</b>
9.2.2.1.	Pesos corporales e índice de timo, bazo e hígado .....	62
9.2.2.2.	Conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas .....	68
9.2.2.3.	Medición de la proliferación de esplenocitos .....	74
9.2.2.4.	Determinación de citocinas en suero.....	74
9.2.2.5.	Medición de la actividad de MDA .....	80
<b>X.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
<b>10.1.</b>	<b>Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>10.1.1.</b>	<b>Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos</b>	
	83	
<b>10.2.</b>	<b>Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i> .....</b>	<b>87</b>

<b>10.2.1. Efecto de la administración oral de las fracciones de papache .....</b>	<b>87</b>
10.2.1.1. Pesos corporales e índice de bazo e hígado .....	87
10.2.1.2. Medición de la proliferación de esplenocitos .....	88
10.2.1.3. Parámetros hematológicos y bioquímicos .....	90
<b>10.2.2. Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad     celular de ratones inmunocomprometidos .....</b>	<b>91</b>
10.2.2.1. Pesos corporales e índice de timo, bazo e hígado .....	91
10.2.2.2. Conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas .....	93
10.2.2.3. Medición de la proliferación de esplenocitos .....	95
10.2.2.4. Determinación de citocinas en suero .....	96
10.2.2.5. Medición de la actividad de MDA .....	98
<b>XI.    CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>11.3. Conclusión general .....</b>	<b>99</b>
<b>11.4. Conclusiones específicas .....</b>	<b>99</b>
<b>XII.    PERSPECTIVAS DEL PROYECTO .....</b>	<b>102</b>
<b>XIII.    BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>103</b>
<b>XIV.    SIGLAS Y ABREVIACIONES .....</b>	<b>126</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Ejemplo representativo de compuestos químicos con actividad inmunomoduladora	24
<b>2</b>	Planta de <i>Randia echinocarpa</i>	29
<b>3</b>	Fruto de <i>R. echinocarpa</i>	30
<b>4</b>	Diagrama para la obtención de las fracciones de <i>R. echinocarpa</i> a partir del extracto metanólico	40
<b>5</b>	Diagrama para la obtención de extractos de la pulpa del fruto de <i>R. echinocarpa</i> por el método secuencial	42
<b>6</b>	Línea del tiempo para la evaluación de la actividad inmunomoduladora en el modelo de ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida (Ci)	49
<b>7</b>	Efecto del tratamiento con los extractos y fracciones de <i>R. echinocarpa</i> en la proliferación <i>in vitro</i> de esplenocitos	57
<b>8</b>	Efecto sobre el índice de bazo de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.)	59
<b>9</b>	Efecto sobre la proliferación de esplenocitos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.)	61
<b>10</b>	Efecto de la administración oral, a ratones inmunocomprometidos con ciclofosfamida (Ci) de la fracción hexánica a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y	65

FH-400 mg/kg p.c.) sobre el peso corporal de ratones durante el tratamiento.

- |           |   |    |
|-----------|---|----|
| <b>11</b> | Efecto sobre el índice de los órganos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)         | 69 |
| <b>12</b> | Efecto sobre la proliferación de esplenocitos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.) | 78 |

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Características de la inmunidad innata y adaptativa	7
<b>2</b>	Clasificación básica de las citocinas	10
<b>3</b>	Células involucradas en la inmunidad y sus funciones	12
<b>4</b>	Descripción general de las propiedades de los subgrupos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y sus contribuciones en enfermedades inmunitarias	16
<b>5</b>	Mecanismo de acción y efectos secundarios de fármacos inmunomoduladores	20
<b>6</b>	Plantas con actividad inmunomoduladora	22
<b>7</b>	Clasificación taxonómica del fruto del papache	27
<b>8</b>	Esquema de tratamiento de los ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida (Ci)	48
<b>9</b>	Análisis estadístico	54
<b>10</b>	Efecto sobre la ganancia de peso y el índice de los órganos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.)	60
<b>11</b>	Efecto en parámetros hematológicos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.)	63
<b>12</b>	Efecto en parámetros bioquímicos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.)	64

<b>13</b>	Efecto sobre el índice de los órganos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)	66
<b>14</b>	Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores del índice de timo de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)	67
<b>15</b>	Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores del índice de bazo de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)	70
<b>16</b>	Efecto en parámetros hematológicos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)	71
<b>17</b>	Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de glóbulos blancos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)	72
<b>18</b>	Efecto en el conteo diferencial de glóbulos blancos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)	73
<b>19</b>	Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de linfocitos de ratones tratados por vía oral con la fracción	75

hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

- |           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>20</b> | Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de monocitos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)               | 76 |
| <b>21</b> | Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de neutrófilos segmentados de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.) | 77 |
| <b>22</b> | Efecto sobre la expresión de citocinas de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)   | 79 |
| <b>23</b> | Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de IL-6 de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)                    | 81 |
| <b>24</b> | Efecto de biomarcador de estrés oxidativo (MDA) de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.)                                  | 82 |

## I. RESUMEN

El buen funcionamiento del sistema inmunológico es indispensable para la homeostasis del organismo. En este sentido, los agentes inmunomoduladores son importantes en la prevención/tratamiento de enfermedades. Los inmunomoduladores comerciales presentan efectos secundarios y se requiere de nuevos agentes más eficientes. Las plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos y el fruto de *Randia echinocarpa* es utilizado en medicina tradicional contra diferentes padecimientos y se ha demostrado que presenta actividad antioxidante, antimutagénica y antiinflamatoria. De esta manera, el objetivo de este estudio fue comprobar la actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* de extractos y fracciones del fruto de papache (*R. echinocarpa*) y seleccionar la muestra más activa. Los extractos (hexánico, EH; clorofórmico, EC; en acetato de etilo, EAE y agua, EA) fueron obtenidos por el método secuencial y las fracciones (FH, FC, FAE y FA) por partición líquido-líquido. La actividad inmunomoduladora se evaluó *in vitro* e *in vivo*. En el ensayo *in vivo* se utilizaron dos modelos: (1) ratones normales tratados por 14 días con 100 mg/kg p.c.; (2) ratones inmunocomprometidos (dañados con ciclofosfamida) tratados por 10 días con la muestra más activa a 100, 200 y 400 mg/kg p.c. En ambos estudios se evaluaron peso corporal, índice de bazo, timo e hígado, parámetros hematológicos, bioquímicos, medición de la proliferación de esplenocitos, determinación de citocinas (IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, e IL-4) y MDA. Al contrastar extractos y fracciones, la fracción hexánica (FH) exhibió la mayor proliferación de esplenocitos *in vitro* (46.92-15.68%), obteniendo valores estadísticamente similares al control concanavalina A (55.21%), y en estudios posteriores sólo se analizaron las fracciones. En el ensayo *in vivo* con ratones normales, la FH, FC, FAE y FA mostraron actividad inmunomoduladora, destacando la FH que también indujo un aumento en el índice de bazo. En general, los tratamientos no afectaron el peso corporal, índice de hígado y parámetros hematológicos y bioquímicos de los ratones. En el modelo inmunocomprometido, el efecto negativo de la ciclofosfamida fue atenuado al tratar los ratones con FH: peso corporal (FH-100, FH-200 y FH-400), índice de timo (FH-100), índice de bazo (FH-200 y FH-400), parámetros hematológicos (FH-200) y proliferación de esplenocitos (FH-100 y FH-200). En este modelo, los ratones tratados con FH presentaron valores de TNF- $\alpha$  similares al control sano, mientras que el mejor resultado para IL-6 se registró con FH-100. En relación con el daño oxidativo (niveles de MDA), los tratamientos con la FH fueron insuficientes para revertir el efecto de la ciclofosfamida. Estos resultados demuestran la actividad inmunoestimuladora en ratones sanos e inmunosuprimidos de la FH de *Randia echinocarpa*.

**(Palabras clave:** *Randia echinocarpa*, inmunomodulación, fracción hexánica).

## II. ABSTRACT

The proper functioning of the immune system is vital for maintaining an organism's homeostasis. In this sense, immunomodulator agents are essential in preventing and treating diseases. However, commercial immunomodulators induce secondary adverse effects, necessitating the search for more efficient alternatives. Plants are an important source of bioactive compounds, and the fruit of *Randia echinocarpa*, used in traditional medicine against various illnesses, shows antioxidant, antimutagenic, and anti-inflammatory properties. This study aimed to verify the *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of *R. echinocarpa* fruit extracts and fractions for choosing the most active sample. The extracts (hexanic, HE; chloroformic, CE, in ethyl acetate, EAE, and water, WE) were obtained with the sequential method, and the fractions (HF, CF, EAF, and WF) by liquid-liquid partition. The immunomodulatory activity was evaluated *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* assays involved two models: (1) healthy mice treated for 14 days with 100 mg/kg b.w.; and (2) immunocompromised mice (treated with cyclophosphamide) treated for ten days with the most active sample at 100, 200 and 400 mg/kg b.w. The parameters evaluated in the *in vivo* studies were the following: body weight; index of spleen, thymus, and liver; hematological and biochemical parameters; splenocyte proliferation; cytokine levels (IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, e IL-4); and MDA. Comparative analysis of extracts and fractions showed that the hexanic fraction (HF) exhibited the highest *in vitro* splenocyte proliferation (46.92-15.68%) with statistically similar values to concanavalin A control (55.21%). Then, only fractions were analyzed in further studies. In healthy mice, the HF, CF, EAF, and WF showed immunomodulatory activity, highlighting the HF, which also increased the spleen index. In general, the treatments did not significantly affect body weight, liver index, hematologic and biochemical parameters in mice. In immunocompromised mice, the negative effect of the cyclophosphamide was attenuated by treatment with HF: body weight (HF-100, HF-200, and HF-400), thymus index (HF-100), spleen index (HF-200 and HF-400), hematologic parameters (HF-200), splenocyte proliferation (HF-100 and HF-200). In this model, the TNF- $\alpha$  levels in mice treated with HF were comparable with those in the healthy control group, while the best result for IL-6 was registered with HF-100. However, HF treatments were insufficient to reverse the oxidative damage (MDA levels) caused by cyclophosphamide. These findings demonstrate the immunostimulatory activity in healthy and immunosuppressed mice of the HF from the *Randia echinocarpa* fruit.

**(Key words:** *Randia echinocarpa*, immunomodulation, hexanic fraction).

### III. INTRODUCCIÓN

El ser humano está expuesto constantemente a una gran variedad de microorganismos patógenos (bacterias, hongos y parásitos). En respuesta a estos agentes/condiciones patogénicas, los animales cuentan con el sistema inmunológico para mantenerse sanos. Sin embargo, existen situaciones en las que el sistema inmunitario se encuentra afectado o comprometido, incrementando la susceptibilidad del organismo a la enfermedad (Castillo-Mompié y col., 2021).

Los inmunomoduladores son sustancias capaces de modular la respuesta inmunitaria y su uso en la terapia de diversas afectaciones ha aumentado en los últimos años (Huber y col., 2018). Sin embargo, gran parte de los fármacos inmunomoduladores disponibles comercialmente generan efectos adversos graves, por lo tanto, es necesario la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos capaces de inducir un cambio en la respuesta inmunitaria; al respecto, se ha demostrado que compuestos químicos provenientes de productos naturales son capaces de generar un efecto en la respuesta inmunitaria (Nair y col., 2019; Ali-Reza y col., 2023).

Las plantas son consideradas el primer eslabón de la cadena alimenticia y son el principal reservorio de compuestos bioactivos, es por ello que continúan siendo utilizadas como agentes preventivos y curativos en la medicina tradicional (Sen y Chakraborty, 2017). Actualmente, se estima que el 80% de la población mexicana usa medicina tradicional; sin embargo, de las 4500 plantas medicinales registradas, únicamente para el 5% se ha reportado su actividad farmacológica (Alamilla y Neyra, 2020). Es por ello que se requieren de estudios que demuestren la actividad biológica

de un gran número de plantas usadas como medicina tradicional y en particular de la actividad inmunomoduladora.

El papache (*Randia echinocarpa* Moc. & Sessé ex DC.) es una planta nativa de Sinaloa, donde se utiliza como alimento y para tratar diversas enfermedades (e.g., cáncer, malaria, diabetes, padecimientos renales, pulmonares, circulatorios, incluso gastrointestinales) (Bye y col., 1991). La amplia gama de usos pudiera estar relacionada a un mecanismo general de acción probablemente asociado a propiedades inmunomoduladoras. En lo que respecta a los estudios científicos del fruto de papache, éste es una buena fuente de fenólicos, taninos y melaninas. Asimismo, componentes del fruto presentan actividades biológicas de relevancia para la salud del hombre (e.g., antioxidante, antimutagénica y anticancerígenas). Específicamente, las melaninas insolubles y las melaninas solubles han mostrado actividades inmunomoduladoras, ambos tipos de melaninas incrementan la proliferación de esplenocitos y se ha demostrado que las melaninas solubles activan los linfocitos  $\gamma\delta$  de los ganglios linfáticos mesentéricos (Montes-Avila y col., 2018; Gil-Avilés y col., 2019). Recientemente, se demostró que extractos (extracción secuencial) y fracciones (partición líquido-líquido) del fruto de *R. echinocarpa* obtenidas con hexano y cloroformo incrementan la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, siendo los extractos los que muestran el mayor efecto (Pinto-González, 2022). A su vez, se demostró que la fracción hexánica y en acetato de etilo eran capaces de ejercer actividad antiinflamatoria en edema de pata de ratón inducido por carragenina (Zatarain-Irigoyen, 2022). Estos dos estudios registraron diferencias en la actividad biológica entre extractos y fracciones del fruto de papache obtenidos con solventes de

polaridad similar. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue demostrar las propiedades inmunomoduladoras *in vitro* e *in vivo* de extractos/fracciones del fruto de papache y establecer el método de extracción que genera los mejores resultados. Al respecto, el conocimiento generado en la presente investigación será útil para el diseño e implementación de estrategias hacia el aprovechamiento sostenible de esta planta nativa de Sinaloa.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Sistema inmunológico

El sistema inmunológico es un mecanismo de defensa corporal para el reconocimiento y eliminación de una gran variedad de agentes extraños e indeseables, en donde participan una amplia diversidad de células y moléculas (Shantilal y col., 2018). Esta defensa se origina por respuestas secuenciales y coordinadas que se denominan inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y está mediada por mecanismos que existen inclusive antes de generarse la infección (como barreras anatómicas y fisiológicas), por lo tanto, es una respuesta rápida y poco específica que no genera memoria inmunológica (Abbas y col., 2018; Berry y col., 2020). El sistema innato está constituido por una gran variedad de células como mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). Sin embargo, si la infección persiste se desencadena la respuesta adaptativa, la cual difiere de la innata en que es específica y genera memoria inmunológica (Abbas y col., 2018). Los componentes celulares principales de la inmunidad adaptativa son los linfocitos B y T (**Cuadro 1**) (Shantilal y col., 2018).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, inmunidad humoral e inmunidad celular, que inducen diferentes componentes del sistema inmunitario. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa hacia microorganismos extracelulares y sus toxinas y es mediada por anticuerpos producidos por linfocitos B presentes en la sangre y en fluidos corporales; sus principales funciones son neutralización, opsonización y activación de complemento.

**Cuadro 1.** Características de la inmunidad innata y adaptiva.

<b>Función/especificación</b>	<b>Innata</b>	<b>Adaptativa</b>
Tiempo de respuesta	Respuesta instantánea en la exposición inicial	El tiempo transcurrido entre la primera estimulación y reacción máxima
Especificidad	Frente a moléculas compartidas por grupos de microbios y moléculas relacionadas producidas por células del anfitrión	Frente a antígenos microbianos y no microbianos
Diversidad	Limitada	Muy grande
Memoria	Ninguna	Si
Barreras celulares y químicas	Piel, epitelio de mucosa; moléculas antimicrobianas	Linfocitos en epitelio; anticuerpos secretados en superficies epiteliales
Proteínas sanguíneas	Complemento, otros	Anticuerpos
Células	Leucocitos, macrófagos linfocitos citolíticos naturales (NK), células linfocíticas innatas	Linfocitos T, B y antígenos

Adaptado de Abbas y col. (2018) y Sangwan y col. (2022).

Por otro lado, la inmunidad celular es mediada por linfocitos T que se encargan de atacar principalmente infecciones ocasionadas por microbios intracelulares (e.g., virus y bacterias) capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de fagocitos y otras células. Sin embargo, algunos linfocitos T también intervienen en la erradicación de microbios extracelulares, estimulando a los linfocitos B en la producción de anticuerpos (Abbas y col., 2018).

Por otro lado, la inmunidad protectora generada hacia algún microorganismo, dependerá de la respuesta del anfitrión hacia el microbio o de la transferencia de anticuerpos que defienden contra el microbio (Punt y col., 2018). El tipo de inmunidad que se genera debido a la exposición de un antígeno extraño se denomina inmunidad activa, dado que la persona inmunizada desempeña una función activa en la respuesta frente al antígeno. En contraparte, una persona también puede adquirir la inmunidad a través de la transferencia de suero o de linfocitos desde un individuo dotado de una inmunidad específica, lo cual genera inmunidad sin haber estado en contacto con el antígeno, denominada inmunidad pasiva (Abbas y col., 2018). Este tipo de inmunidad puede ser utilizada como prevención para fortalecer el sistema inmunológico de una persona inmunocomprometida o aquellas que van a estar expuestas a un microbio en particular, sin embargo, su efecto es breve y limitado (Abbas y col., 2018; Punt y col., 2018).

Existen un grupo de proteínas que regulan y coordinan diferentes procesos de las células de las inmunidades innata y adaptativa denominadas citocinas, éstas son moléculas de bajo peso molecular, poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones (Abbas y col., 2018). La nomenclatura de las citocinas es

inconsistente; sin embargo, estas se clasifican en 6 familias (**Cuadro 2**) (Kupsa y col., 2012):

1. Interleucinas (ILs).
2. Quimiocinas (C, CC, CX)
3. Factor transformador de la diferenciación celular (TGF).
4. Factores estimuladores de colonias (FSC).
5. Factores de necrosis tumoral (TNF).
6. Interferones (IFs).

#### **4.2. Órganos inmunitarios**

Los tejidos linfáticos se dividen en dos categorías: (1) órganos generadores, también conocidos como órganos linfáticos primarios o centrales; y (2) órganos periféricos, también denominados como órganos linfáticos secundarios. Dentro de los órganos linfáticos primarios se encuentran la médula ósea y el timo (Abbas y col., 2018). La hematopoyesis en la médula ósea genera todas las células del sistema inmunológico (e.g., glóbulos rojos, plaquetas, granulocitos, timocitos y células B), las cuales se diferencian en células maduras o en precursores de células que realizan su función en la sangre y pueden recircular entre la médula ósea y otros tejidos. Por otro lado, las células T inmaduras abandonan la médula ósea y migran hacia el timo para completar su proceso de maduración, donde las células que son beneficiosas para el sistema inmunológico se conservan (selección positiva), mientras que aquellas que podrían desencadenar respuestas autoinmunes dañinas son eliminadas (selección negativa). Posteriormente, las células T maduras se liberan en el torrente sanguíneo (Punt y col., 2018; Shantilal y col., 2018). Los órganos linfáticos secundarios son los

**Cuadro 2.** Clasificación básica de las citocinas.

<b>Familia</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Funciones fisiológicas</b>
Interleucinas	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22 e IL-23	Estimular la hematopoyesis, promover o inhibir la inflamación y regular la cooperación celular
Quimiocinas	$\alpha$ : CXC, $\beta$ : CC y $\gamma$ : C, $\delta$ : CX <sub>3</sub> C	Regular la migración de monocitos, granulocitos y linfocitos, promover la angiogénesis y la inflamación
Factor transformador de la diferenciación celular	TGF- $\beta$	Estimular el crecimiento de fibroblastos y matriz extracelular
Factores estimuladores de colonias	G-CSF, GM-CSF, M-CSF	Estimular la proliferación y maduración de los precursores mieloides
Factores de necrosis tumoral	TNF- $\alpha$ y TNF- $\beta$	Pirógeno proinflamatorio, activa la inmunidad no específica y puede causar apoptosis
Interferones	Tipo I: IFN- $\alpha$ , $\beta$ , $\omega$ y tipo II: IFN- $\gamma$	Efecto antiproliferativo, actividad antitumoral y actúa en la respuesta contra patógenos intracelulares

Modificado de Kupsa y col. (2012).

ganglios linfáticos, el bazo, el sistema inmunitario cutáneo y mucoso; aquí se generan funciones como el trasplante de antígenos y de linfocitos vírgenes, iniciándose respuestas inmunitarias adaptativas (Abbas y col., 2018; Wahyuningsih y col., 2018).

### **4.3. Componentes celulares y moleculares de la respuesta inmunológica**

El sistema inmunitario enfrenta diversos desafíos con la finalidad de generar respuestas de protección contra microorganismos infecciosos (Abbas y col., 2018). Al ingresar un patógeno al cuerpo, el tejido epitelial es la primera barrera para impedir el daño generado por el patógeno y emplea diferentes sustancias químicas antimicrobianas (*e.g.*, mucinas, defensinas y catelicidinas) generadas en las superficies epiteliales (Punt y col., 2018). La respuesta innata reconoce a microbios (*e.g.*, virus, bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos) debido a que expresan sustancias específicas conocidas como patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés). Este mecanismo también reconoce moléculas llamadas patrones moleculares asociados a la lesión (DAMP, por sus siglas en inglés) que producen o liberan células dañadas como resultado de infecciones, toxinas químicas, quemaduras, traumatismos o reducción del riego sanguíneo (Abbas y col., 2018; Punt y col., 2018). Diferentes componentes celulares que participan en el control de infecciones se describen en el **Cuadro 3** y en los siguientes párrafos.

Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de inflamación, actuando en procesos eferentes (fagocitosis y desgranulación) y aferentes (liberación de moléculas inmunomoduladoras), una vez realizada su función biológica estos mueren

**Cuadro 3.** Células involucradas en la inmunidad y sus funciones.

<b>Célula inmunitaria</b>	<b>Características</b>	<b>Función</b>
Neutrófilo	El tipo más frecuente de leucocito, célula multinucleada con una vida media limitada	Fagocitosis de microbios patógenos y su eliminación aumenta exponencialmente
Monocitos y macrófagos	Los macrófagos tisulares migran en forma de monocitos	Fagocitosis y muerte bacteriana
Célula dendrítica	Células presentadoras de antígenos (CPA)	Los antígenos son captados, procesados y presentados a los linfocitos
Eosinófilo	Formados por gránulos gruesos	Emplean un papel en la eliminación de patógenos recubiertos de anticuerpos
Linfocitos	Los dos tipos de linfocitos son los T (maduran en timo) y B (maduran en médula ósea)	Expresan receptores específicos a los antígenos para reconocer infecciones

Modificado de Sangwan y col. (2022).

rápidamente por necrosis o apoptosis expulsando proteínas granulares toxicas y hebras genómicas de ADN para capturar y matar bacterias. Los neutrófilos muestran diferentes fenotipos según su condición biológica. Los neutrófilos N1 se asocian con inflamación aguda y participan en eliminar patógenos. Por otro lado, los neutrófilos N2 inducen angiogénesis y remodelación de tejidos en la inflamación crónica (Curi y col., 2020).

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria y como células presentadoras de antígeno (CPA), existen dos subgrupos: macrófagos activados por la vía clásica (M1) y los macrófagos activados por la vía alternativa (M2) (Abbas y col., 2018). Los macrófagos M1 se caracterizan por producir citocinas (IL-1, IL-12 e IL-23) y mediadores pro-inflamatorios, además activan las células tipo Th1 involucradas en el control de patógenos intracelulares mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y de nitrógeno y de la resistencia tumoral. Por otro lado, los macrófagos M2 son importantes para la activación de células tipo Th2, responsables del control de patógenos extracelulares, además de inducir la cicatrización y fibrosis (Abbas y col., 2018; Özdemir y col., 2019).

Las células dendríticas son CPA profesionales y participan en la iniciación de la respuesta de los linfocitos T hacia patógenos invasores, además de generar tolerancia a los autoantígenos. Por lo tanto, estas células son capaces de diferenciar entre una respuesta inmunológica tolerogénica o protectora (Amon y col., 2020).

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son capaces de identificar y eliminar a células infectadas mediante la liberación de gránulos citolíticos y citocinas citotóxicas

(Abbas y col., 2018). Otra función efectora de las células NK es producir interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), participando en la activación de los macrófagos para destruir a los microbios fagocitados (Laskowski y col., 2022).

Otras células involucradas en la respuesta innata son los mastocitos, basófilos y eosinófilos. Estos tres tipos de leucocitos comparten la característica de tener gránulos citoplasmáticos llenos de mediadores inflamatorios y antimicrobianos. Otra característica en común es que son células efectoras en la inflamación alérgica de la piel (Abbas y col., 2018; Nakashima y col., 2019).

Los patógenos que quedan libres o los que han sido fagocitados migran hacia estructuras linfoides secundarias donde se encontrarán con los linfocitos que ingresan desde la sangre y que provienen de estructuras linfoides primarias. Aquí es donde los linfocitos Th (cooperadores), linfocitos Tc (citotóxicos o citolíticos) y linfocitos B se unen al patógeno e inicia su activación, proliferación y diferenciación (Punt y col., 2018). Sin embargo, existen diferentes subpoblaciones de linfocitos que difieren entre sí en el reconocimiento hacia estos agentes extraños y sus funciones.

Los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas capaces de generar anticuerpos, los cuales tienen la misma zona de unión al antígeno que los anticuerpos de su superficie (receptores del linfocito B o BCR), que reconocen en primera instancia al antígeno. Diversos compuestos proteínicos y lipídicos generan la secreción de anticuerpos (IgM e IgG, IgA e IgE) mediante la interacción con su antígeno de superficie (Abbas y col., 2018).

Los linfocitos T no producen anticuerpos y utilizan su receptor (TCR) para reconocer péptidos derivados de proteínas extrañas que se unen a proteínas propias

en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). El MHC se expresa en las superficies de las CPA (Abbas y col., 2018). Los linfocitos T derivan en los linajes  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ . Los linfocitos T  $\alpha\beta$  constan de distintas poblaciones y entre las mejores definidas están los linfocitos T cooperadores (CD4+) y los linfocitos T citotóxicos o citolíticos (CD8+) (Abbas y col., 2018; Del Zotto y col., 2021).

Los linfocitos T cooperadores vírgenes (Th0) son estimulados para que se diferencien hacia uno de los tres subgrupos efectores distintos denominados Th1, Th2 y Th17. El estímulo puede provenir de un antígeno, coestimuladores y citocinas provenientes de la respuesta inmunológica, cumpliendo así distintas tareas a favor de la defensa del anfitrión ante microorganismos extraños o participando en el control de enfermedades inmunitarias (Abbas y col., 2018; Miggelbrink y col., 2021). Los linfocitos Th1 secretan  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-2 e IL-12, células capaces de generar protección al anfitrión contra microbios intracelulares mediante la activación clásica del macrófago, induciendo la expresión de enzimas capaces de producir ROS. Los Th2 producen citocinas como IL-4, IL-6 y IL-10 las cuales desempeñan funciones importantes contra la erradicación de infecciones por helmintos y en la defensa de infecciones alérgicas. Los Th17 generan las citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22, éstas influyen en la erradicación de infecciones bacterianas extracelulares y fúngicas, además contribuyen de forma significativa en enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Abbas y col., 2018; Maggi y col., 2019). También los linfocitos Th0 se pueden diferenciar en linfocitos T reguladores (Treg), cuya función principal es el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y tolerancia periférica (**Cuadro 4**) (Del Zotto y col., 2021).

**Cuadro 4.** Descripción general de las propiedades de los subgrupos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y sus contribuciones en enfermedades inmunitarias.

<b>Subgrupos de linfocitos T CD4<sup>+</sup></b>	<b>Expresa el factor de transcripción</b>	<b>Citocinas características</b>	<b>Defensa del hospedero</b>	<b>Reacciones inmunitarias</b>
Th1	T-bet	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12	Microbios intracelulares	Activar macrófagos, inhibir la angiogénesis y mejorar la función efectora de linfocitos CD8
Th2	Gata-3 y Stat-6	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13	Parásitos helmínticos	Reclutar eosinófilos
Th17	ROR- $\gamma$ t y STAT3	IL-17A, IL-17F y IL-22	Bacterias extracelulares, hongos	Reclutar neutrófilos y promover la angiogénesis

Modificado de Abbas y col. (2018) y Miggelbrink y col. (2021).

Los linfocitos T citotóxicos contribuyen en la eliminación de microbios intracelulares y células cancerosas mediante dos mecanismos principales, uno dependiente de calcio y el otro independiente de calcio (Powell y col., 2022). El primero es un proceso de desgranulación, que conduce a la liberación de diferentes proteínas citotóxicas (perforina, granzimas y granulicina), provocando la permeabilización de la membrana celular, la activación de caspasas y finalmente, la apoptosis celular. El segundo mecanismo involucra receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), como lo es la interacción Fas receptor (Fas)/Fas ligando (Fas L), donde las CTL que expresan Fas L se une a Fas y genera la apoptosis de la célula diana inducida por caspasas (Del Zotto y col., 2021).

Por otro lado, los linfocitos T  $\gamma\delta$  son células que comparten características tanto de inmunidad adaptativa como innata, pueden reconocer y unirse al antígeno sin restricción del MHC y responden más rápido que las células T  $\alpha\beta$  por no requerir expansión clonal (Zarobkiewicz y col., 2021). A su vez, este tipo de células son activadas de manera similar a las células de la inmunidad innata, mediante el reconocimiento de los PAMPs o DAMPs (Ghaedi y col., 2019).

Las células T  $\gamma\delta$ , a diferencia de las células  $\alpha\beta$ , son mucho menos comunes y representan del 0.5 al 5 % de todos los linfocitos T de la sangre periférica y los tejidos linfoides de ratones y seres humanos (Castillo-González y col., 2021). Sin embargo, éstas son el subconjunto más abundante en barreras epiteliales como la piel, el intestino y el tracto reproductivo (Abbas y col., 2018; Castillo-González y col., 2021). Una de las características más particulares de las células T  $\gamma\delta$  es su migración hacia

tejidos periféricos en lugar de hacia órganos linfoides. Por lo tanto, la función de los linfocitos T  $\gamma\delta$  está ligada a su distribución tisular (Park y Lee, 2021).

#### **4.4. Inmunomoduladores**

La defensa del sistema inmunológico implica la modulación (inducción, expresión, amplificación o inhibición) de cualquier parte o fase de la respuesta inmunitaria (Shantilal y col., 2018; Harun y col., 2020). Este proceso se lleva a cabo mediante la administración de sustancias de origen biológico/endógeno (e.g., citocinas) o sintético/exógeno (e.g., levamisol) capaces de regular el sistema inmunológico y que han sido empleadas en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (López-Yomayusa y Almansa-Manrique, 2000).

En función del tipo de enfermedad puede requerirse inmunoestimulación o inmunosupresión (García-Hernández y col., 2009). La “inmunosupresión” es importante cuando la respuesta inmunitaria del organismo está hiperactivada (e.g., enfermedades autoinmunes, alergias y trasplantes), fenómeno que puede estar mediado por la estimulación de células inhibitoras o factores humorales, o por la inhibición de células efectoras o de factores humorales activadores. Por otra parte, la “inmunoestimulación” se logra por la estimulación de células efectoras o la producción de sus inductores metabólicos, lo que permite aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria cuando existen procesos de inmunosupresión o inmunocompromiso (e.g., cáncer, SIDA, enfermedades crónico degenerativas y/o infecciosas) (Sánchez y col., 2002; García-Hernández y col., 2009). Otros agentes moduladores son los inmunoadyuvantes, los cuales se utilizan para para mejorar la eficacia de las vacunas

ya que inducen una respuesta inmunológica más específica creando células de memoria (Sangwan y col., 2022).

Los inmunomoduladores también se clasifican como específicos e inespecíficos; los inespecíficos (*e.g.*, levamisol) son capaces de promover o suprimir el sistema inmunitario en general (López-Yomayusa y Almansa-Manrique, 2000; Monet-Alvarez y col., 2020). Por otro lado, los específicos (*e.g.*, citocinas, anticuerpos monoclonales, vacunas) ejercen acción selectiva sobre diferentes células (Monet-Alvarez y col., 2020). De esta manera, los inmunomoduladores pueden afectar tanto la respuesta innata (natural) o adaptativa (adquirida) (López-Yomayusa y Almansa-Manrique, 2000; Monet-Alvarez y col., 2020).

El modo de acción de compuestos inmunomoduladores no es del todo conocido. Sin embargo, la mayoría actúan sobre células inmunológicas al inducir cambios en la expresión de genes, procesamiento del ARN mensajero, transporte intracelular de proteínas, síntesis proteica y la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular. Estos cambios influyen en la inducción, mantenimiento y regulación de la respuesta inmunitaria. En otros casos, se ha observado que la acción de los inmunomoduladores está relacionada con el mecanismo y equilibrio de segundos mensajeros que participan en las rutas de transducción de las señales celulares (García-Hernández y col., 2009).

Los fármacos inmunomoduladores comerciales se emplean para restaurar el funcionamiento del sistema inmunológico. Sin embargo, el uso clínico a largo plazo, de algunos inmunomoduladores, está contraindicado debido que provocan efectos secundarios graves tales como psoriasis, anafilaxia y disfunción renal (**Cuadro 5**). Por

**Cuadro 5.** Mecanismo de acción y efectos secundarios de fármacos inmunomoduladores.

<b>Inmunomoduladores</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Efectos secundarios</b>
Glucocorticoides	Disminuye la extravasación de leucocitos y la expresión de citocinas proinflamatorias	Retraso del crecimiento en niños, necrosis ósea, osteopenia, hiperglucemia e hipertensión
Ciclosporina	Reduce la expresión de linfocinas y proteínas antiapoptóticas	Disfunción renal, hiperplasia de las encías, hiperuricemia, hipercolesterolemia
Azatioprina, azatioprina sódica	Inhibe la proliferación de linfocitos	Leucopenia, trombocitopenia, hepatotoxicidad, alopecia, toxicidad gastrointestinal, pancreatitis.
Etanercept, infliximab, adalimumab, anakinra, daclizumab, basiliximab	Se une a TNF- $\alpha$ e inhibe la unión a sus receptores	Reactivación de tuberculosis, psoriasis, infecciones fúngicas invasivas, hipersensibilidad y anafilaxia
Isoprinosina	Mejora la producción de citocinas e induce la proliferación de linfocitos	Depresor del SNC, náuseas transitorias y aumento del nivel de ácido úrico en suero y orina

Modificado de Jantan y col. (2015).

lo tanto, el diseño y desarrollo de nuevos fármacos candidatos con actividad inmunomoduladora se ha convertido en un campo de interés en el mundo (Jantan y col., 2015).

#### **4.5. Plantas con actividad inmunomoduladora**

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como su principal fuente de abrigo, alimento y medicamento, entre otros usos. De esta manera, al hombre le ha interesado demostrar las propiedades de las plantas e identificar los compuestos bioactivos asociados a sus actividades biológicas. Esto ha llevado a una evolución desde el uso tradicional de una planta hasta el desarrollo de un medicamento de patente como es el ácido acetil salicílico (D'Amelia y col., 2021).

Recientemente, la medicina herbolaria ha retomado popularidad mundial debido a la gran disponibilidad en las comunidades locales, es más barata que la medicina de patente y tienen una mayor facilidad de administración (Abubakar y Haque, 2020). De acuerdo con la OMS, el 88% de la población mundial utiliza la medicina herbolaria y el 90% de los países en desarrollo utilizan hierbas tradicionales como la principal alternativa en el cuidado de la salud (Sianipar, 2021). Además, se estima que entre un 30 a 40% de los medicamentos que son comercializados provienen de productos naturales (Newman y Cragg, 2020).

Los productos naturales y sus componentes han demostrado ser una fuente importante de moléculas capaces de ejercer un efecto farmacológico sobre la respuesta inmunitaria (**Cuadro 6**) (Curiel-Gutiérrez, 2017). En este sentido, compuestos bioactivos derivados de plantas han sido utilizados tanto en terapia

**Cuadro 6.** Plantas con actividad inmunomoduladora.

<b>Nombre científico de la planta (Familia)</b>	<b>Constituyentes químicos</b>	<b>Actividades biológicas</b>
<i>Achillea millefolium</i> C. Koch (Compositae)	Flavonoides, alcaloides, poliacetilenos, cumarinas, triterpenos	Antiinflamatorio, antiespasmódico, antipirético, diurético
<i>Cistanche desertícola</i> Ma (Orobanchaceae)	Polisacáridos	Inmunomodulador, mitogénico y actividades comitogénicas.
<i>Matricaria chamomilla</i> L. (Asteraceae)	Proteína	Inmunomoduladora
<i>Rhodiola imbricata</i> Gray. (Crassulaceae)	Fenólicos	Propiedades inmunoestimulantes
<i>Catunaregam spinosa</i> (Thunb.) Tirveng (Rubiaceae)	Saponinas, terpenos	Antiarrítmico

Modificado de Shantilal y col. (2018).

convencional como tratamiento alternativo (**Figura 1**), algunos de ellos se describirán brevemente a continuación.

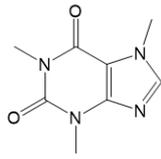
Los polifenoles son fitoquímicos que incluyen a más de 800 compuestos (e.g., flavonoides, cumarinas y taninos), cuyo efecto inmunomodulador se ha asociado a actividades antioxidantes y antiinflamatorias de fenólicos como respuestas inmunitarias inespecíficas (Sangwan y col., 2022).

Las saponinas presentan un esqueleto derivado de 30 carbonos y estructura tipo esteroide o triterpeno policíclico, éstas han mostrado efectos inmunoestimulantes o inmunoadyuvantes (Sangwan y col., 2022).

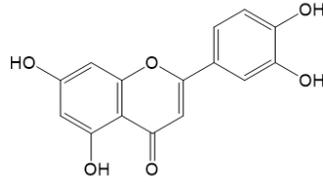
Los polisacáridos son carbohidratos de estructura lineal o ramificada y se han usado por sus efectos inmunoestimulantes e inmunoadyuvantes (Sangwan y col., 2022).

Los alcaloides son heterociclos que presentan en su estructura al menos un átomo de nitrógeno, éstos han mostrado efectos inmunomoduladores (supresores o activadores) (Kesharwani y col., 2022; Sangwan y col., 2022)

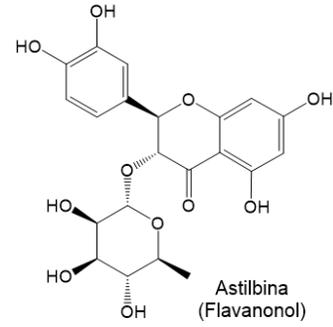
Las plantas medicinales con propiedades inmunomoduladoras tienen un alto potencial como medicamentos. Por ejemplo, el extracto etanólico de *Physalis angulata* (EEPA) presentó actividad inmunomoduladora *in vivo* e *in vitro*; actividad caracterizada por disminución en los niveles de moléculas proinflamatorias (IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ ), inhibición de la proliferación de linfocitos, secreción de citocinas tipo Th1 (IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$ ) y aumentó en la secreción en una citocina tipo Th2 (IL-4); además, el EEPA redujo el edema de la pata en un modelo de ratón (Daltro y col., 2021). Otro estudio



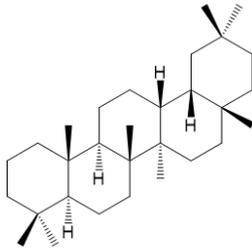
Cafeína  
(Alcaloide)



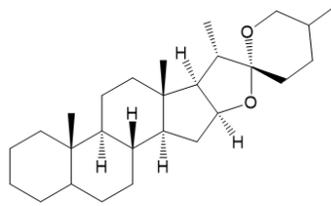
Luteolina  
(Flavona)



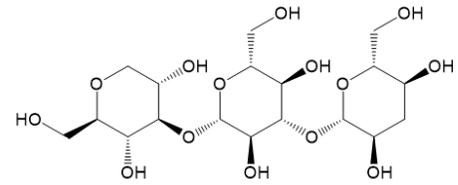
Astilbina  
(Flavanonol)



Oleanano  
(Saponina triterpenoide)



Espirostano  
(Saponina esteroide)



$\beta$ -glucano  
(Polisacárido)

**Figura 1.** Ejemplo representativo de compuestos químicos con actividad inmunomoduladora. Modificado de Sangwan y col. (2022).

mostró potente actividad inmunomoduladora de polisacáridos de la cáscara del garbanzo Kabuli (*Cicer arietinum* L.). Los polisacáridos activaron *in vitro* la fagocitosis y aumentaron la secreción de NO y citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ); mientras que *in vivo* mejoraron los índices de timo y bazo en ratones inmunodeficientes (Akhtar y col., 2020). Por otro lado, los arabinofurananos de los frutos de *Akebia quinata* estimularon la actividad fagocítica e incrementaron los niveles de NO, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en un modelo *in vitro*; asimismo, los arabinofurananos aumentaron la producción de ROS y NO en un modelo de embrión de pez cebra (Wang y col., 2021). Recientemente, Yepes-Perez y col. (2021) reportaron que el extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) inhibió la liberación de partículas infecciosas SARS-CoV-2 y redujo su efecto citopático en la línea celular Vero E6.

La especie *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño (Rubiaceae) es un modelo de estudio en el Laboratorio de Química y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, en la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde se ha demostrado que posee actividades biológicas de importancia para el hombre (*e.g.*, antioxidante, antimutagénica, antitumoral, inmunomoduladora) y componentes asociados a las actividades biológicas (*e.g.*, ácidos grasos, esteroides, melaninas, melaninas solubles).

#### **4.6. Familia Rubiaceae**

La familia Rubiaceae es una de las más grandes en plantas e incluye 600 géneros, alrededor de 14,000 especies y tres subfamilias: Cinchonoideae, Ixorioideae y Rubioideae (Burgos-Hernández y Castillo-Campos, 2018; Wikström y col., 2020). Esta familia tiene distribución mundial; sin embargo, la mayor diversidad se presenta en regiones tropicales y subtropicales (Wikström y col., 2020). En México, se han

reportado de 77 a 113 géneros y de 510 a 707 especies de rubiáceas y en Sinaloa están registradas 76 especies distribuidas en 30 géneros (Vega-Aviña y col., 2021; Torres-Montúfar y Torres-Díaz, 2022).

#### **4.6.1. Características generales**

Las plantas de la familia Rubiaceae abarcan desde pequeñas hierbas anuales y perennes hasta grandes árboles tropicales, se pueden encontrar epífitas, lianas, suculentas, reófitos y formas de vida acuática; sus flores son heteromorfas, los frutos incluyen frutas carnosas o secas y a menudo con semillas pequeñas (Wikström y col., 2020).

#### **4.7. *Randia echinocarpa***

##### **4.7.1 Características generales**

*Randia echinocarpa* Moc. & Sessé ex DC. (Rubiaceae) es nativa de México y dependiendo de la zona geográfica recibe diferentes nombres comunes como papache o crucillo chino (**Cuadro 7**) (CONABIO, 2019). El género *Randia* está altamente diversificado en México, con 62 especies de las cuales 44 son endémicas, contribuyendo a que México sea el tercer país con mayor abundancia de rubiáceas (Villaseñor, 2016; Ojeda-Ayala y col., 2022; POWO, 2023).

*R. echinocarpa* es un árbol pequeño de 3 a 5 m de altura, con ramas rígidas, de las cuales cada brote corto está terminado por cuatro espinas. Tiene las hojas más o menos largas y un poco redondeadas en la punta, de color verde oscuro en el anverso y verde blanquecino en el reverso. Las flores del papache presentan un pistilo de 3 cm de largo y son blancas o amarillas, solitarias, terminales y generalmente

**Cuadro 7.** Clasificación taxonómica del fruto del papache.

<b>Taxón</b>	<b>Categoría</b>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Gentianales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Randia</i>
Especie	<i>Randia echinocarpa</i> Moc. & Sessé ex DC.

unisexuales, aunque también pueden ser bisexuales y despiden un aroma agradable. Las corolas son blancas y se tornan amarillo-naranjas con el tiempo (**Figura 2**) (Bye y col., 1991). Los frutos en estado de madurez fisiológica son verdes y se tornan amarillos y posteriormente café oscuro en madurez comercial, son redondos con protuberancias parecidas a verrugas, miden de 4.5 a 10 cm de diámetro y presentan una cáscara dura con prolongaciones de diferente tamaño (**Figura 3**). La floración ocurre en los meses de marzo y julio y los frutos maduran de julio a marzo (Bye y col., 1991; CONABIO, 2019).

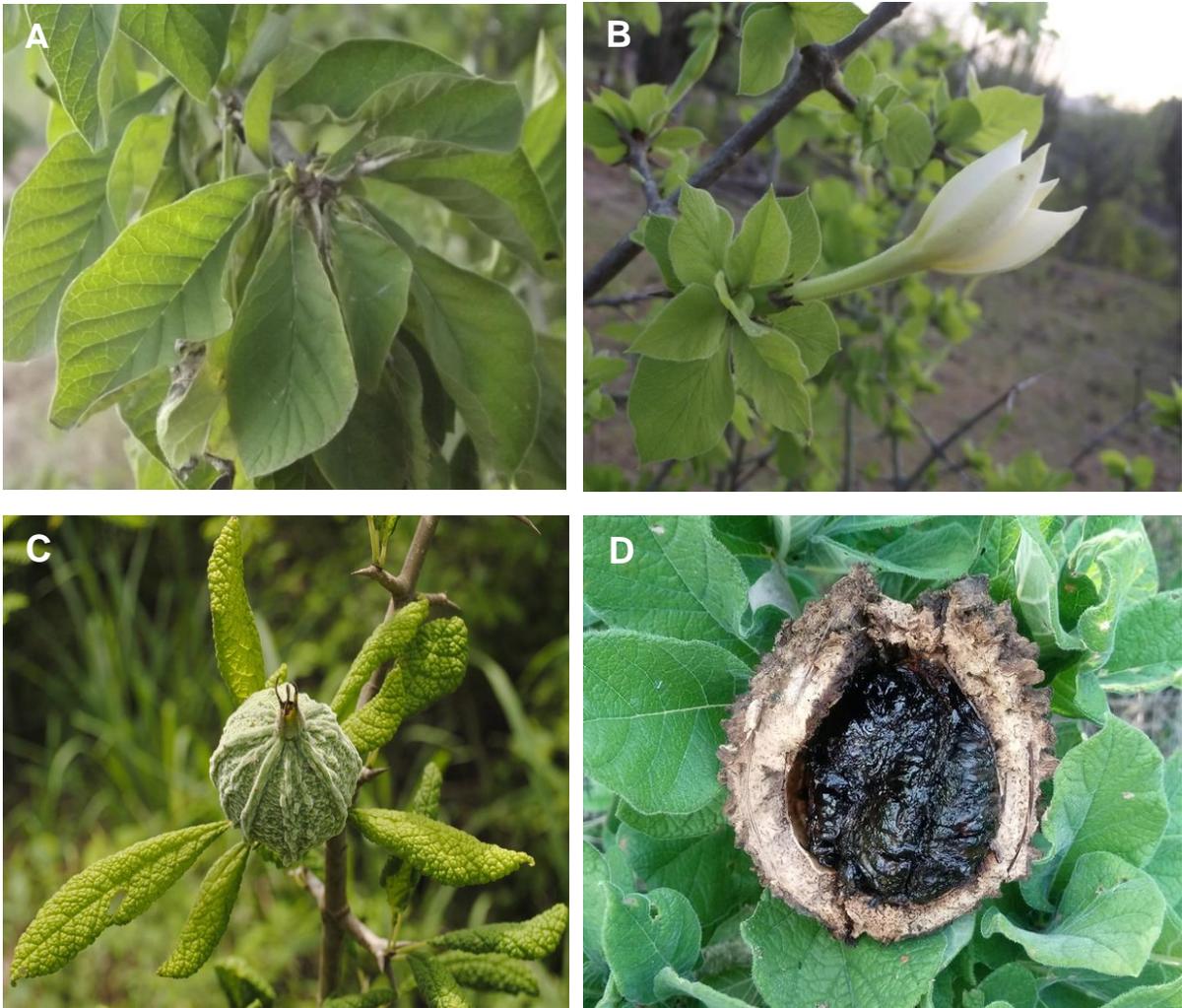
#### **4.7.2. Distribución geográfica**

*R. echinocarpa* se desarrolla en climas cálido, semicálido y templado; asimismo, suele encontrarse en bosques tropicales caducifolios, subcaducifolios y perennifolios, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosques de encino y de pino (CONABIO, 2019).

Las especies de *Randia* se distribuyen desde la costa del océano pacífico hasta los 1700 msnm. Su distribución en México abarca desde el sur de Sonora y el suroeste de Chihuahua hasta el centro de Guerrero y el suroeste de Puebla, teniendo el desierto de Sonora como límite norte y el río Balsas como límite hacia el sur (Bye y col., 1991).

#### **4.7.3. Composición química de *Randia echinocarpa***

En frutos del género *Randia* se han identificado diferentes compuestos químicos (e.g., saponinas,  $\beta$ -sitosterol, ácido ursólico y ácido oleanólico), mientras que en *R. echinocarpa* está reportado manitol, fitoesteroles, ácidos grasos y melaninas; así como los ácidos quinóvico, oxoquinóvico, ursólico y oleanólico (Santos-Cervantes y col.,



**Figura 2.** Planta de *Randia echinocarpa*. (A) hojas, (B) flor, (C) frutos, y (D) frutos en madurez de consumo. Tomada de [https://www.naturalista.mx/taxa/316796-Randia-echinocarpa/browse\\_photos](https://www.naturalista.mx/taxa/316796-Randia-echinocarpa/browse_photos), créditos a Pio-León (A-B), Roberto Otero (C) y Laura Cisneros (D).

**A**



**B**



**C**



**Figura 3.** Fruto de *R. echinocarpa*. (a) entero, (b) corte ecuatorial y (c) pulpa con semillas.

2007; Cano-Campos y col., 2011; Montes-Avila y col., 2018; Gil-Avilés y col., 2019; Ojeda-Ayala y col., 2022). Asimismo, algunas características nutricionales, fisicoquímicas y de actividad biológica del fruto de *R. echinocarpa* han sido descritas (Ojeda-Ayala y col., 2022). Cabrera (2000) registró un pH de 6.24, acidez de 0.04% y humedad del 56.15%, también mostró que el fruto tiene un alto contenido de compuestos polares principalmente carbohidratos, fenólicos (129.5 mg/g) y taninos (1.66 mg/g), además de bajo contenido de vitamina C (7.01 mg/100g).

#### **4.7.4. Usos etnofarmacológicos de plantas de *Randia* spp.**

El género *Randia* incluye varias especies usadas en medicina tradicional (Ojeda-Ayala y col., 2022). *R. echinocarpa* ha sido comúnmente utilizada para tratar problemas renales, pulmonares, circulatorios e incluso gastrointestinales (Bye y col., 1991). *Randia aculeata* es utilizada para tratar anemia, bronquitis, reumatismo, artritis, hemorroides, problemas de la circulación y como abortivo, aportando propiedades analgésicas, antihemorrágicas y antiinflamatorias (García-Cruz, 2018). Por otro lado, *Randia monantha* es utilizada comúnmente en el estado de Veracruz como remedio para contrarrestar los efectos de mordeduras de serpientes y animales ponzoñosos (Méndez y Hernández, 2009).

El fruto de *R. echinocarpa* es utilizado como alimento y en medicina tradicional contra diferentes padecimientos: enfermedades respiratorias, prevención y tratamiento de cáncer, diabetes, padecimientos gastrointestinales, problemas renales (Bye y col., 1991; UNAM, 2009).

## 4.8. Antecedentes

### 4.8.1. Actividades biológicas de especies de *Randia* y de *Randia echinocarpa*

Los usos tradicionales de especies de *Randia* han llevado a realizar estudios científicos que corroboren sus propiedades medicinales. Juárez-Trujillo y col. (2018) reportaron que la pulpa y semillas de *R. monantha* presentan una alta concentración de fibra, ácido linoleico y compuestos fenólicos; asimismo, demostraron su actividad antioxidante. Por otro lado, el extracto metanólico de *Catunaregam spinosa* (= *Randia dumetorum*) y sus fracciones presentan actividad inmunoestimuladora (Patel-Ritesh y col., 2011). En cuanto a *R. echinocarpa*, los extractos acetónicos de tallos y hojas mostraron débil actividad antibacteriana (Salinas-Sánchez y col., 2009), mientras que el extracto del fruto mostró actividad nematocida contra *Haemonchus contortus* L3 (López-Aroche y col., 2008). Asimismo, se ha reportado que el extracto acuoso presenta actividad diurética y antimutagénica, lo cual se relaciona a su elevado contenido de fenólicos totales y a la presencia de  $\beta$ -sitosterol y ácido ursólico en el extracto acuoso, a lo que se les atribuye actividad antioxidante (Vargas-Solis y Perez-Gutierrez, 2002; Santos-Cervantes y col., 2007; Ojeda-Ayala y col., 2022). El estudio biodirigido de la actividad antimutagénica del extracto metanólico de *R. echinocarpa* demostró que la fracción hexánica presentaba la mayor actividad antimutagénica y que los compuestos responsables eran el  $\beta$ -sitosterol y los ácidos linoleico y palmítico (Cano-Campos y col., 2011). En concreto sobre su actividad inmunomoduladora, Montes-Avila y col. (2018) demostraron que melaninas obtenidas del fruto de papache presentan actividad antioxidante e inmunomoduladora al aumentar la proliferación de esplenocitos y presentar un alto número de anillos fenólicos en su composición. Gil-

Avilés (2020) estudiaron las melaninas solubles del fruto de papache y demostraron que inducían la proliferación de linfocitos *in vitro* y que activaban los linfocitos T  $\gamma\delta$  de los ganglios linfáticos mesentéricos, sugiriendo que esta actividad inmunomoduladora puede tener un impacto benéfico en la inmunoterapia frente a infecciones y cáncer. Estudios más recientes realizados por Pinto-González (2022) y Zatarain-Irigoyen (2022) demuestran que existen diferencias en composición fitoquímica y actividades biológicas entre muestras del fruto de papache obtenidas por dos métodos de extracción: extractos por el método secuencial y fracciones por partición líquido-líquido. Estas muestras presentan actividad inmunomoduladora celular (proliferación de células mononucleares de sangre periférica), destacando los extractos hexánico y clorofórmico; asimismo ejercen actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de pata de ratón, resaltando las fracciones hexánica y en acetato de etilo.

## V. JUSTIFICACIÓN

El sistema inmunológico protege al organismo frente a diferentes agentes extraños. En este sentido, la alteración de este sistema contribuye a la progresión de diferentes enfermedades (e.g., enfermedades autoinmunes, cáncer, SIDA, alergias). Al respecto, los inmunomoduladores son sustancias capaces de estimular o suprimir la respuesta inmunitaria y son de utilidad en diferentes condiciones patológicas. Sin embargo, se ha reportado que los fármacos inmunomoduladores existentes en el mercado son causantes de efectos secundarios graves. Por lo tanto, los productos naturales con actividad inmunomoduladora son potenciales sustitutos de estos fármacos. Por otro lado, especies del género *Randia* han demostrado ser útiles para tratar diferentes enfermedades. En el caso de *R. echinocarpa*, esta planta nativa de Sinaloa se ha utilizado para tratar malaria y cáncer, entre otros padecimientos; adicionalmente, la composición nutrimental, actividad antimutagénica y antitumoral del fruto de *R. echinocarpa* ha sido demostrada. La diversidad de usos terapéuticos tradicionales del fruto de *R. echinocarpa* podría estar asociada a propiedades inmunomoduladoras. Asimismo, estudios previos han mostrado que extractos y fracciones del fruto de papache poseen diferencias en su composición fitoquímica y actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, es de gran interés demostrar la eficiencia de extractos y fracciones del papache en la regulación de la respuesta inmunitaria. Consecuentemente, la demostración de las propiedades benéficas de esta planta contribuirá a su conservación y aprovechamiento sustentable.

## **VI. HIPÓTESIS**

Extractos y fracciones del fruto de papache (*Randia echinocarpa*) presentan actividad inmunomoduladora.

## VII. OBJETIVOS

### 7.3. Objetivo general

Analizar la actividad inmunomoduladora de extractos y fracciones del fruto de papache (*Randia echinocarpa*).

### 7.4. Objetivos específicos

7.2.1. Demostrar la actividad inmunomoduladora *in vitro* de extractos/fracciones del fruto de papache y seleccionar las muestras con mayor actividad.

7.2.2. Evaluar el efecto sobre la proliferación de esplenocitos del tratamiento por vía oral de ratones con las muestras del fruto de papache seleccionadas.

7.2.3. Analizar el efecto sobre el estado antioxidante e inmunomodulación de ratones inmunocomprometidos, por daño con ciclofosfamida, del tratamiento con la muestra más activa.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Materiales

#### 8.1.1. Material vegetal

El fruto de *R. echinocarpa* en estado de madurez para su consumo fue colectado en los municipios de Salvador Alvarado, Mocorito y Badiraguato del estado de Sinaloa, México, en el periodo de noviembre de 2020 a enero de 2021. Los frutos fueron transportados y almacenados en el Laboratorio de Química de Productos Naturales (LQPN) de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), en la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS).

#### 8.1.2. Animales de laboratorio

Para los ensayos de actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* se utilizaron ratones BALB/c (BIOINVERT SA de CV, México) mantenidos en el bioterio de la FCQB-UAS. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico en un cuarto con temperatura controlada ( $24 \pm 1$  °C) y períodos de luz/oscuridad de 12 h, el alimento (Rat Diet 5012) y agua purificada se administraron *ad libitum*. La investigación se realizó conforme a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM062-ZOO-1999.

#### 8.1.3. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.): ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lipopolisacárido (LPS), concanavalina A (Con A) bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 80 y medio de cultivo RPMI-1640. Para los estudios *in vivo* se utilizaron los kits: Alkaline Phosphatase (Liquid)

Reagent Set (*Pointe Scientific Inc*, EE.UU.), Urea (BioSystems), Creatinine (BioSystems), AST/GOT y ALT/GTP (ElitechGroup, México) Kit Lipid Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay (Biovision, EE.UU.) y Kit CBA comercial (Mouse Th1/Th2/Th17, BD Bioscience-Pharmingen). Los solventes fueron adquiridos de CTR-Scientific (México): alcohol metílico, etanol 96%, hexano, acetato de etilo y cloroformo; éstos se destilaron previo a su uso. Los solventes orgánicos grado HPLC fueron de Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, EE.UU.).

## **8.2. Metodología**

### **8.2.1 Preparación de harina de papache (*R. echinocarpa*)**

La pulpa del fruto se recuperó eliminando la cáscara leñosa y separando la semilla (Extractor EX-S, Cafeteras Internacionales, México) de la pulpa. La pulpa se congeló a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  previo a su liofilización (Virtis Company, EE.UU.). La pulpa liofilizada se trituró en una licuadora (Oster®), aplicando pulsos con el objetivo de evitar el calentamiento de la muestra y la modificación de su composición. La harina se pasó por una malla no. 40 y se almacenó en bolsas herméticas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  protegidas de la luz hasta su uso.

### **8.2.2. Obtención de extractos y fracciones de papache**

#### *8.2.2.1. Obtención de fracciones por el método de partición líquido-líquido*

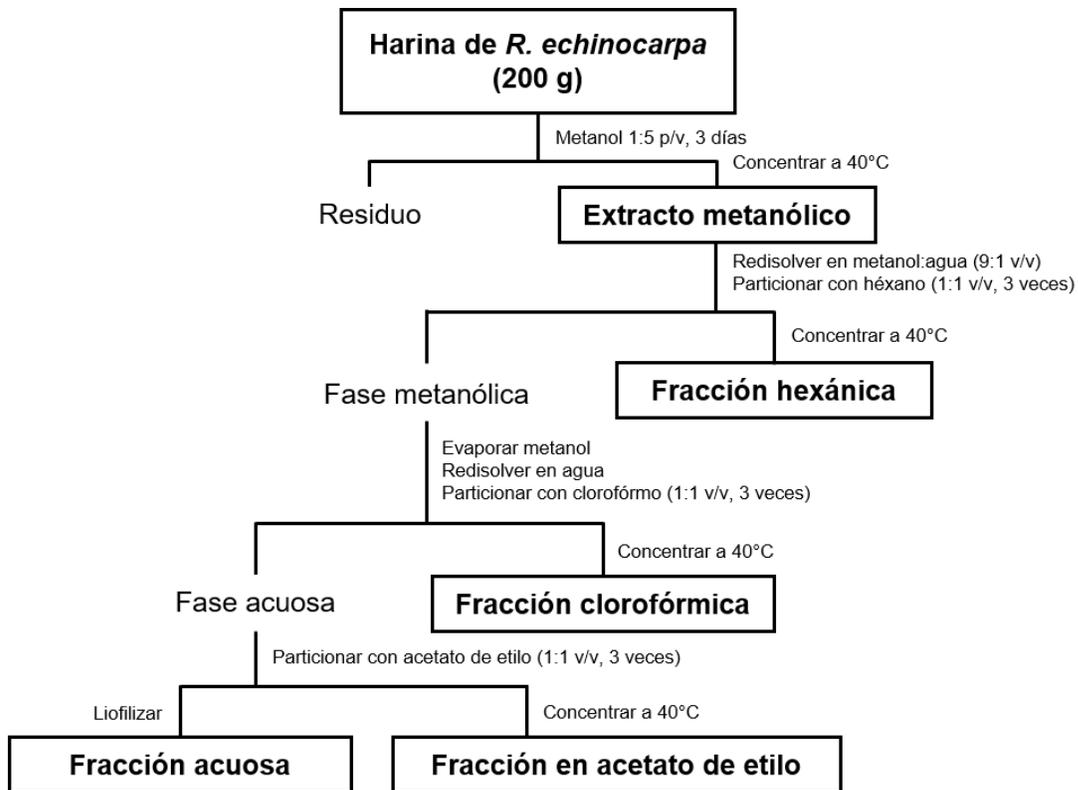
El extracto metanólico (EM) del fruto de papache se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Wall y col. (1996). La harina de papache (200 g) se maceró con metanol (en una relación 1:5 p/v), manteniendo el matraz en agitación continua (150 rpm/ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ /3 días), el solvente se cambió cada 24 h. Los solventes de extracción

de cada día se mezclaron y concentraron a vacío en un rotavapor a 40 °C (Buchi, B-4881, EE.UU.); para obtener el EM, la humedad restante del residuo se eliminó por liofilización (Virtis Company Gardiner, EE.UU.). El EM se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El EM del fruto de papache se fraccionó por partición líquido-líquido usando solventes de diferente polaridad para obtener las siguientes fracciones: hexánica (FH), clorofórmica (FC), en acetato de etilo (FAE) y acuosa (FA) (Wall y col., 1996). El EM del fruto (100 g) se disolvió en 100 mL de metanol:agua (9:1 v/v) y se particionó con hexano (1:1 v/v, 3 veces), recuperándose las fases hexánicas. La fase metanólica se concentró y resuspendió en 100 mL de agua y fue particionada con cloroformo (1:1 v/v, 3 veces); la fase acuosa restante se extrajo con acetato de etilo (1:1 v/v, 3 veces), recuperándose las fases acuosas y en acetato de etilo. Las fases hexánicas, clorofórmicas y en acetato de etilo se concentraron a 40 °C bajo presión reducida en un rotavapor (Buchi, EE.UU.); mientras que la FA se concentró por liofilización (Virtis Company Gardiner, EE.UU.), obteniendo la correspondiente fracción. Las fracciones se almacenaron a -20 °C protegidas de la luz hasta su uso (**Figura 4**).

#### *8.2.2.2. Obtención de extractos por el método secuencial*

La harina se extrajo secuencialmente con hexano (EH), cloroformo (EC), acetato de etilo (EAE) y agua (EA) de acuerdo a la metodología reportada por Santos-Cervantes y col. (2007). La harina de papache (200 g) se mezcló con hexano (1:5 p/v), manteniendo el matraz en agitación continua (150 rpm/37 °C/3 días), el solvente se cambió cada 24 h por filtración. Los filtrados hexánicos se juntaron y el residuo de harina se extrajo secuencialmente con el resto de los solventes bajo las mismas



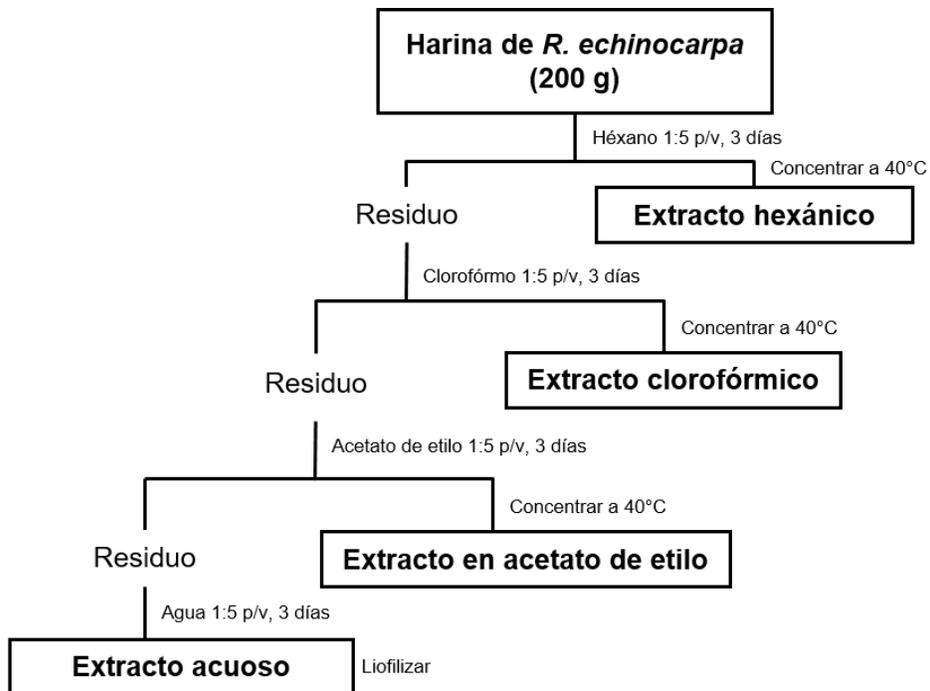
**Figura 4.** Diagrama para la obtención de las fracciones de *R. echinocarpa* a partir del extracto metanólico.

condiciones. Al final de las extracciones, cada uno de los solventes orgánicos se eliminaron bajo presión reducida en un rotavapor a 40 °C (Buchi, EE.UU.); mientras que el extracto acuoso se concentró por liofilización (Virtis Company Gardiner, EE.UU.). Los extractos obtenidos (EH, EC, EAE y EA) se almacenaron a -20 °C protegidos de la luz hasta su uso (**Figura 5**).

### **8.2.3. Actividad inmunomoduladora *in vitro***

#### *8.2.3.1. Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos*

La proliferación de esplenocitos se evaluó de acuerdo a la metodología establecida por Lin y Tang (2007) con algunas modificaciones. Los ratones BALB/c se sacrificaron por dislocación, se sanitizaron en una disolución de benzal al 10% (v/v) y se les extrajo el bazo en condiciones asépticas. El bazo se colocó en una caja Petri con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), se homogenizó usando el émbolo estéril de una jeringa y se filtró con una malla de 70 µm. La suspensión celular se centrifugó (1500 rpm/5 min) (EBA 20 Hettich Zentrifugen, Alemania) y se eliminó el sobrenadante. Las células recuperadas se trataron con amortiguador de lisis (pH 7.2-7.4) para eliminar los eritrocitos, la suspensión se centrifugó (1500 rpm/5 min), se lavó con amortiguador de fosfatos (pH 7.5), se centrifugó bajo las mismas condiciones y finalmente las células fueron resuspendidas ( $5 \times 10^6$  células/mL) en medio RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10% v/v y mezcla antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich, EE.UU.) al 1% v/v. En microplacas de 96 pocillos fondo plano se colocaron 200 µL de la suspensión celular y 50 µL de los agentes mitogénicos Con A o LPS (concentración final en el pozo de 5 y 10 µg/mL, respectivamente) o extractos/fracciones de papache (concentraciones finales en el pozo de 10, 100 y 200



**Figura 5.** Diagrama para la obtención de extractos de la pulpa del fruto de *R. echinocarpa* por el método secuencial

µg/mL) o control vehículo (DMSO 10% en medio RPMI-1640). La placa se incubó durante 24 h a 37 °C en una incubadora en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y con 95% de humedad (Walter-Jacketed Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, NUAIRE, EE. UU.). La proliferación celular se determinó con el reactivo MTT utilizado comúnmente en procesos de cuantificación de viabilidad celular. Las células viables convierten las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) en sales de formazán (azul e insoluble) debido a que el MTT atraviesa la membrana mitocondrial donde actúan las deshidrogenasas, las células muertas son incapaces de generar esta acción (Ghasemi y col., 2021). A cada pozo se añadieron 10 µL de una disolución de MTT en PBS (5 mg/mL). La placa se incubó nuevamente por 4 h a 37 °C. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de proliferación celular relativo al control.

#### **8.2.4. Actividad inmunomoduladora *in vivo***

La actividad inmunomoduladora *in vivo* se evaluó en dos modelos murinos: ratones sanos y ratones inmunosuprimidos. Se evaluaron las cuatro fracciones de papache obtenidas por el método de partición líquido-líquido. Para preparar las muestras, las fracciones se pesaron, mezclaron con Tween 80 (el 1% del volumen final) y calentaron a 40 °C hasta homogenizar la mezcla. A dicha mezcla se agregó agua destilada (≈ 50% del volumen final) y se homogenizó en el ultrasonido por 15 min. Finalmente, el agua destilada restante fue adicionada y la mezcla homogenizada para obtener la concentración deseada. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C) y protegidas de la luz durante el tiempo que duraron los tratamientos.

#### 8.2.4.1 Efecto de la administración oral de las fracciones de papache

El efecto inmunomodulador de la administración oral de las fracciones de papache (FH, FC, FAE y FA) se evaluó siguiendo la estrategia de Park y col. (2004). Brevemente, ratones BALB/c machos (6-8 semanas de edad, 20-25 g) fueron divididos en cinco grupos experimentales (n = 6): el grupo control vehículo (Tween 80 al 1%, 10 mL/kg p.c.) y los cuatro grupos correspondientes a cada fracción (100 mg/kg p.c.). Los tratamientos se administraron diariamente por vía oral y durante 14 días. Veinticuatro horas después de la última dosis y previo ayuno de 12 h, los ratones se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca y los animales se diseccionaron para extraer el bazo. Cien microlitros de la sangre se mezclaron en viales con 20 µL de EDTA para determinar los parámetros hematológicos. El resto de la sangre fue centrifugada (4000 rpm/10 min/4 °C) para obtener el suero que se almacenó a -80 °C hasta la realización de pruebas bioquímicas.

##### 8.2.4.1.1 Pesos corporales e índice de bazo e hígado

Los animales fueron pesados diariamente durante el periodo de estudio para calcular el cambio de peso corporal. Los resultados se reportaron como porcentaje de ganancia de peso. Los bazos e hígados de los ratones sacrificados fueron pesados para calcular los índices correspondientes, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice del órgano } \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{\text{Peso del bazo o hígado}}{\text{Peso corporal}}$$

#### *8.2.4.1.2 Medición de la proliferación de esplenocitos*

El peso de bazo fue registrado. Inmediatamente después, el bazo y 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 se colocaron en una caja Petri, en baño de hielo, y el tejido se homogenizó usando el émbolo estéril de una jeringa. El homogenado se filtró por una malla de 70 µm; el filtrado se recuperó y el retenido se lavó con 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640. Los filtrados se mezclaron y centrifugaron (1500 rpm/5 min/4 °C). El sobrenadante se desechó. La pastilla se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis, incubó por 5 min y centrifugó nuevamente (1500 rpm/5 min/4 °C). Después de la centrifugación, la pastilla se lavó con 2 mL de PBS y centrifugó bajo las condiciones descritas. Finalmente, las células recuperadas en la pastilla fueron suspendidas en 2 mL de medio RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10% v/v y antibiótico-antimicótico al 1% v/v. La proliferación celular se determinó empleando azul de tripano (0.4%) y conteo celular en una cámara de Neubauer.

#### *8.2.4.1.3 Parámetros hematológicos y bioquímicos*

Las evaluaciones hematológicas incluyeron la concentración de hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), plaquetas, glóbulos blancos y rojos. Éstas se realizaron con un analizador de autohematología veterinario BC-2800 (Mindray; China). Las pruebas bioquímicas incluyeron la determinación de enzimas hepáticas e indicadores de daño renal.

##### *8.2.4.1.3.1 Determinación de enzimas séricas*

La actividad de las enzimas séricas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransaminasa (ALT) fue determinada utilizando kits comerciales (ElitechGroup,

México) siguiendo las indicaciones del fabricante. La determinación se realizó en microplaca de 96 pozos/fondo plano, en cada pozo se colocaron 5 µL de suero y 100 µL de reactivo de trabajo (reactivo A + reactivo B, relación 4:1). La microplaca se agitó por 3 s a 37 °C y las absorbancias se midieron a 340 nm después de 1, 2 y 3 min (Synergy HTX, Bio Tek, EE.UU.). El cambio de absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) se empleó para determinar la actividad enzimática de AST y ALT:

$$\text{Actividad (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 3333$$

La actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en suero se determinó mediante el kit colorimétrico “Alkaline Phosphatase (Liquid) Reagent Set” (*Pointe Scientific Inc*, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. La determinación se realizó en una microplaca de 96 pozos/fondo plano, en cada pozo se colocaron 2.5 µL de suero y 100 µL de reactivo de trabajo (reactivo A + reactivo B, relación 5:1). La microplaca se agitó por 1 min a 37 °C, las absorbancias (405 nm) se midieron a 1, 2 y 3 min (Synergy HTX, Bio Tek, EE.UU.). El cambio de absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) se empleó para determinar la actividad de fosfatasa alcalina y los resultados se expresaron como U/L:

$$\text{Actividad ALP (U/L)} = \Delta \text{Abs}/\text{min} \times 2187$$

#### *8.2.4.1.3.2 Determinación de urea y creatinina*

La urea y creatinina se evaluaron utilizando los kits comerciales UREA/BUN – color y CREATININE de BioSystems y se siguieron las indicaciones del fabricante con modificaciones para microplaca. Para la determinación de urea, en una microplaca se colocaron 1.5 µL de suero o del patrón estándar (50 mg/dL) y 150 µL del reactivo A, la mezcla se agitó por 5 s e incubó 5 min/37 °C. A cada pozo se adicionaron 150 µL de

reactivo B, la placa se agitó e incubó 5 min/ 37 °C y se determinó la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Synergy HTX, BioTek, EE.UU.). Los valores de urea (mg/dL) se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg/dL)} = (\text{Abs muestra}/\text{Abs patrón}) \times 50 \text{ mg/dL} \times \text{dilución}$$

La concentración de creatinina se determinó mezclando 10 µL de suero o del patrón estándar (2 mg/dL) con 100 µL de reactivo de trabajo (RA + RB, relación 1:1), la temperatura se mantuvo a 37 °C; la absorbancia (500 nm) se midió a los 30 (Abs1) y 90 s (ABS2) de incubación en un lector de microplacas (Synergy HTX, BioTek, EE.UU.). Los valores de creatinina (mg/dL) se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg/dL)} = [(\text{Absm1} - \text{Absm2})/(\text{Absp1} - \text{Absp2})] \times 2 \text{ mg/dL} \times \text{dilución}$$

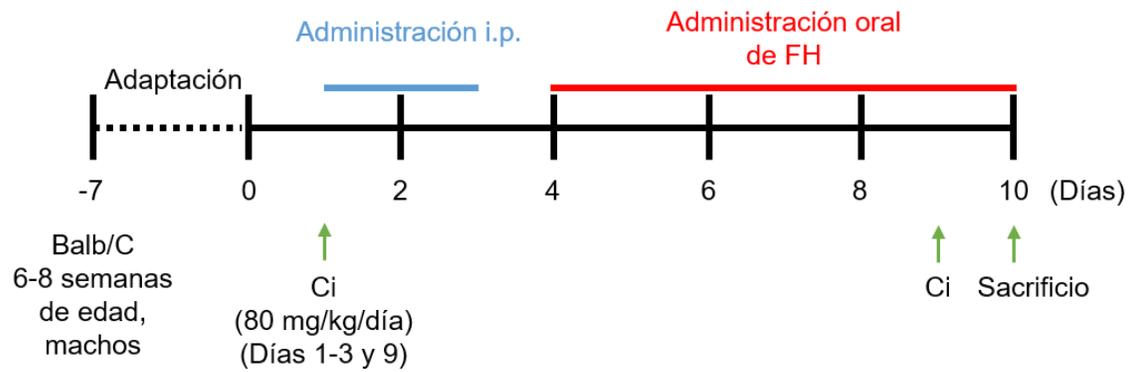
#### *8.2.4.2 Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad celular de ratones inmunocomprometidos*

Este ensayo se realizó siguiendo la estrategia de Qi y col. (2018). Los ratones BALB/c (6-8 semanas de edad, 20-35 g) se dividieron en 5 grupos (n = 6) y se trataron como se indica en el **Cuadro 8**. La inmunosupresión se indujo por inyección intraperitoneal con ciclofosfamida (Ci, 80 mg/kg/día, en solución salina 10 mL/kg/día) los días 1 a 3 y 9; al control negativo (CN) se le inyectó solución salina. Los tratamientos (FH-100: dosis baja, FH-200: dosis media y FH-100: dosis alta; mg/kg) se administraron vía intragástrica los días 4 al 10; a los grupos control se les administró el vehículo (Tween 80 al 1%, 10 mL/kg). Veinticuatro horas después de la última dosis y previo ayuno de 12 h, los ratones se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical (**Figura 6**). La sangre se obtuvo por punción cardiaca y 100 µL se colocaron en viales

**Cuadro 8.** Esquema del tratamiento con diferentes dosis de fracción hexánica (FH) en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida (Ci).

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	
	Días 1-3 y 9 Intraperitoneal	Días 4-10 Intragástrica
Control negativo (CN)	Solución salina	Vehículo
Control daño (CD)	Ci (80 mg/kg p.c.)	Vehículo
FH-100	Ci (80 mg/kg p.c.)	FH-100 mg/kg p.c.
FH-200	Ci (80 mg/kg p.c.)	FH-200 mg/kg p.c.
FH-400	Ci (80 mg/kg p.c.)	FH-400 mg/kg p.c.

- CS: Solución salina
- CD: Ciclofosfamida (Ci) (80 mg/kg p.c.)
- FH-100 mg/kg p.c.
- FH-200 mg/kg p.c.
- FH-400 mg/kg p.c.



**Figura 6.** Línea del tiempo para la evaluación de la actividad inmunomoduladora en el modelo de ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida (Ci).

con 20  $\mu$ L de EDTA para la determinación de parámetros hematológicos, el resto de la sangre fue centrifugada (4000 rpm/10 min/4 °C) para obtener el suero que se almacenó a  $-80$  °C hasta la determinación de citocinas.

#### *8.2.4.2.1 Pesos corporales e índice de timo, bazo e hígado*

Se determinaron de la misma manera que en el apartado 8.2.4.1.1.

#### *8.2.4.2.2 Conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas*

Se determinaron los parámetros hematológicos indicados en el apartado 1.2.4.1.3. Adicionalmente se realizó un extendido sanguíneo para el conteo diferencial de glóbulos blancos. El extendido fue secado al aire libre y posteriormente el frotis fue teñido con hemocolorante rápido (Hycel, México) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los frotis teñidos fueron observados en un microscopio óptico Primo Star (Carl Zeiss, Alemania) con el objetivo de 100X con aceite de inmersión. En cada muestra se contaron un total de 100 células de la línea blanca, los resultados se expresaron en porcentaje.

#### *8.2.4.2.3 Determinación de citocinas en suero*

Las muestras de suero fueron analizadas para determinar los niveles de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL10) utilizando un kit comercial (Mouse Th1/Th2/Th17, número de catálogo: 560485; BD Bioscience-Pharmingen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los estándares y las muestras (50  $\mu$ L) se mezclaron con volúmenes iguales de perlas de captura de citocinas y se incubaron con los anticuerpos de detección conjugados con ficoeritrina (PE) durante 2 h a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente, se agregó 1 mL de buffer de lavado y

se centrifugaron a 200 g/5min, el sobrenadante fue retirado y nuevamente se resuspendieron las muestras en 300  $\mu$ L de buffer de lavado. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (BD Accuri C6, EE.UU.) y los datos se analizaron usando un software para generar resultados en formato gráfico y tabular de acuerdo con las instrucciones de funcionamiento. Se usó una curva estándar para calcular los niveles de citocinas.

#### *8.2.4.2.4 Medición de la proliferación de esplenocitos*

Los ratones fueron diseccionados para extraer el bazo. Los órganos fueron inmediatamente colocados en 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 y almacenados en hielo hasta su uso. Los bazos fueron preparados como se indica en la sección 8.2.4.1.2. La determinación de la proliferación celular se determinó mediante la utilización de azul de tripano (4%) y el conteo celular mediante una cámara de Neubauer.

#### *8.2.4.2.5 Medición de la actividad de MDA*

El malondialdehido (MDA) se cuantificó con el kit “Lipid Peroxidation (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay” (Biovision, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. El bazo fue homogenizando con el émbolo estéril de una jeringa. El homogenado se centrifugó con 1 mL de PBS (1500 rpm/5 min/4 °C) y se recuperó el sobrenadante. La curva estándar de cuantificación se preparó colocando diferentes volúmenes de una solución stock de MDA 2 mM (0,1, 2, 3, 4 y 5  $\mu$ L) en microtubos de 1.5 mL y se añadió H<sub>2</sub>O para completar 100  $\mu$ L. Los sobrenadantes de las muestras y las diluciones estándar (100  $\mu$ L) se mezclaron con 300  $\mu$ L de TBA y se incubaron a 95 °C/60 min para generar el aducto MDA-TBA. Las muestras se enfriaron a

temperatura ambiente en un baño de hielo durante 10 min, se centrifugaron (13000 rpm/ 3 min) y se recuperó el sobrenadante. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se colocarán 100 µL de cada muestra y se realizó la medición de las absorbancias a 532 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy HTX, BioTek, EE.UU.). Los resultados se reportaron como nmol de MDA por mg de tejido hepático (nmol/mg), calculados con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (nmol/mg)} = [(A/\text{mg})] \times 4 \times D$$

Donde:

-A: Cantidad de MDA en la muestra (calculada con la curva de calibración)

-mg: Cantidad de muestra utilizada

-Factor de corrección: 4

-D: Factor de dilución en caso de ser necesario

### **8.3 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando los programas Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office, EE.UU.), Minitab versión 19 (Minitab Inc., EE.UU.), GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software, Inc., EE.UU.), Statgraphics plus versión 5.1 (Statistical Graphics CorporationTM, EE.UU.) e IBM SPSS Statistics versión 28.0.1 (SPSS Inc., EE.UU.). La distribución normal de los datos se validó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov (K-S) con un nivel de significancia del 0.05. Los datos normales fueron examinados por análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los datos no paramétricos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (K-W) seguido de la prueba de Dunn-Bonferroni para datos

significativos ( $P \leq 0.05$ ). En el ANOVA, el contraste de medias se realizó por prueba de Fisher (LSD). Los valores se consideraron significativamente diferentes con un valor de  $P \leq 0.05$  (**Cuadro 9**).

**Cuadro 9.** Análisis estadístico.

<b>Ensayo</b>	<b>Prueba</b>	<b>Distribución de datos</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>Factor</b>	<b>Variable respuesta</b>
Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i>	Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos	Distribución normal	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía	Grupos	% Proliferación de esplenocitos
					ALT, AST, ALP (U/L), urea y creatinina (mg/dL)
Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i>	Efecto de la administración oral de las fracciones de papache	Distribución normal	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía	Grupos	Hemoglobina (g/dL), hematocrito (%), glóbulos rojos ( $10^6/\mu\text{L}$ ), blancos y plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )
					Índice de bazo e hígado (mg/g)
					Número de células vivas

**Cuadro 9.** Continuación.

Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i>	Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad celular de ratones inmunocomprometidos	Distribución normal	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía	Grupos	Índice de hígado (mg/g)
					Hemoglobina (g/dL), hematocrito (%), glóbulos rojos ( $10^6/\mu\text{L}$ ) y plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )
					Número de células vivas
					MDA (nmol/mg)
		Distribución no normal	Kruskal-Wallis Dunn-Bonferroni	Grupos	Índice de bazo y timo (mg/g)
					Glóbulos blancos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) y conteo diferencial (linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos neutrófilos segmentados y bandas)
					Citocinas (pg/mL)

Las diferencias estadísticas significativas se establecieron con un valor  $P < 0.05$ .

## IX. RESULTADOS

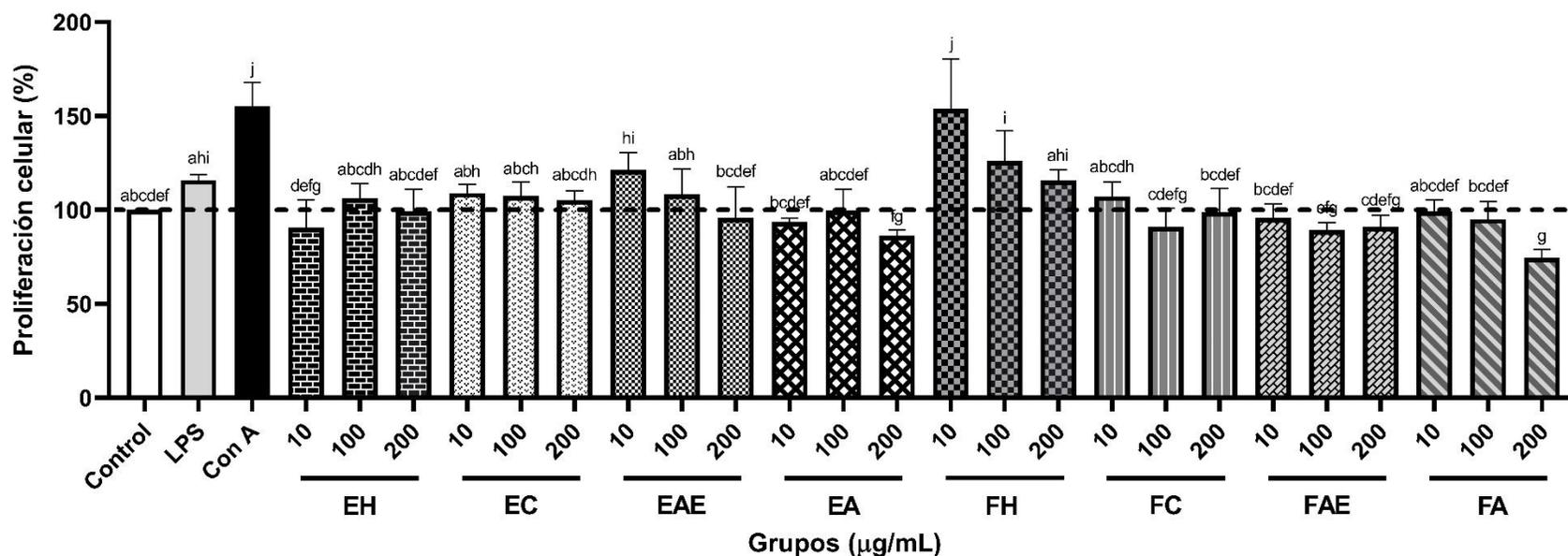
### 9.1. Actividad inmunomoduladora *in vitro*

#### 9.1.1. Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos

La actividad inmunomoduladora de los extractos y fracciones del fruto de papache se determinó por su efecto en el incremento en la proliferación de esplenocitos. Los extractos mostraron efecto con excepción del EA; el más activo fue el EAE y mostró un efecto concentración-respuesta inverso (10  $\mu\text{g/mL}$ , 21.36%), seguido del EC (10  $\mu\text{g/mL}$ , 8.99%) y el EH sólo registró actividad a 100  $\mu\text{g/mL}$  (6.15%). Para todos los extractos con actividad inmunomoduladora, los valores fueron estadísticamente similares al obtenido con el mitógeno LPS (15.85%) y el control negativo, con excepción del EAE a 10  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 7**). En relación con las fracciones, la FH y FC presentaron actividad inmunoestimuladora y un efecto concentración-respuesta inverso. La FH fue la más activa a todas las concentraciones (46.92 - 15.68%) y la única que alcanzó valores estadísticamente similares a los registrados para la Con A (55.21%) (**Figura 7**).

Por otra parte, algunos extractos y fracciones inhibieron la proliferación de esplenocitos: e.g., EH (10  $\mu\text{g/mL}$ ), EA (200  $\mu\text{g/mL}$ ), FC (100  $\mu\text{g/mL}$ ), FAE (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y FA (200  $\mu\text{g/mL}$ ), donde esta última muestra presentó diferencia estadística con el control negativo (**Figura 7**).

En general, la mayor actividad inmunomoduladora se registró para la FH (46.92 - 15.68%) y el EAE (21.36 - 8.40%) (**Figura 7**). Considerando la mayor actividad de la



**Figura 7.** Efecto del tratamiento con los extractos y fracciones de *R. echinocarpa* en la proliferación *in vitro* de esplenocitos. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ) (LSD = 16.57). Extractos (E) y fracciones (F) de *R. echinocarpa*: hexánico (EH y FH), clorofórmico (EC y FC), en acetato de etilo (EAE y FAE) y acuoso (EA y FA). Los controles positivos son lipopolisacárido (LPS) 10 µg/mL y concanavalina A (Con A) 5 µg/mL.

FH, los análisis posteriores se realizaron sólo con las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido.

## **9.2. Actividad inmunomoduladora *in vivo***

### **9.2.1. Efecto de la administración oral de las fracciones de papache**

#### *9.2.1.1. Pesos corporales e índice de bazo e hígado*

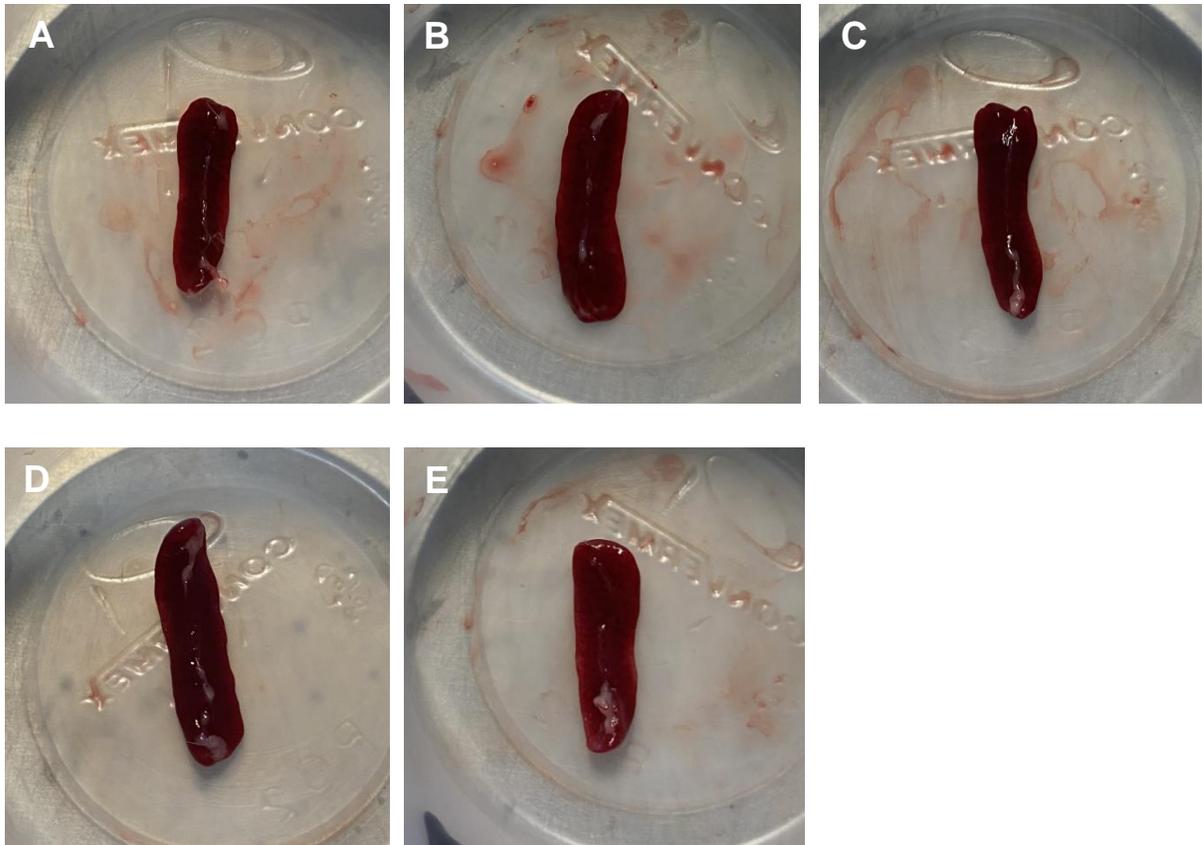
El peso corporal e índice de hígado de los ratones tratados con las fracciones fue estadísticamente similar a los animales del grupo control negativo (**Cuadro 10**). En cuanto al índice de bazo, sólo los ratones tratados con la fracción hexánica presentaron un valor (6.41 mg/g p.c.) estadísticamente mayor que los del grupo control (5.31 mg/g p.c.); mientras que las características de los bazos de ratones tratados con otras fracciones fueron similares a las del grupo control (**Figura 8 y Cuadro 10**).

#### *9.2.1.2. Medición de la proliferación de esplenocitos*

Los ratones tratados con las fracciones de papache, por vía oral, mostraron mayor proliferación de esplenocitos que los animales del grupo control ( $P \leq 0.05$ ), la FH (66%) y la FA (52%) fueron las más activas (**Figuras 9**).

#### *9.2.1.3. Parámetros hematológicos y bioquímicos*

Los parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas) de los ratones tratados con las fracciones de *R. echinocarpa* estuvieron dentro del rango de los valores de referencia. Al comparar contra los parámetros de animales del grupo control sano, animales tratados con la FA presentaron menores valores de hematocrito (39.37%) y glóbulos rojos ( $7.98 \times 10^6$ ),

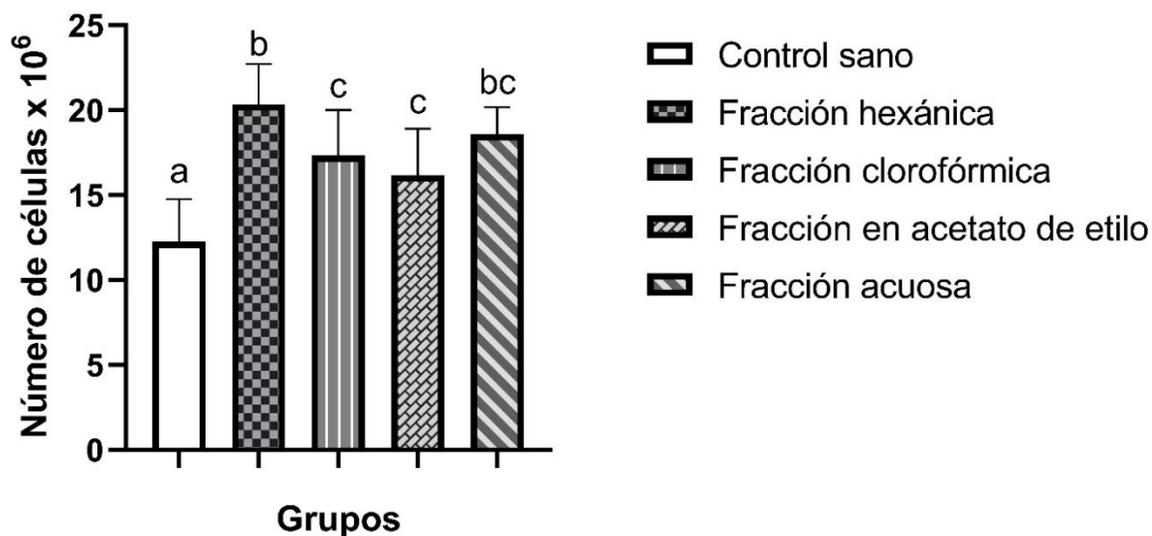


**Figura 8.** Efecto sobre el índice de bazo de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.). (A) Grupo control sano (CS); (B) fracción hexánica (FH); (C) fracción clorofórmica (FC); (C) fracción en acetato de etilo (FAE); (D) fracción acuosa (FA).

**Cuadro 10.** Efecto sobre la ganancia de peso y el índice de los órganos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.).

Grupos	Ganancia de peso (g)	Índice de órganos (mg/g)	
		Bazo	Hígado
Control sano	27.65 ± 2.36 <sup>a</sup>	5.31 ± 0.78 <sup>a</sup>	5.13 ± 0.40 <sup>a</sup>
Fracción hexánica	27.85 ± 1.81 <sup>a</sup>	6.41 ± 1.10 <sup>b</sup>	5.37 ± 0.15 <sup>a</sup>
Fracción clorofórmica	26.08 ± 2.50 <sup>a</sup>	5.42 ± 0.80 <sup>a</sup>	5.16 ± 0.33 <sup>a</sup>
Fracción en acetato de etilo	26.08 ± 2.44 <sup>a</sup>	5.06 ± 0.43 <sup>a</sup>	5.20 ± 0.26 <sup>a</sup>
Fracción acuosa	26.46 ± 1.93 <sup>a</sup>	4.92 ± 0.58 <sup>a</sup>	5.21 ± 0.20 <sup>a</sup>

Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ): Ganancia de peso LSD = 2.65, índice de bazo LSD = 0.92, índice de hígado LSD = 3.37.



**Figura 9.** Efecto sobre la proliferación de esplenocitos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.). Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 6$ ) y fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ) (LSD =  $2.87 \times 10^6$ ).

mientras que en el grupo tratado con la FC disminuyeron las plaquetas ( $616.80 \times 10^3$ ) ( $P \leq 0.05$ ) (**Cuadro 11**).

Los parámetros bioquímicos para el perfil hepático (AST, ALT y ALP) y renal (urea y creatinina) fueron estadísticamente similares entre los tratamientos y estuvieron dentro de los rangos de referencia (**Cuadro 12**).

## **9.2.2. Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad celular de ratones inmunocomprometidos**

### *9.2.2.1. Pesos corporales e índice de timo, bazo e hígado*

En el grupo control daño (CD), los animales tratados con ciclofosfamida mostraron menor peso que los del grupo control sano (CS) durante todo el tratamiento ( $P \leq 0.05$ ) (**Figura 10**). En los grupos tratados con fracción hexánica (FH-100, FH-200 y FH-400) se revirtió la disminución de peso inducida por ciclofosfamida, sin registrar diferencia significativa con el CS a partir del día 4 (**Figura 10**). Al final del experimento, el peso de los animales del CD fue 17.5% menor que el valor para el CS ( $P \leq 0.05$ ).

Los valores para los índices de timo y bazo mostraron comportamiento no paramétrico y la prueba de Kruskal-Wallis demostró una disminución significativa en los tratamientos con respecto al CS ( $P \leq 0.05$ ) (**Cuadro 13**). En comparación con el índice de timo del CS, la comparación por parejas mediante la prueba de Dunn-Bonferroni mostró valores estadísticamente menores para los animales de los grupos CD, FH-200 y FH-400 (**Cuadro 14**). En el contraste con el índice de timo del CD, sólo se registró diferencia significativa con los animales del CS (**Cuadro 14**). Por otro lado, el índice de bazo de los animales tratados mostró una tendencia a mejorar en relación

**Cuadro 11.** Efecto en parámetros hematológicos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.).

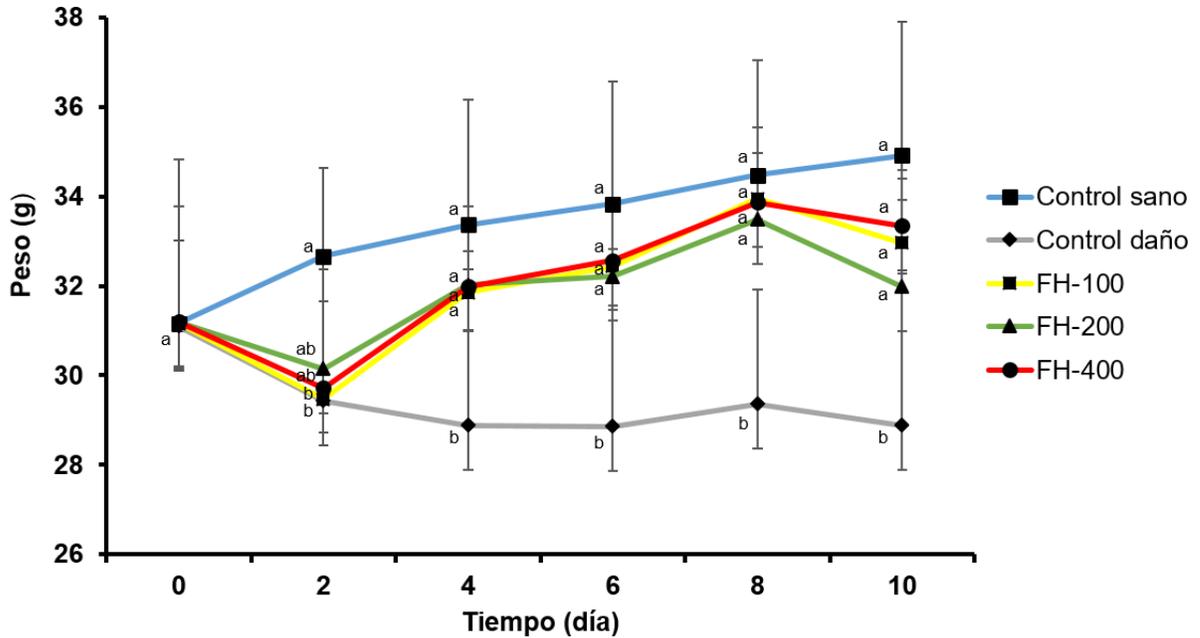
Grupos	Hemoglobina	Hematocrito	Glóbulos rojos	Glóbulos blancos	Plaquetas
	(g/dL)	%	(10 <sup>6</sup> /μL)	(10 <sup>3</sup> /μL)	(10 <sup>3</sup> /μL)
Control sano (CS)	13.85 ± 0.45 <sup>a</sup>	40.72 ± 0.37 <sup>ab</sup>	8.54 ± 0.32 <sup>ab</sup>	4.96 ± 1.24 <sup>a</sup>	772.20 ± 45.00 <sup>a</sup>
Fracción hexánica (FH)	13.84 ± 0.24 <sup>a</sup>	41.15 ± 0.39 <sup>a</sup>	8.56 ± 0.51 <sup>ab</sup>	4.79 ± 0.33 <sup>a</sup>	765.00 ± 98.10 <sup>a</sup>
Fracción clorofórmica (FC)	13.78 ± 0.26 <sup>a</sup>	40.08 ± 0.37 <sup>bc</sup>	8.26 ± 0.51 <sup>ab</sup>	4.45 ± 0.91 <sup>a</sup>	616.80 ± 62.40 <sup>b</sup>
Fracción en acetato de etilo (FAE)	13.50 ± 0.42 <sup>a</sup>	41.03 ± 0.79 <sup>ab</sup>	8.59 ± 0.48 <sup>a</sup>	5.53 ± 1.20 <sup>a</sup>	716.30 ± 82.90 <sup>ab</sup>
Fracción acuosa (FA)	13.67 ± 0.62 <sup>a</sup>	39.37 ± 1.69 <sup>c</sup>	7.98 ± 0.65 <sup>b</sup>	4.71 ± 1.01 <sup>a</sup>	735.80 ± 147.30 <sup>a</sup>
Valor de referencia	11.30 – 15.10	36.00 – 42.00	7.10 – 9.50	4.30 – 8.80	515.00 – 1150.00

Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6) y fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ): Hemoglobina LSD = 0.50, hematocrito LSD = 1.05, glóbulos rojos LSD = 0.60, glóbulos blancos LSD = 1.18, plaquetas LSD = 111.70. Valores de referencia tomado de Barrios y col. (2009) y Santos y col. (2016).

**Cuadro 12.** Efecto en parámetros bioquímicos de ratones tratados por vía oral con las fracciones del fruto de papache (100 mg/kg p.c.).

Grupos	AST <sup>1</sup>	ALT <sup>2</sup>	ALP <sup>3</sup>	Urea	Creatinina
	U/L			mg/dL	
Control sano (CS)	45.3 ± 9.80 <sup>a</sup>	32.5 ± 9.41 <sup>a</sup>	79.5 ± 33.70 <sup>a</sup>	44.5 ± 3.04 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.89 <sup>a</sup>
Fracción hexánica (FH)	36.9 ± 5.72 <sup>a</sup>	27.2 ± 6.55 <sup>a</sup>	101.5 ± 35.80 <sup>a</sup>	44.7 ± 4.52 <sup>a</sup>	1.8 ± 1.17 <sup>a</sup>
Fracción clorofórmica (FC)	37.5 ± 10.31 <sup>a</sup>	28.1 ± 4.14 <sup>a</sup>	83.9 ± 22.10 <sup>a</sup>	44.7 ± 3.53 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.82 <sup>a</sup>
Fracción en acetato de etilo (FAE)	38.3 ± 10.00 <sup>a</sup>	33.9 ± 2.51 <sup>a</sup>	113.7 ± 43.70 <sup>a</sup>	42.8 ± 3.22 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.75 <sup>a</sup>
Fracción acuosa (FA)	42.8 ± 9.64 <sup>a</sup>	31.7 ± 5.96 <sup>a</sup>	82.5 ± 33.50 <sup>a</sup>	46.3 ± 1.72 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.52 <sup>a</sup>
Valores de referencia	25.44 – 48.78	25.32 – 34.12	80.16 – 131.12	27.87 - 55.09	0.70 – 2.65

<sup>1</sup> AST: Aspartato aminotransferasa, <sup>2</sup> ALT: Alanina aminotransferasa, <sup>3</sup> ALP: Fosfatasa alcalina. Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6) y fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. No se presentaron diferencias significativas entre grupos (Fisher  $P \geq 0.05$ ): TGO LSD = 11.00, TGP LSD = 7.34, ALP LSD = 40.97, urea LSD = 3.96, creatinina LSD = 1.02. Valores de referencia tomado de Wolford y col. (1986), ENVIGO (2016) y de Souza-Barbosa y col. (2017).



**Figura 10.** Efecto de la administración oral, a ratones inmunocomprometidos con ciclofosfamida (Ci) de la fracción hexánica a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.) sobre el peso corporal de ratones durante el tratamiento. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar ( $n = 6$ ) y se analizaron por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre puntos a un mismo tiempo indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 13.** Efecto sobre el índice de los órganos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

Grupos	Índice de órganos (mg/g)		
	Timo <sup>1</sup>	Bazo <sup>1</sup>	Hígado
Control sano (CS)	1.99 ± 0.80	5.91 ± 0.86	5.13 ± 0.40 <sup>a</sup>
Control daño (CD)	0.54 ± 0.08	2.66 ± 0.26	5.37 ± 0.15 <sup>a</sup>
FH-100	0.68 ± 0.11	3.23 ± 0.75	5.16 ± 0.33 <sup>a</sup>
FH-200	0.50 ± 0.14	3.34 ± 0.75	5.20 ± 0.26 <sup>a</sup>
FH-400	0.59 ± 0.11	3.56 ± 0.42	5.21 ± 0.20 <sup>a</sup>

Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6). Los datos de índice de hígado mostraron distribución normal y fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. No se presentaron diferencias significativas entre grupos (Fisher  $P \geq 0.05$ ): Índice de hígado LSD = 3.37. <sup>1</sup> Los datos de índice de bazo y timo fueron no paramétricos y la prueba de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ) mostró diferencias significativas entre tratamientos (Ver **Cuadro 14 y 15**).

**Cuadro 14.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores del índice de timo de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
<b>FH-200</b>	
Control daño	1.00
FH-400	1.00
FH-100	0.62
Control sano	0.002*
<b>Control daño</b>	
FH-400	1.00
FH-100	1.00
Control sano	0.006*
<b>FH-400</b>	
FH-100	1.00
Control sano	0.043*
<b>FH-100</b>	
Control sano	0.66

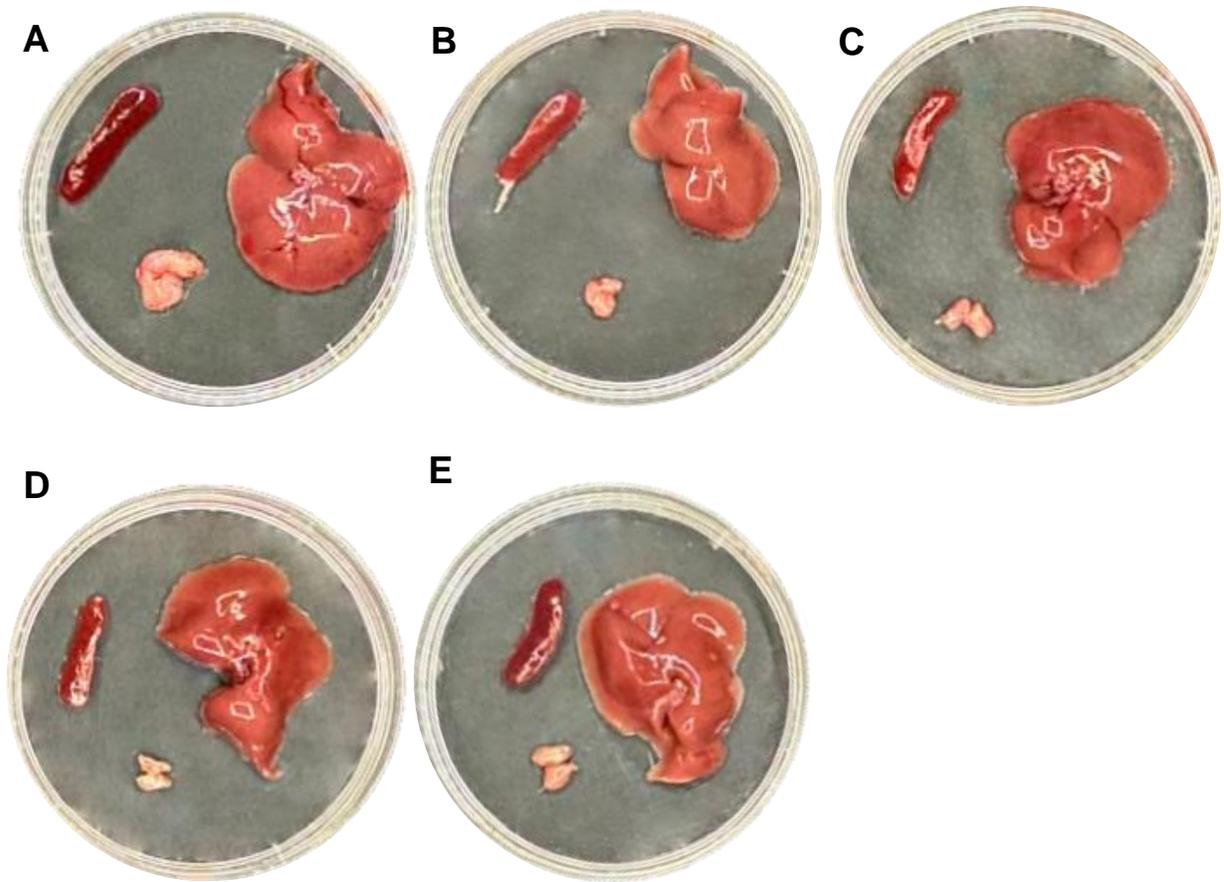
Comparación por pares. \* Indica diferencias significativas método *post hoc* de Dunn-Bonferroni ( $P \leq 0.05$ )

con los del CD (**Figura 11** y **Cuadro 15**), la prueba Dunn-Bonferroni indicó diferencia significativa con respecto al CS (5.91 mg/g p.c.) del grupo CD (2.66 mg/g p.c.) y FH-100 (3.23 mg/g p.c.) ( $P \leq 0.05$ ) (**Cuadros 15**). En el caso del índice de hígado, los datos para los grupos tratados con la FH y el CS fueron estadísticamente similares ( $P \geq 0.05$ ) (**Cuadro 15**).

#### 9.2.2.2. *Conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas*

En contraste con el parámetro glóbulos blancos, los parámetros hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos y plaquetas presentaron distribución normal. Los parámetros hematológicos de los ratones del grupo CS estuvieron dentro de los valores de referencia con excepción del hematocrito (**Cuadro 16**). En contraste, los valores para todos los grupos de animales tratados con ciclofosfamida fueron inferiores a los valores de referencia y a los registrados para el CS ( $P \geq 0.05$ ), excepto para los glóbulos rojos y plaquetas del grupo FH-200 (**Cuadro 16**). Los datos de glóbulos blancos fueron analizados por métodos no paramétricos y se observaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $P \leq 0.05$ ). En el análisis de Dunn-Bonferroni se registró que el valor del CS ( $4.60 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) fue significativamente mayor que el de los grupos CD ( $2.23 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), FH-400 ( $2.15 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) y FH-100 ( $2.09 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) (**Cuadros 16** y **17**).

La distribución de probabilidad del conteo diferencial de glóbulos blancos no fue normal (Kolmogorov-Smirnov,  $P \leq 0.05$ ) (**Cuadro 18**). En este contexto, el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en linfocitos, monocitos y neutrófilos segmentados ( $P \leq 0.05$ ); mientras que los



**Figura 11.** Efecto sobre el índice de los órganos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.). (A) Grupo control sano (solución salina); (B) grupo control daño (ciclofosfamida + solución salina); (C) grupo FH-100 (ciclofosfamida + fracción hexánica); (D) grupo FH-200 (ciclofosfamida + fracción hexánica); (E) grupo FH-400 (ciclofosfamida + fracción hexánica).

**Cuadro 15.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores del índice de bazo de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
<b>Control daño</b>	
FH-100	1.00
FH-200	0.95
FH-400	0.20
Control sano	0.00*
<b>FH-100</b>	
FH-200	1.00
FH-400	1.00
Control sano	0.04*
<b>FH-200</b>	
FH-400	1.00
Control sano	0.09
<b>FH-400</b>	
Control sano	0.49
Comparación por pares. * Indica diferencias significativas método <i>post hoc</i> de Dunn-Bonferroni (P < 0.05)	

**Cuadro 16.** Efecto en parámetros hematológicos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

Grupos	Hemoglobina	Hematocrito	Glóbulos rojos	Glóbulos blancos <sup>1</sup>	Plaquetas
	(gr/dL)	%	(10 <sup>6</sup> /μL)	(10 <sup>3</sup> /μL)	(10 <sup>3</sup> /μL)
Control sano (CS)	12.22 ± 0.61 <sup>a</sup>	35.15 ± 1.81 <sup>a</sup>	7.29 ± 0.72 <sup>a</sup>	4.60 ± 0.77	774.00 ± 73.80 <sup>ab</sup>
Control daño (CD)	10.65 ± 0.54 <sup>b</sup>	30.28 ± 1.57 <sup>b</sup>	6.32 ± 0.45 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.27	601.50 ± 83.50 <sup>c</sup>
FH-100	10.21 ± 0.77 <sup>b</sup>	31.02 ± 1.09 <sup>bc</sup>	6.74 ± 0.34 <sup>bc</sup>	2.09 ± 0.37	662.80 ± 54.10 <sup>c</sup>
FH-200	10.85 ± 0.60 <sup>b</sup>	32.65 ± 0.94 <sup>c</sup>	6.97 ± 0.32 <sup>ab</sup>	2.91 ± 0.68	861.20 ± 94.00 <sup>a</sup>
FH-400	10.89 ± 0.63 <sup>b</sup>	31.78 ± 1.33 <sup>bc</sup>	6.60 ± 0.31 <sup>bc</sup>	2.15 ± 0.80	687.50 ± 52.10 <sup>bc</sup>
Valor de referencia	11.30 – 15.10	36.00 – 42.00	7.10 – 9.50	4.30 – 8.80	515.00 – 1150.00

Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6). Los datos con distribución normal (hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos y plaquetas) fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ): Hemoglobina LSD = 0.75, hematocrito LSD = 1.64, glóbulos rojos LSD = 0.54, plaquetas LSD = 87.24. <sup>1</sup>Datos no paramétricos (glóbulos blancos) se empleó Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ) y mostró diferencias significativas entre tratamientos (Ver **Cuadro 17**). Valores de referencia tomado de Barrios y col. (2009) y Santos y col. (2016).

**Cuadro 17.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de glóbulos blancos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
<b>FH-400</b>	
FH-100	1.00
Control daño	1.00
FH-200	0.64
Control sano	0.004*
<b>FH-100</b>	
Control daño	1.00
FH-200	0.98
Control sano	0.008*
<b>Control daño</b>	
FH-200	1.00
Control sano	0.04*
<b>FH-200</b>	
Control sano	0.88

Comparación por pares. \* Indica diferencias significativas método post hoc de Dunn-Bonferroni ( $P \leq 0.05$ )

**Cuadro 18.** Efecto en el conteo diferencial de glóbulos blancos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

Grupos	Leucocitos					
	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos	Segmentados	Banda
Control sano (CS)	68.50 ± 8.69	4.83 ± 2.40	0.17 ± 0.41	0.00 ± 0.00	26.50 ± 7.12	0.17 ± 0.41
Control daño (CD)	33.17 ± 8.75	2.83 ± 2.40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	63.83 ± 8.26	0.17 ± 0.41
FH-100	24.17 ± 7.44	2.67 ± 1.51	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	73.17 ± 7.33	0.00 ± 0.00
FH-200	27.00 ± 8.27	1.83 ± 1.60	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	70.83 ± 8.45	0.33 ± 0.52
FH-400	24.83 ± 5.00	0.67 ± 1.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	74.17 ± 4.49	0.33 ± 0.52
Valor de referencia (ratón < 1 año)	66.00 – 88.00	0.10 – 3.90	0.00 - 2.00	0.00 - 0.00	10.10 - 27.90	0.00 - 0.20

Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6). Datos no paramétricos se empleó Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ) y se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (linfocitos, monocitos y segmentados) (Ver **Cuadro 19, 20 y 21**). Valores de referencia tomados de Wolford y col. (1986).

porcentajes de eosinófilos, basófilos y bandas son similares a los valores de referencia, sin haber diferencia entre controles y grupos tratados con la FH (Kruskal-Wallis,  $P \geq 0.05$ ). El análisis Dunn-Bonferroni en la comparación de los grupos por pares de los valores de linfocitos mostró disminución significativa entre los grupos FH-100 (24.17%), FH-400 (24.83%) y FH-200 (27.00%) con el CS (68.50%) ( $P \leq 0.05$ ) (**Cuadros 18 y 19**). En el caso de los monocitos, se observaron diferencias únicamente entre el grupo FH-400 (0.67%) y CS (4.83%); donde el grupo FH-400 fue el único que estuvo fuera del rango de referencia (**Cuadros 18 y 20**). Por último, en neutrófilos segmentados se registró un aumento significativo en los grupos FH-100 (73.17%), FH-200 (70.83%) y FH-400 (74.17%) con respecto al CS (26.50%); asimismo, todos los valores fueron superiores al valor de referencia (**Cuadros 18 y 21**).

#### *9.2.2.3. Medición de la proliferación de esplenocitos*

El tratamiento con ciclofosfamida disminuyó la proliferación de esplenocitos en aproximadamente 54% con respecto a los animales del grupo CS ( $15.55 \times 10^6$ ). La administración de la FH disminuyó el efecto negativo de la ciclofosfamida, los ratones presentaron valores del 23% al 40% menores que los del CS; los mejores resultados se obtuvieron con la dosis baja (FH-100) y media (FH-200), sin presentar diferencia estadística entre ellas (**Figura 12**).

#### *9.2.2.4. Determinación de citocinas en suero*

El efecto en los niveles de citocinas de ratones tratados con la FH solo se observó para TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 (**Cuadro 22**). Los niveles de otras citocinas en el CS fueron las siguientes (pg/mL): IL-10 =  $1.81 \pm 2.27$ ; IL-17A =  $0.53 \pm 0.64$ ; IL-4 =  $13.86 \pm 7.02$ .

**Cuadro 19.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de linfocitos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
FH-100	
FH-400	1.00
FH-200	1.00
Control daño	1.00
Control sano	0.005*
FH-400	
FH-200	1.00
Control daño	1.00
Control sano	0.009*
FH-200	
Control daño	1.00
Control sano	0.03*
Control daño	
Control sano	0.35

Comparación por pares. \* Indica diferencias significativas método *post hoc* de Dunn-Bonferroni ( $P \leq 0.05$ )

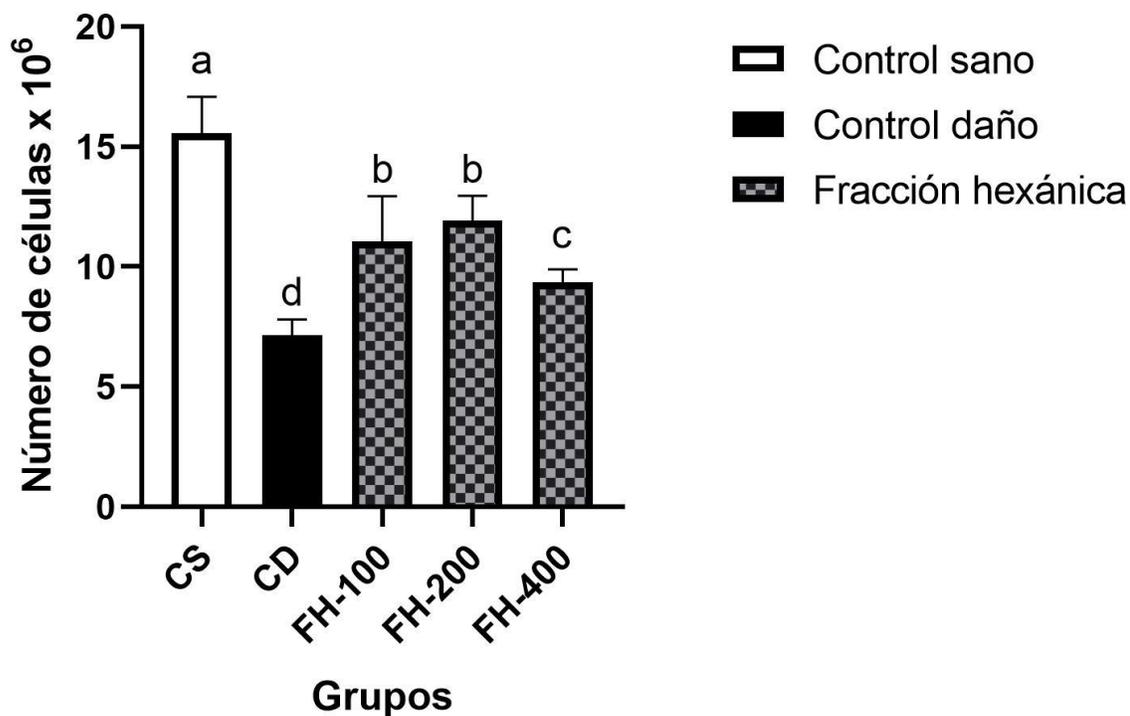
**Cuadro 20.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de monocitos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
FH-400	
FH-200	1.00
Control daño	0.66
FH-100	0.60
Control sano	0.014*
FH-200	
Control daño	1.00
FH-200	1.00
Control sano	0.45
Control daño	
FH-100	1.00
Control sano	1.00
FH-100	
Control sano	1.00

Comparación por pares. \* Indica diferencias significativas método *post hoc* de Dunn-Bonferroni ( $P \leq 0.05$ )

**Cuadro 21.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de neutrófilos segmentados de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
<b>Control sano</b>	
Control daño	0.55
FH-200	0.037*
FH-100	0.008*
FH-400	0.003*
<b>Control daño</b>	
FH-200	1.00
FH-100	1.00
FH-400	0.88
<b>FH-200</b>	
FH-100	1.00
FH-400	1.00
<b>FH-100</b>	
FH-400	1.00
Comparación por pares. * Indica diferencias significativas método <i>post hoc</i> de Dunn-Bonferroni ( $P \leq 0.05$ )	



**Figura 12.** Efecto sobre la proliferación de esplenocitos de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.). Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 6$ ) y fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ) ( $LSD = 1.48 \times 10^6$ ).

**Cuadro 22.** Efecto sobre la expresión de citocinas de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

Grupos	Citocinas (pg/mL)		
	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$ <sup>1</sup>	IL-6 <sup>1</sup>
Control sano (CS)	90.50 $\pm$ 46.5 <sup>ab</sup>	73.48 $\pm$ 14.63	59.84 $\pm$ 14.47
Control daño (CD)	113.00 $\pm$ 39.6 <sup>a</sup>	17.16 $\pm$ 7.95	9.52 $\pm$ 2.32
FH-100	82.91 $\pm$ 17.42 <sup>ab</sup>	22.66 $\pm$ 12.77	26.48 $\pm$ 3.77
FH-200	107.27 $\pm$ 14.95 <sup>ab</sup>	18.27 $\pm$ 4.94	9.68 $\pm$ 1.12
FH-400	62.79 $\pm$ 7.15 <sup>b</sup>	20.21 $\pm$ 0.40	0.55 $\pm$ 1.09

Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar (n = 6). Datos con distribución normal (TNF- $\alpha$ ) fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ) (LSD = 44.24). <sup>1</sup>Datos no paramétricos se empleó la prueba de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ) mostrando diferencias significativas entre tratamientos (IL-6) (Ver **Cuadro 23**).

Los niveles de estas citocinas disminuyeron en los animales del CD, IL-10 e IL-4 fueron indetectables, mientras que el valor de IL-17 fue de  $0.41 \pm 0.47$  pg/mL. De manera general, los niveles de las citocinas IL-10, IL-17A, IL-4 e IL-2 fueron indetectables en los animales tratados con la FH.

Los valores de la citocina TNF- $\alpha$  fueron los únicos que mostraron distribución normal. En relación con los niveles de TNF- $\alpha$  de los animales del CD (113 pg/mL), los animales tratados con FH disminuyeron sus niveles (62.79-107.27 pg/mL), resultando estadísticamente similares a los niveles del CS (90.50 pg/mL). Al respecto, sólo los niveles de TNF- $\alpha$  de los animales del grupo FH-400 (62.79 pg/mL) fueron estadísticamente diferentes a los del CD (113.00 pg/mL) ( $P \leq 0.05$ ).

El análisis por Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre grupos para los valores de IL-6 ( $P \leq 0.05$ ) pero no para IFN- $\gamma$  (**Cuadro 22**). El análisis Dunn-Bonferroni en la comparación de los grupos por pares de los valores de IL-6 mostró diferencias significativas entre la FH-400 (0.55 pg/mL) y los grupos FH-100 (26.48 pg/mL) y CS (59.84 pg/mL) (**Cuadros 22 y 23**).

#### 9.2.2.5. Medición de la actividad de MDA

Los animales tratados con ciclofosfamida (grupo CD) mostraron mayores niveles de malondialdehído (MDA) que los del grupo CS ( $P \leq 0.05$ ), debido al estrés oxidativo (**Cuadro 24**). Los tratamientos con la FH fueron insuficientes para disminuir los niveles de MDA hasta los valores del grupo CS, resultando en valores estadísticamente similares al CD (**Cuadro 24**).

**Cuadro 23.** Prueba de Dunn-Bonferroni para contrastar los valores de IL-6 de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Comparación por parejas (grupos)</b>	<b>Valor de significación</b>
<b>FH-400</b>	
FH-200	1.00
Control daño	1.00
FH-100	0.041*
Control sano	0.001*
<b>FH-200</b>	
Control daño	1.00
FH-100	1.00
Control sano	0.15
<b>Control daño</b>	
FH-100	1.00
Control sano	0.18
<b>FH-100</b>	
Control sano	1.00

Comparación por pares. \* Indica diferencias significativas método *post hoc* de Dunn-Bonferroni ( $P \leq 0.05$ )

**Cuadro 24.** Efecto de biomarcador de estrés oxidativo (MDA) de ratones tratados por vía oral con la fracción hexánica del fruto de papache a tres concentraciones diferentes (FH-100, FH-200 y FH-400 mg/kg p.c.).

<b>Grupos</b>	<b>Malondialdehido (MDA) (nmol/mg)</b>
Control sano (CS)	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
Control daño (CD)	0.04 ± 0.00 <sup>b</sup>
FH-100	0.04 ± 0.01 <sup>b</sup>
FH-200	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>
FH-400	0.03 ± 0.00 <sup>b</sup>

Los resultados son la media ± desviación estándar (n = 6). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una sola vía, seguido de comparación múltiple de medias. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre grupos (Fisher  $P \leq 0.05$ ) (LSD = 0.01).

## X. DISCUSIÓN

### 10.1. Actividad inmunomoduladora *in vitro*

#### 10.1.1. Efecto de extractos y fracciones en la proliferación de esplenocitos

La mayor actividad inmunomoduladora *in vitro* la presentó el EAE (21.36 y 8.40% a una concentración de 10 y 100 µg/mL, respectivamente) y la FH (46.92, 26.11 y 15.68% a una concentración de 10, 100 y 200 µg/mL, respectivamente); los valores registrados fueron estadísticamente similares a los obtenidos con LPS (15.85%). La FH fue la más activa y alcanzó valores similares a lo obtenido con la Con A (55.21%). Los mitógenos LPS y Con A se utilizan comúnmente en ensayos de proliferación celular. El LPS es una endotoxina bacteriana de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, un potente iniciador de la inflamación y estimula la proliferación de las células B. El LPS es reconocido por el receptor tipo toll 4 (TLR4) de la membrana de macrófagos y desencadena vías de señalización inflamatorias. El LPS activa el factor nuclear kappa de las células B (NF-κB) e incrementa los niveles de mediadores proinflamatorios (*e.g.*, NO, PGE2, TNF-α, IL-1β e IL-6) (Fang y col., 2021; Huang y col., 2022). Por otro lado, la concanavalina A (Con A) es una lectina vegetal que une carbohidratos a los TCR, activando la señalización intracelular e induciendo la activación y proliferación de células T (Khan y col., 2022). Por lo tanto, los resultados sugieren que el EAE y la FH son mitógenos inespecíficos, afectando tanto a células B como a T, pero la FH tiene mayor impacto en las células T.

Una gran cantidad de estudios avalan la actividad inmunomoduladora de extractos y fracciones de plantas utilizadas en medicina tradicional, así como de algunos de sus compuestos. Entre los componentes con actividad inmunomoduladora

están los galactolípidos, saponinas, proantocianidinas, esteroides y compuestos fenólicos (e.g., flavonoides) (Bushmeleva y col., 2021). Al respecto, dos estudios mostraron el efecto inmunomodulador y antioxidante del extracto en acetato de etilo de *Crataegus azarolus* y del extracto metanólico de *Gymnema sylvestre*, ambos extractos inducen la proliferación de células B y T y mejoran la actividad fagocítica. La actividad de estos extractos fue atribuida al alto contenido de flavonoides en *C. azarolus* y de saponinas en *G. sylvestre*, respectivamente (Singh y col., 2015; Mustapha y col., 2016).

Reportes fitoquímicos han demostrado que la FH del fruto del papache contiene flavonoides (Zatarain-Irigoyen, 2022; Alaníz-Cuevas, 2023); compuestos que podrían contribuir a la actividad inmunomoduladora registrada en esta investigación. La actividad inmunomoduladora de los flavonoides ya ha sido reportada y se han propuesto diferentes mecanismos de acción (L. Han y col., 2022):

- Mejoran la actividad de las células NK.
- Reducen la maduración y diferenciación de las células dendríticas a través de la inhibición de moléculas coestimuladoras que contribuyen a la activación de las células T.
- Suprimen la producción de trampas extracelulares y estallido oxidativo de los neutrófilos, inhiben la activación de los macrófagos de tipo M1 y promueven la transformación de M1 a M2.
- Facilitan la proliferación de células Treg y mejoran la actividad de las células citotóxicas.
- Muestran efectos inhibidores o activadores sobre las células B.

Los mecanismos antes mencionados podrían estar implicados en la actividad inmunomoduladora de la FH. En particular, la presente investigación demuestra su efecto en la proliferación de células B y T y en su posible activación. El aumento de la proliferación de esplenocitos es comparable con lo registrado para melaninas solubles de papache (MSP) (57.25 – 24.1%) (Gil-Avilés, 2020). Asimismo, el efecto es similar a lo reportado para los extractos hidroalcohólicos de tres especies de *Echeveria* (34 - 20%) (Heredia-Mercado, 2020). En estos estudios se sugiere que la actividad está asociada a la presencia de compuestos fenólicos, de la misma manera que la FH del presente estudio. Mediante el mismo método, Khandelwal y Choudhary (2020) evaluaron el potencial inmunomodulador del extracto hidrometanólico de la corteza de *Neolamarckia cadamba* (Rubiaceae) y observaron resultados similares a los de la presente investigación (48.87% a 50 µg/mL y 20.87% a 20 µg/mL), pero inferiores a lo registrado a concentraciones más altas (209.06% a 500 µg/mL y 159.7% a 250 µg/mL). La actividad inmunomoduladora de otras rubiáceas ya se ha reportado, pero utilizando otros métodos. Aro y col. (2019) estudiaron el efecto inmunomodulador en la línea celular U937 estimulada con LPS de los extractos acetónicos de cinco especies de rubiáceas (*Cephalanthus natalensis*, *Cremastra triflora*, *Oxyanthus speciosus*, *Pavetta lanceolata* y *Psychotria zombamontana*). Los autores evaluaron seis citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), registrando que los extractos tienen un efecto en la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) y Th2 (IL-4, IL-5) y sugieren su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Cano-Campos y col. (2011) y Alaníz-Cuevas (2023) caracterizaron muestras de papache y registraron que los principales componentes de la FH eran el estigmasterol,

$\beta$ -sitosterol y campesterol, los cuales son fitoesteroles comúnmente identificados en aceites vegetales y de los cuales ya se ha demostrado su actividad inmunomoduladora: afectan la actividad de linfocitos, incrementan la proliferación de esplenocitos y mejoran la respuesta antioxidante (Rawal y col., 2015; Sangwan y col., 2022). En este sentido, el extracto en diclorometano de *Terminalia brownii* afectó la respuesta inmunitaria de ratones inmunocomprometidos e incrementó los niveles de TNF- $\alpha$  y NO en macrófagos. En la muestra se identificaron  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol, compuestos a los que se asoció la actividad inmunomoduladora. Dicho estudio concluyó que el extracto en diclorometano de *Terminalia brownii* tiene un efecto inmunopotenciador sobre la respuesta inmunitaria innata (Mbiri y col., 2023). Por lo tanto, se sugiere que el efecto inmunopotenciador de la FH del fruto de papache podría estar asociado a sus componentes fenólicos y esteroides. De esta manera, la FH podría usarse en el tratamiento de enfermedades donde el sistema inmunológico se encuentra inmunodeprimido. Por otro lado, algunos extractos y fracciones indujeron menor proliferación de esplenocitos que el control negativo y podría sugerirse un efecto inmunosupresor.

En investigaciones previas se registraron diferencias entre actividades biológicas (antioxidante *in vitro* y celular, antiinflamatoria *in vitro* e inmunomoduladora *in vitro*) y composición química de extractos obtenidos por el método secuencial y fracciones obtenidas por partición líquido-líquido. Las fracciones presentaron mayor contenido de fenólicos y la mayor actividad antioxidante celular; asimismo, la fracción hexánica destacó en su actividad antiinflamatoria *in vitro* (Pinto-González, 2022; Zatarain-Irigoyen, 2022). En este estudio, la FH mostró mayor efecto mitogénico *in vitro* que

otros extractos y fracciones; consecuentemente, los estudios posteriores se enfocaron en evaluar las fracciones y en particular la FH. Las diferencias en composición y actividad biológica entre extractos y fracciones ponen de manifiesto la necesidad de estandarizar los métodos de extracción para obtener las muestras con mayor actividad.

## **10.2. Actividad inmunomoduladora *in vivo***

### **10.2.1. Efecto de la administración oral de las fracciones de papache**

#### *10.2.1.1. Pesos corporales e índice de bazo e hígado*

El peso corporal de los ratones no mostró un cambio radical al finalizar el tratamiento. La ausencia de un efecto sobre las proporciones corporales de los ratones indica que la muestra no generó hinchazón, atrofia o hipertrofia (Choudhury y col., 2018; Yusuf y col., 2018).

El índice de bazo de los ratones tratados con la FH fue más alto que el de los animales del control negativo y de los tratados con las otras fracciones. El peso e índice de bazo cambian con respecto a la respuesta inmunitaria no específica. Se ha informado que el efecto inmunomodulador puede mejorar el índice de bazo. En ratones infectados por vía intraperitoneal con *Staphylococcus aureus*, los polisacáridos de vainas de okra (*Abelmoschus esculentus*) mejoran la respuesta inmune, incrementando la proliferación de esplenocitos y los niveles de TNF- $\alpha$  y disminuyendo los niveles de IL-17. Los autores discuten que el aumento en el índice de bazo se debe a la estimulación de la proliferación de esplenocitos (Wahyuningsih y col., 2018).

Los resultados del índice de hígado de las fracciones no mostraron valores diferentes contra el grupo control negativo, lo que indica que el órgano no se vio afectado con la administración de las muestras (Liu y col., 2018).

#### 10.2.1.2. Medición de la proliferación de esplenocitos

En la evaluación de la actividad inmunomoduladora *in vivo*, el tratamiento de los ratones con la FH indujo un mayor incremento en la proliferación de esplenocitos con respecto a las otras tres fracciones y al grupo control. Los resultados concuerdan con la mayor actividad mitogénica *in vitro* de la FH y con el aumento del tamaño del bazo en los ratones tratados con la fracción.

En nuestro equipo de trabajo, Pinto-González (2022) demostró que la FH del fruto de *R. echinocarpa* estabiliza la membrana de glóbulos rojos expuestos a soluciones hipotónicas o a calentamiento, lo que sugiere que presenta actividad antiinflamatoria. A su vez, Zatarain-Irigoyen (2022) demostró que la FH disminuyó en 61% la inflamación inducida por carragenina en pata de ratón, resultando mejor que el fármaco indometacina que sólo alcanzó un 18%. Estos resultados indican que la FH de *R. echinocarpa* es capaz de reclutar células esenciales para disminuir el daño tisular y la respuesta inflamatoria.

La actividad inmunomoduladora *in vivo* de diferentes plantas se ha determinado empleando diferentes métodos. El efecto inmunomodulador del extracto metanólico crudo y fracciones (hexánica, en acetato de etilo y metanólico) de las hojas de *Sida acuta* se evaluó en el modelo de respuesta de hipersensibilidad retardada en ratones inmunizados con glóbulos rojos de ovejas, después de ocho días de tratamiento con el extracto y fracciones, los ratones fueron retados con el antígeno en la almohadilla

de la pata del ratón. El extracto crudo de *S. acuta* y la fracción hexánica mejoraron la respuesta de hipersensibilidad; asimismo, los autores demostraron que estas muestras activan la fagocitosis de polimorfonucleares sobre *Candida albicans*. El análisis fitoquímico mostró la presencia de flavonoides, terpenoides, saponinas y alcaloides, compuestos que pudieran ser los responsables de la inmunomodulación (Alaefuna y col., 2021). En otra investigación, el extracto etanólico y acuoso de hojas de *Prosopis cineraria* activaron la producción de óxido nítrico y superóxidos, así como la liberación de enzimas lisosomales en macrófagos peritoneales. En los ensayos *in vivo* en ratones, estos extractos incrementaron la actividad fagocítica y la respuesta de hipersensibilidad retardada a ovoalbúmina; asimismo, a la concentración más alta (200 mg/kg p.c.), ambos extractos mejoraron la respuesta inmune humoral. El análisis fitoquímico de estos extractos mostró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y fitoesteroles (e.g., campesterol, estigmasterol y colesterol) (Patil y col., 2021).

La actividad inmunomoduladora del estigmasterol puro ya ha sido evaluada. N. R. Han y col. (2022) evaluaron el efecto inmunomodulador y antioxidante de una receta tradicional coreana denominada Sambu-Tang (SBT) y que se prepara con las plantas *Panax ginseng* y *Aconitum carmichaeli*. El extracto de SBT y el estigmasterol, compuesto activo en el SBT, incrementaron la proliferación de esplenocitos, alcanzando valores similares a los obtenidos con LPS. Asimismo, los autores registraron un aumento en el índice del bazo en comparación con el control sano, esto en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida. También el estudio mostró incremento en los niveles de secreción de óxido nítrico. Los resultados soportan la

actividad antioxidante y como inmunopotenciador del extracto de SBT y del estigmasterol. Este compuesto es mayoritario en la FH y puede ser uno de los principales contribuyentes a la actividad inmunomoduladora de la FH del fruto de papache.

En el ensayo *in vitro*, la FA no mostró actividad mitogénica; en contraste, la FA fue segunda mejor en el incrementar la proliferación *in vivo* de esplenocitos. La FA presenta flavonoides, cardiotónicos y saponinas (Zatarain-Irigoyen, 2022); compuestos de estas familias inducen componentes celulares de la respuesta innata y la producción de anticuerpos (Behl y col., 2021). Además, polisacáridos presentes en muestras acuosas son capaces de mejorar la respuesta inmunológica y están relacionados directamente a la actividad inmunológica intestinal (Zeng y col., 2020). Akhtar y col. (2020) reportaron que polisacáridos de la cáscara de garbanzo mostraron una potente actividad inmunomoduladora y antioxidante, al mejorar los índices de bazo y timo y aumentar los niveles de enzimas antioxidantes.

#### 10.2.1.3. *Parámetros hematológicos y bioquímicos*

Los ratones tratados con las fracciones de papache presentaron parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) en el rango de los valores de referencia, indicando que las fracciones no generaron efectos tóxicos ni promovieron anemia en los ratones (Batiha y col., 2020).

Los parámetros bioquímicos ALT y AST y ALP, determinados en suero, proporcionan información sobre la función hepática y daño hepático (Dragostin y col., 2022). Los parámetros para los ratones tratados con las fracciones de papache estuvieron dentro de los valores de referencia, descartando toxicidad hepática. Por

otro lado, la urea y creatinina se han utilizado como biomarcadores de enfermedad renal crónica y lesión renal aguda (Gunst y col., 2019; Fortunato-Seixas y col., 2021). En la presente investigación, los niveles creatinina y urea de los ratones tratados con las fracciones y los del grupo control están dentro de los valores de referencia, lo que sugiere que las fracciones no tienen efecto patológico en el riñón.

### **10.2.2. Efecto de la fracción hexánica sobre la anti-oxidación e inmunidad celular de ratones inmunocomprometidos**

#### *10.2.2.1. Pesos corporales e índice de timo, bazo e hígado*

La ciclofosfamida es un fármaco quimioterapéutico perteneciente a la clase de agentes alquilantes, el cual provoca entrecruzamientos en el ADN, silenciamiento de la expresión del ADN y finalmente apoptosis. La ciclofosfamida se utiliza ampliamente en el tratamiento de tumores (*e.g.*, leucemia, linfoma, cáncer de mama) (Hughes y col., 2018); sin embargo, también puede provocar efectos adversos sobre células sanas y generar inmunosupresión, lo cual conducirá a una pérdida de peso corporal y daño en los órganos inmunitarios en animales (Qi y col., 2018; Wang y col., 2018). En la presente investigación, los primeros 3 días de tratamiento con ciclofosfamida produjeron una disminución significativa en el peso corporal de los ratones, indicando que se generó la inmunosupresión. Sin embargo, los ratones tratados con la FH (FH-100, FH-200 y FH-400) recuperaron su peso corporal a partir del día 4 y no mostraron diferencias significativas con el grupo CS. Los extractos etanólicos de *Curcuma longa* y *Carthamus tinctorius* indujeron un efecto similar, los ratones tratados con los extractos mostraron mayor peso que los del grupo CD tratado sólo con ciclofosfamida (Park y col., 2022). Este aumento de peso generado por la FH pudiera relacionarse

con su alto contenido de esteroides. Al respecto, animales tratados con una dieta rica en fitoesteroides muestran mejor digestión de los nutrientes, aumento en la secreción de hormonas del crecimiento, promoción de la síntesis de proteínas, regulación del sistema inmunológico y aumento en la resistencia a enfermedades (Feng y col., 2020).

El bazo y timo son dos órganos inmunológicos vitales donde los linfocitos B y T se desarrollan, diferencian, maduran y colonizan para generar respuestas inmunitarias, incluyendo diferenciación y proliferación de células inmunológicas, lo que conllevará a un aumento en el índice de estos órganos, mientras que su disminución indica una reducción del número y la respuesta de células inmunitarias (Tukshipa y Chakravorty, 2022). El efecto de plantas con actividad inmunomoduladora sobre el índice de estos órganos puede emplearse como indicador para el estudio de mecanismos inmunofarmacológicos en modelos animales (Zhang y col., 2021; Fei y col., 2022). La ciclofosfamida inhibe la diferenciación y maduración de linfocitos al interferir en el ciclo celular y en su proliferación, provocando una disminución del índice de bazo y timo (Yu y col., 2018). En este estudio, el índice de timo de los grupos tratados con ciclofosfamida disminuyó notablemente; sin embargo, el índice de los ratones tratados con la FH-100 aumentó significativamente y fue estadísticamente similar con el grupo CS ( $P \geq 0.05$ ). Así mismo se observó una disminución en el índice de bazo de los grupos tratados con ciclofosfamida, en este caso la FH-200 y FH-400 fueron los grupos que presentaron un comportamiento similar al CS ( $P \geq 0.05$ ).

De igual manera que en la presente investigación, la disminución en el índice de los órganos inmunitarios por el tratamiento con ciclofosfamida ya ha sido reportada en estudios anteriores. Al respecto, el comportamiento del índice de bazo y timo por el

tratamiento con la FH soporta su efecto positivo. Liu y col. (2021) evaluaron el efecto de la administración (50, 100 y 200 mg/kg p.c.) de dos tipos de polisacáridos (CMP-1 y CMP-2, CMP por sus siglas en inglés) del hongo *Poria cocos* en un modelo inmunosuprimido por ciclofosfamida. Los autores registraron un aumento significativo en el índice de timo únicamente en la dosis baja de CMP-2. Por otro lado, Fei y col. (2022) demostraron, en animales tratados con ciclofosfamida, que el extracto de polisacáridos de maca (*Lepidium meyenii*) mejoró el índice de bazo a una concentración alta (1500 mg/kg p.c), mientras que a una dosis baja (750 mg/kg p.c.) no se observó diferencia con el CD. En ambos estudios se registraron resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, donde el aumento de tamaño de los órganos inmunitarios no fue dependiente de la concentración de la muestra; además, a pesar del aumento en comparación al grupo CD, los valores no volvieron a los niveles normales. No obstante, los resultados obtenidos sugieren que la administración de la FH revirtió la atrofia de los órganos inmunitarios ocasionada por la ciclofosfamida (FH-100 en timo y FH-200 y FH-400 en bazo), lo cual indica la mejora en la respuesta inmunitaria.

En cuanto al índice de hígado se observó que todos los grupos fueron estadísticamente similares entre sí, indicando que las muestras no generaron ningún efecto tóxico en este órgano.

#### 10.2.2.2. *Conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas*

La sangre participa en funciones vitales del organismo al transportar oxígeno, nutrientes, antioxidantes, hormonas y moléculas de señalización entre diferentes tejidos. De esta manera, los índices hematológicos generan información importante

para la evaluación de la vitalidad de los diferentes tejidos (Abd-Elhalim y col., 2017; Hasona y Morsi, 2019). Algunos fármacos alteran los índices hematológicos; por ejemplo, la ciclofosfamida afecta la médula ósea: la ciclofosfamida es metabolizada por enzimas hepáticas en varias etapas a fosforamida que induce la formación de entrecruzamientos en cadenas de DNA, modificaciones permanentes que conducirán a la apoptosis. De esta manera, la ciclofosfamida desencadenará una panleucopenia profunda, anemia no regenerativa y trombocitopenia (Abd-Elhalim y col., 2017; Kim y col., 2018). La presente investigación mostró una disminución significativa en todos los parámetros hematológicos para los grupos tratados con ciclofosfamida, lo cual indica que la FH administrada no generó una mejora en los tejidos hematopoyéticos, a excepción para los glóbulos rojos y plaquetas del grupo FH-200.

Los leucocitos son un componente importante en la respuesta inmunitaria, producen anticuerpos y matan células tumorales, manteniendo el sistema inmunológico controlado, a su vez su recuento proporciona información sobre enfermedades del sistema inmunitario e infecciosas (Tukshipa y Chakravorty, 2022). Como se mencionó anteriormente la ciclofosfamida inhibe la función hematopoyética, reduce la cantidad de leucocitos, genera pérdida de células madre e incapacita la médula ósea para regenerar nuevas células sanguíneas. Los resultados obtenidos en el conteo diferencial muestran que todos los grupos tratados con la muestra (FH-100, FH-200 y FH-400) presentaron un aumento en neutrófilos segmentados con respecto al valor de referencia.

El neutrófilo es la primera célula en participar cuando el organismo se encuentra inflamado o estresado. El aumento de este leucocito en los grupos tratados con la FH

se debe a la activación de las vías inflamatorias ocasionadas por la inyección de la ciclofosfamida. Se ha reportado que 3 a 4 días después del último tratamiento con ciclofosfamida, los ratones presentan una fuerte neutrofilia, registrándose hasta tres veces más neutrófilos en sangre que los ratones que no recibieron el fármaco (Stackowicz y col., 2020). Esto conlleva a la activación de mediadores proinflamatorios (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) que induce la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el cual tiene un papel importante en la diferenciación y maduración de los neutrófilos (El-Sebaey y col., 2019; Wu y col., 2020). Este aumento en neutrófilos coincide con lo reportado por Zatarain-Irigoyen (2022) al evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones del fruto de papache mediante un modelo de edema de pata de ratón inducido por carragenina. En este modelo, la infiltración tisular leucocitaria predomina en las etapas iniciales de la reacción inflamatoria.

#### *10.2.2.3. Medición de la proliferación de esplenocitos*

Los leucocitos del bazo están compuestos por distintas células con diferentes funciones inmunológicas (e.g., células T y B, células dendríticas y macrófagos). La proliferación de macrófagos y linfocitos es importante en las fases tempranas de las respuestas inmunológicas (Shin y col., 2023). La ciclofosfamida tiene efectos adversos sobre macrófagos que regulan las funciones de los linfocitos, conduciendo a una reducción de la capacidad proliferativa de linfocitos T y B en ratones (Qi y col., 2018).

El tratamiento con ciclofosfamida disminuyó la proliferación de esplenocitos al contrastarse con el CS; sin embargo, en comparación con los ratones inmunosuprimidos, la FH-100 y la FH-200 incrementaron la proliferación de

esplenocitos en 25 y 31%, respectivamente. Estos resultados son similares a lo reportado para polisacáridos del hongo *Gloeostereum incaratum*, aumentando la proliferación en 21% con respecto al grupo CD tratado con ciclofosfamida (Wang y col., 2018). Este fenómeno también se registró para el extracto hidroalcohólico de hojas de *Abrus precatorius* (EAPL por sus siglas en inglés), el EAPL revirtió la reducción en la proliferación generada en el CD por el tratamiento con ciclofosfamida (Modi y col., 2021). Los resultados positivos en estos estudios fueron insuficientes para alcanzar los valores del CS. Por lo tanto, el efecto inmunomodulador de la FH del fruto de papache es mejor.

#### 10.2.2.4. Determinación de citocinas en suero

Las citocinas son un amplio grupo de moléculas de señalización que desempeñan un papel crucial en la comunicación entre células del sistema inmunitario y en la regulación de respuestas inmunológicas como la inflamación, proliferación celular y apoptosis (Zhang y col., 2021). En un sistema inmunológico sano, existe un equilibrio entre la actividad de las células Th1 y Th2 para mantener las funciones inmunológicas celulares y humorales normales (Qi y col., 2018). Las células Th1 se activan durante las respuestas inmunitarias mediadas por células, mientras que las células Th2 se estimulan durante las respuestas humorales o alérgicas (Monmai y col., 2019; Xiang y col., 2020). Al respecto, la cuantificación de citocinas es importante para determinar la participación de las células Th1 y Th2 y el nivel de la función inmunitaria del organismo (Niu y col., 2020). En este sentido, se ha reportado que la ciclofosfamida inhibe las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares (Yoo y col., 2019).

El TNF- $\alpha$  es una citocina secretada principalmente por la respuesta de macrófagos hacia infecciones bacterianas u otros inmunógenos y está involucrada en la eliminación de células cancerosas (Niu y col., 2020). El grupo CD presentó los mayores niveles de TNF- $\alpha$ ; mientras los grupos tratados con FH-100 y FH-200 disminuyeron los niveles de TNF- $\alpha$ , alcanzando valores estadísticamente similares a los del grupo CS. Este aumento en el grupo CD, al cual se le administro únicamente la ciclofosfamida, coincide con lo reportado en el estudio del efecto del extracto etanólico de *Allium sativum*; los autores adjudicaron el incremento de TNF- $\alpha$  a la activación de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B que median el estrés oxidativo y la generación de citocinas proinflamatorias (El-Sebaey y col., 2019). Es ampliamente reconocido que la vía de señalización de NF- $\kappa$ B es esencial para la producción de citocinas inflamatorias inducidas por ciclofosfamida (Song y col., 2016). Por lo tanto, se sugiere que el tratamiento con la FH regula negativamente la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, contrarrestando la toxicidad de la ciclofosfamida.

El IFN- $\gamma$  es una de las principales citocinas producidas por las células Th1, la cual puede mediar la función inmune celular y promover la diferenciación y proliferación de células Th1 (Zhang y col., 2021). Por su parte, la IL-6 actúa como una citocina proinflamatoria y mioquina antiinflamatoria secretada principalmente por monocitos en respuesta a infecciones y lesiones tisulares (Tukshipa y Chakravorty, 2022). Nuestros hallazgos revelaron un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-6 en la FH-100, sin embargo, no fue significativo.

#### *10.2.2.5. Medición de la actividad de MDA*

El funcionamiento inadecuado del sistema de defensa antioxidante favorece la liberación de una gran cantidad de intermediarios oxidativos, desencadenando roturas cromosómicas y muerte celular. Cuando el sistema antioxidante se daña, se producirá un exceso de peróxidos lipídicos como el MDA, lo que provocará daño celular (Niu y col., 2020). El daño oxidativo del ADN celular es la principal limitación de los fármacos utilizados en quimioterapia, incluida la ciclofosfamida que actúa después de ser metabolizada, principalmente por enzimas hepáticas del citocromo P450 (Qi y col., 2018).

El aumento de neutrófilos tiene un papel esencial en la conversión del oxígeno molecular en ROS que inducen la liberación de sustancias inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y aumentan el daño localizado (Alsemeh y Abdullah, 2022). Nuestros resultados indican un aumento en los niveles de neutrófilos que puede estar relacionado al aumento en los niveles de MDA de los grupos tratados con ciclofosfamida.

## XI. CONCLUSIONES

### 11.3. Conclusión general

La fracción hexánica del fruto de papache generó un efecto inmunoestimulador en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, registrando efectos tanto en ratones sanos como inmunosuprimidos con ciclofosfamida.

### 11.4. Conclusiones específicas

1. La mayor actividad inmunoactivadora *in vitro* se registró a bajas concentraciones y fue para el extracto en acetato de etilo (EAE) y la fracción hexánica (FH), destacando la FH y seleccionando las fracciones para estudios posteriores.
2. Las fracciones hexánica (FH), clorofórmica (FC), en acetato de etilo (FAE) y acuosa (FA), evaluadas a 100 mg/kg p.c., presentaron actividad inmunoactivadora *in vivo*. De manera general, los parámetros evaluados (e.g., índice de bazo, hematológicos y bioquímicos) no fueron afectados. En la actividad inmunoactivadora destacó la FH, que también indujo un incremento en el índice de bazo.
3. En ratones inmunocomprometidos, la fracción hexánica de *R. echinocarpa* revirtió el efecto negativo en el peso corporal de los ratones tratados con ciclofosfamida.
4. El índice de timo y bazo de los ratones tratados con ciclofosfamida disminuyó notablemente, sin embargo, el índice de timo de los ratones tratados con 100 mg/kg p.c. de la fracción hexánica (FH) de *R. echinocarpa* fue estadísticamente similar con el del control sano. En el índice de bazo, el

tratamiento con la fracción hexánica mostró una tendencia a disminuir el efecto negativo de la ciclofosfamida, registrándose valores estadísticamente similares entre el grupo control sano y la FH a 200 y 400 mg/kg p.c.

5. Los parámetros hematológicos de los ratones tratados con ciclofosfamida (control daño CD, FH-100, FH-200 y FH-400) disminuyeron notablemente a comparación del control sano (CS), lo cual puede deberse a la mielosupresión generada por el fármaco. Sin embargo, el tratamiento con la FH mostró una tendencia a mejorar estos parámetros en contraste con el CD; en particular, los tratamientos CS y FH-200 presentaron valores estadísticamente similares en glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.
6. Los grupos tratados con ciclofosfamida (control daño CD, FH-100, FH-200 y FH-400) presentaron una disminución en la proliferación de esplenocitos con respecto al CS. Sin embargo, los valores para los tratamientos con la fracción hexánica FH-100, FH-200 y FH-400 fueron estadísticamente superiores a los del CD. FH-100 y FH-200 fueron los mejores tratamientos.
7. En comparación con los valores de citocinas del grupo control sano, los niveles de IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-4 disminuyeron en el grupo control daño, mientras que TNF- $\alpha$  aumentó. Las únicas citocinas detectables en los tratamientos con la fracción hexánica fueron TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6. El efecto positivo de la fracción hexánica fue notable en los niveles de TNF- $\alpha$  a las tres concentraciones, alcanzando valores similares al control sano, así como de IL-6 a 100 mg/kg p.c.

8. El tratamiento con la fracción hexánica del fruto de papache fue insuficiente para revertir el daño oxidativo, evaluado por los niveles de MDA, ocasionado por la ciclofosfamida.

## **XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO**

1. Evaluar el efecto de los extractos y fracciones del fruto de papache sobre la respuesta tipo Th1 de células mononucleares de sangre periférica mediante la medición de marcadores inmunitarios (triptófano y kinurenina).
2. Evaluar la producción de anticuerpos (inmunidad humoral) en suero de ratones inmunocomprometidos tratados con la fracción hexánica.
3. Emplear modelos para observar el efecto de la fracción hexánica en componentes de la inmunidad innata, mediante el empleo de líneas celulares o estudios *in vivo*.
4. Establecer un modelo para determinar el efecto de la fracción hexánica como inmunoadyuvante en el tratamiento de alguna enfermedad.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., y Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology* (9th ed.). Elsevier.
- Abd-Elhalim, S. A., Sharada, H. M., Abulyazid, I., Aboulthana, W. M., y Abd Elhalim, S. T. (2017). Ameliorative effect of carob pods extract (*Ceratonia siliqua* L.) against cyclophosphamide induced alterations in bone marrow and spleen of rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(10), 168-181. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.71025>
- Abubakar, A. R., y Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Akhtar, H. M. S., Ye, Z., Abdin, M., Hamed, Y. S., Chen, G., y Zeng, X. (2020). Immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) hull. *Food Technology and Biotechnology*, 58(4), 370-380. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.04.20.6634>
- Alaefuna, E. C., Uzor, P. F., Okafor, S. N., y Osadebe, P. O. (2021). Evaluation of immunomodulatory activity of extract and fractions of *Sida acuta* Burm. f. leaves in mice and GC-MS analysis of n-hexane fraction. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 8(5), 65-78. <https://www.ijrasb.com/index.php/ijrasb/article/view/224>

- Alamilla, L., y Neyra, L. (2020). *Diversidad natural y cultural*. Consejo Nacional para la Biodiversidad de México (CONABIO). Recuperado 3 de septiembre de 2023 <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>.
- Alaníz-Cuevas, Y. (2023). *Caracterización química de extractos/fracciones del fruto de papache (Randia echinocarpa)* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa.
- Ali-Reza, A. S. M., Nasrin, M. S., Hossen, M. A., Rahman, M. A., Jantan, I., Haque, M. A., y Sobarzo-Sánchez, E. (2023). Mechanistic insight into immunomodulatory effects of food-functioned plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(22), 5546-5576. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2021138>
- Alsemeh, A. E., y Abdullah, D. M. (2022). Protective effect of alogliptin against cyclophosphamide-induced lung toxicity in rats: Impact on PI3K/Akt/FoxO1 pathway and downstream inflammatory cascades. *Cell and Tissue Research*, 388(2), 417-438. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03593-1>
- Amon, L., Hatscher, L., Heger, L., Dudziak, D., y Lehmann, C. H. K. (2020). Harnessing the complete repertoire of conventional dendritic cell functions for cancer immunotherapy. *Pharmaceutics*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070663>
- Aro, A. O., Dzoyem, J. P., Goddard, A., Fonteh, P., Kayoka-Kabongo, P. N., y McGaw, L. J. (2019). *In vitro* antimycobacterial, apoptosis-inducing potential, and

- immunomodulatory activity of some Rubiaceae species. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 185. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00185>
- Barrios, M., Rodríguez–Acosta, A., Gil, A., Salazar, A. M., Taylor, P., Sánchez, E. E., . . . Guerrero, B. (2009). Comparative hemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thrombosis Research*, 124(3), 338-343. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.11.001>
- Batiha, G. E., Magdy Beshbishy, A., Adeyemi, O. S., Nadwa, E. H., Rashwan, E. K. M., Alkazmi, L. M., . . . Igarashi, I. (2020). Phytochemical screening and antiprotozoal effects of the methanolic *Berberis vulgaris* and acetic *Rhus coriaria* extracts. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030550>
- Behl, T., Kumar, K., Brisc, C., Rus, M., Nistor-Cseppento, D. C., Bustea, C., . . . Bungau, S. (2021). Exploring the multifocal role of phytochemicals as immunomodulators. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133, 110959. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110959>
- Berry, R., Watson, G. M., Jonjic, S., Degli-Esposti, M. A., y Rossjohn, J. (2020). Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nature reviews. Immunology*, 20(2), 113-127. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0225-5>
- Burgos-Hernández, M., y Castillo-Campos, G. (2018). Análisis florístico de la selva tropical perennifolia del centro-norte de Veracruz, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(15), 451-463.

- Bushmeleva, K., Vyshtakalyuk, A., Terenzhev, D., Belov, T., Parfenov, A., Sharonova, N., . . . Zobov, V. (2021). Radical scavenging actions and immunomodulatory activity of *Aronia melanocarpa* propylene glycol extracts. *Plants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/plants10112458>
- Bye, R., Linares, E., Mata, R., Albor, C., Castañeda, P. C., y Delgado, G. (1991). Ethnobotanical and phytochemical investigation of *Randia echinocarpa* (Rubiaceae). *Anales del Instituto de Biología. Serie Botanica*, 62(1), 87-106.
- Cabrera, L. A. (2000). *Caracterización fisicoquímica y nutricional del fruto de papache (Randia echinocarpa)* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa.
- Cano-Campos, M. C., Díaz-Camacho, S. P., Uribe-Beltrán, M. J., López-Angulo, G., Montes-Avila, J., Paredes-López, O., y Delgado-Vargas, F. (2011). Bio-guided fractionation of the antimutagenic activity of methanolic extract from the fruit of *Randia echinocarpa* (Sessé et Mociño) against 1-nitropyrene. *Food Research International*, 44(9), 3087-3093. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.006>
- Castillo-González, R., Cibrian, D., y Sánchez-Madrid, F. (2021). Dissecting the complexity of  $\gamma\delta$  T-cell subsets in skin homeostasis, inflammation, and malignancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(6), 2030-2042. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.023>
- Castillo-Mompíe, A., Cabrera-Guerra, N., y Linares-Lugo, Y. (2021). *Plantas medicinales y sistema inmune* Congreso Virtual de Ciencias Básicas Biomédicas de Granma, Manzanillo, Colima, México.

<https://cibamanz2021.sld.cu/index.php/cibamanz/cibamanz2021/paper/view/78>

[1/0](#)

Choudhury, H., Pandey, M., Hua, C. K., Mun, C. S., Jing, J. K., Kong, L., . . .

Kesharwani, P. (2018). An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(3), 361-376.

<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.012>

CONABIO. (2019). *Crucillo chino*. Consejo Nacional para la Biodiversidad de México.

Recuperado 15 de marzo de 2023 <http://enciclovida.mx/especies/167250>

Curi, R., Levada-Pires, A. C., Silva, E. B. D., Poma, S. O., Zambonato, R. F.,

Domenech, P., . . . Pithon-Curi, T. C. (2020). The critical role of cell metabolism for essential neutrophil functions. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 54(4),

629-647. <https://doi.org/10.33594/000000245>

Curiel-Gutiérrez, P. C. (2017). *Análisis in vitro de la actividad inmunomoduladora de*

*extractos acuosos de plantas sonorenses* [Tesis de maestría, Universidad de Sonora]. Hermosillo, Sonora. <http://hdl.handle.net/20.500.12984/4072>

D'Amelia, V., Docimo, T., Crocoll, C., y Rigano, M. M. (2021). Specialized metabolites

and valuable molecules in crop and medicinal plants: the evolution of their use and strategies for their production. *Genes* 12(6).

<https://doi.org/10.3390/genes12060936>

Daltro, S. R. T., Santos, I. P., Barros, P. L., Moreira, D. R. M., Tomassini, T. C. B.,

Ribeiro, I. M., . . . Soares, M. B. P. (2021). *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory

- activity of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract. *Planta Medica*, 87(1-02), 160-168. <https://doi.org/10.1055/a-1237-4268>
- de Souza-Barbosa, B., Práxedes, E. A., Lima, M. A., Pimentel, M. M. L., Santos, F. A., Brito, P. D., y Bezerra, M. B. (2017). Haematological and biochemical profile of Balb-c mice. *Acta Scientiae Veterinariae* 45, 5, Article 1477. <https://www.ufrgs.br/actavet/45/PUB%201477.pdf>
- Del Zotto, G., Principi, E., Antonini, F., Baratto, S., Panicucci, C., Bruno, C., y Raffaghello, L. (2021). Comprehensive phenotyping of peripheral blood T lymphocytes in healthy mice. *Cytometry A*, 99(3), 243-250. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24246>
- Dragostin, I., Dragostin, O. M., Iacob, A. T., Dragan, M., Chitescu, C. L., Confederat, L., . . . Zamfir, C. L. (2022). Chitosan microparticles loaded with new non-cytotoxic isoniazid derivatives for the treatment of tuberculosis: *in vitro* and *in vivo* studies. *Polymers* 14(12). <https://doi.org/10.3390/polym14122310>
- El-Sebaey, A. M., Abdelhamid, F. M., y Abdalla, O. A. (2019). Protective effects of garlic extract against hematological alterations, immunosuppression, hepatic oxidative stress, and renal damage induced by cyclophosphamide in rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(15), 15559-15572. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04993-7>
- ENVIGO. (2016). *BALB/c (Bagg's albino)*. Inotivco. Recuperado 3 de marzo de 2023 [https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/envigo-49-balbc-letter\\_screen.pdf?\\_hstc=200095985.4](https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/envigo-49-balbc-letter_screen.pdf?_hstc=200095985.4)

- Fang, Y., Yang, L., y He, J. (2021). Plantanone C attenuates LPS-stimulated inflammation by inhibiting NF- $\kappa$ B/iNOS/COX-2/MAPKs/Akt pathways in RAW 264.7 macrophages. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 143, 112104. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112104>
- Fei, W. T., Yue, N., Li, A. M., Yu, S. H., Zhao, D. P., Zhu, Y. L., . . . Wang, L. Y. (2022). Immunomodulatory effects of *Lepidium meyenii* Walp. polysaccharides on an immunosuppression model induced by cyclophosphamide. *Journal of Immunology Research*, 2022, 1210890. <https://doi.org/10.1155/2022/1210890>
- Feng, X., Zhu, H., Chen, B., Zhu, C., Gong, L., Hu, Z., y Zhang, H. (2020). Effects of phytosterols supplementation on growth performance and intestinal microflora of yellow-feather broilers. *Poultry Science*, 99(11), 6022-6030. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.036>
- Fortunato-Seixas, S., Bassoli, K. B., Virgolin, B. L., Garcia, C. L., y Janzantti, S. N. (2021). Physicochemical properties and effects of fruit pulps from the amazon biome on physiological parameters in rats. *Nutrients*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/nu13051484>
- Garcia-Cruz, N. D. (2018). *Obtención de extractos a partir del fruto del crucetillo (Randia aculeata) y la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento de Mycobacterium bovis* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Ciudad de México. <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0780247/0780247.pdf>

- García-Hernández, M. G., Guerrero-Ramírez, M. A., Castro-Corona, y Medina-de-la-Garca, C. E. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa (review). *Revista Medicina Universitaria* 11, 247-256. <http://eprints.uanl.mx/8507/1/Inmunomoduladores%20como%20terapia.pdf>
- Ghaedi, E., Rezaei, N., y Mahmoudi, M. (2019). Nutrition, immunity, and cancer. *Nutrition and Immunity*, 209-281. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16073-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16073-9_12)
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., y Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gil-Avilés, M. d. R. (2020). *Actividad inmunomoduladora y antioxidante in vivo de las melaninas solubles del fruto de Randia echinocarpa (papache)* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa.
- Gil-Avilés, M. D. R., Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Picos-Salas, M. A., López-Angulo, G., Reynoso-Soto, E. A., . . . Delgado-Vargas, F. (2019). Soluble melanins of the *Randia echinocarpa* fruit - structural characteristics and toxicity. *Journal of Food Biochemistry*, 43(12), e13077. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13077>
- Gunst, J., Kashani, K. B., y Hermans, G. (2019). The urea-creatinine ratio as a novel biomarker of critical illness-associated catabolism. *Intensive Care Medicine*, 45(12), 1813-1815. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05810-y>

- Han, L., Fu, Q., Deng, C., Luo, L., Xiang, T., y Zhao, H. (2022). Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scandinavian Journal of Immunology*, 95(1), e13106. <https://doi.org/10.1111/sji.13106>
- Han, N. R., Kim, K. C., Kim, J. S., Park, H. J., Ko, S. G., y Moon, P. D. (2022). SBT (composed of *Panax ginseng* and *Aconitum carmichaeli*) and stigmasterol enhances nitric oxide production and exerts curative properties as a potential anti-oxidant and immunity-enhancing agent. *Antioxidants*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020199>
- Harun, N. H., Septama, A. W., Ahmad, W., y Suppian, R. (2020). Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: a review. *Chinese Herbal Medicines*, 12(2), 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2019.11.007>
- Hasona, N., y Morsi, A. (2019). Grape seed extract alleviates dexamethasone-induced hyperlipidemia, lipid peroxidation, and hematological alteration in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 34(2), 213-218. <https://doi.org/10.1007/s12291-018-0736-z>
- Heredia-Mercado, B. (2020). *Actividad adaptogénica, inmunomoduladora y antioxidante de tres especies de Echeveria (E. craigiana, E. kimnachii, E. subrigida) de Sinaloa* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa.

- Huang, P., Hong, J., Mi, J., Sun, B., Zhang, J., Li, C., y Yang, W. (2022). Polyphenols extracted from *Enteromorpha clathrata* alleviates inflammation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells by inhibiting the MAPKs/NF-κB signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 286, 114897. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114897>
- Huber, F., Ehrensperger, B., Hatz, C., Chappuis, F., Bühler, S., y Eperon, G. (2018). Safety of live vaccines on immunosuppressive or immunomodulatory therapy—a retrospective study in three swiss travel clinics. *Journal of Travel Medicine*, 25(1), tax082. <https://doi.org/10.1093/jtm/tax082>
- Hughes, E., Scurr, M., Campbell, E., Jones, E., Godkin, A., y Gallimore, A. (2018). T-cell modulation by cyclophosphamide for tumour therapy. *Immunology*, 154(1), 62-68. <https://doi.org/10.1111/imm.12913>
- Jantan, I., Ahmad, W., y Bukhari, S. N. (2015). Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in Plant Science*, 6, 655. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00655>
- Juárez-Trujillo, N., Monribot-Villanueva, J. L., Alvarado-Olivarez, M., Luna-Solano, G., Guerrero-Analco, J. A., y Jiménez-Fernández, M. (2018). Phenolic profile and antioxidative properties of pulp and seeds of *Randia monantha* Benth. *Industrial Crops and Products*, 124, 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.052>
- Kesharwani, R. K., Keservani, R. K., y Sharma, A. K. (2022). *Immunomodulators and Human Health* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-6379-6>

- Khan, M. M., Mortuza, A., Ibrahim, M., y Mustafa, A. (2022). Assessment of the role of anthocyanin standardized elderberry (*Sambucus nigra*) extract as an immune-stimulating nutraceutical of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS One*, 17(12), e0279471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279471>
- Khandelwal, V., y Choudhary, P. K. (2020). Immunomodulating potential of *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bark extract. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1), 641-646. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.66>
- Kim, J. W., Choi, J. S., Seol, D. J., Choung, J. J., y Ku, S. K. (2018). Immunomodulatory effects of kuseonwangdого-based mixed herbal formula extracts on a cyclophosphamide-induced immunosuppression mouse model. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6017412>
- Kupsa, T., Horacek, J. M., y Jebavy, L. (2012). The role of cytokines in acute myeloid leukemia: a systematic review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of Palacký University, Olomouc, Czech Republic*, 156(4), 291-301. <https://doi.org/10.5507/bp.2012.108>
- Laskowski, T. J., Biederstädt, A., y Rezvani, K. (2022). Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 22(10), 557-575. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00491-0>
- Lin, J. Y., y Tang, C. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse

splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101(1), 140-147.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>

Liu, F., Zhang, L., Feng, X., Ibrahim, S. A., Huang, W., y Liu, Y. (2021).

Immunomodulatory activity of carboxymethyl pachymaran on immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. *Molecules*, 26(19).

<https://doi.org/10.3390/molecules26195733>

Liu, H., Liu, M., Fu, X., Zhang, Z., Zhu, L., Zheng, X., y Liu, J. (2018). Astaxanthin prevents alcoholic fatty liver disease by modulating mouse gut microbiota.

*Nutrients*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/nu10091298>

López-Aroche, U., Salinas-Sánchez, D. O., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.

E., Liébano-Hernández, E., Valladares-Cisneros, G., . . . Hernández-Velázquez, V. (2008). *In vitro* nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Helminthology*, 82(1), 25-31.

<https://doi.org/10.1017/s0022149x07873627>

López-Yomayusa, C. C., y Almansa-Manrique, J. E. (2000). Inmunomoduladores

endogenos y exogenos. *Revista de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*, 12, 43-51.

<https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/2848/Inmunomoduladores%20endogenos%20y%20exogenos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Maggi, L., Mazzoni, A., Cimaz, R., Liotta, F., Annunziato, F., y Cosmi, L. (2019). Th17 and Th1 lymphocytes in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Frontiers in Immunology*, 10, 450. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00450>
- Mbiri, J. W., Ogila, K., Kisangau, P., y Gicheru, M. (2023). *Terminalia brownii* fresen: stem bark dichloromethane extract alleviates pyrogallol-induced suppression of innate immune responses in swiss albino mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023, 9293335. <https://doi.org/10.1155/2023/9293335>
- Méndez, L., y Hernández, M. (2009). Toxicity evaluation of *Randia monantha* Benth fruit. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 9(1), 42-45. <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2009/muvs091h.pdf>
- Miggelbrink, A. M., Jackson, J. D., Lorrey, S. J., Srinivasan, E. S., Waibl-Polania, J., Wilkinson, D. S., y Fecci, P. E. (2021). CD4 T-cell exhaustion: does it exist and what are its roles in cancer? *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5742-5752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-21-0206>
- Modi, C. M., Bhatt, P. R., Patel, U. D., Patel, H. B., y Pandya, K. B. (2021). Immunomodulatory effect of the hydroalcoholic extract of *Abrus precatorius* L. leaves against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Archives of Biological Sciences*, 73(2), 279-290. <https://doi.org/10.2298/ABS210219022M>
- Monet-Alvarez, D. E., Verdecia-Alba, A., Marten-Powell, I., y Álvarez-Cortes, J. T. (2020). *Los inmunomoduladores, sus características y aplicaciones*. Congreso

Virtual de Ciencias Básicas Biomédicas de Granma, Cuba.

<http://www.cibamanz2020.sld.cu/index.php/cibamanz/cibamanz2020/paper/view/158>

Monmai, C., You, S., y Park, W. J. (2019). Immune-enhancing effects of anionic macromolecules extracted from *Codium fragile* on cyclophosphamide-treated mice. *PLoS One*, 14(2), e0211570.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211570>

Montes-Avila, J., Ojeda-Ayala, M., López-Angulo, G., Pío-León, J. F., Díaz-Camacho, S. P., Ochoa-Terán, A., y Delgado-Vargas, F. (2018). Physicochemical properties and biological activities of melanins from the black-edible fruits *Vitex mollis* and *Randia echinocarpa*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1972-1980. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9812-6>

Mustapha, N., Mokdad-Bzéouich, I., Sassi, A., Abed, B., Ghedira, K., Hennebelle, T., y Chekir-Ghedira, L. (2016). Immunomodulatory potencies of isolated compounds from *Crataegus azarolus* through their antioxidant activities. *Tumour Biology*, 37(6), 7967-7980. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4517-5>

Nair, A., Chattopadhyay, D., y Saha, B. (2019). *Plant-derived immunomodulators*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00018-5>

Nakashima, C., Ishida, Y., Kitoh, A., Otsuka, A., y Kabashima, K. (2019). Interaction of peripheral nerves and mast cells, eosinophils, and basophils in the development of pruritus. *Experimental Dermatology*, 28(12), 1405-1411. <https://doi.org/10.1111/exd.14014>

- Newman, D. J., y Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Niu, Y., Dong, J., Jiang, H., Wang, J., Liu, Z., Ma, C., y Kang, W. (2020). Effects of polysaccharide from *Malus halliana* koehne flowers in cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress on mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1603735. <https://doi.org/10.1155/2020/1603735>
- Ojeda-Ayala, M., Gaxiola-Camacho, S. M., y Delgado-Vargas, F. (2022). Phytochemical composition and biological activities of the plants of the genus *Randia*. *Botanical Sciences*, 100(4), 779-796. <https://doi.org/10.17129/botsci.3004>
- Özdemir, R., Özdemir, A. T., Sarıboyacı, A. E., Uysal, O., Tuğlu, M., y Kırmaz, C. (2019). The investigation of immunomodulatory effects of adipose tissue mesenchymal stem cell educated macrophages on the CD4 T cells. *Immunobiology*, 224(4), 585-594. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.04.002>
- Park, J. H., y Lee, H. K. (2021). Function of  $\gamma\delta$  T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(3), 318-327. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00576-0>
- Park, J. H., Lee, J. K., Kim, H. S., Chung, S. T., Eom, J. H., Kim, K. A., . . . Oh, H. Y. (2004). Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, 4(3), 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.01.013>

- Park, Y. G., Cho, J. H., Choi, J., Ju, E. M., Adam, G. O., Hwang, D. I., . . . Park, C. B. (2022). Immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. and *Carthamus tinctorius* L. on RAW 264.7 macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppression C57BL/6 mouse models. *Journal of Functional Foods*, 91, 105000. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105000>
- Patel-Ritesh, G., Pathak-Nimish, L., Rathod-Jaimik, D., y Bhatt-Nayna, M. (2011). Phytopharmacological properties of *Randia dumetorum* as a potential medicinal tree: an overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(10), 24-26. [http://japsonline.com/admin/php/uploads/292\\_pdf.pdf](http://japsonline.com/admin/php/uploads/292_pdf.pdf)
- Patil, M. P. M., Kanase, V. G., Rawal, J. A., y Randive, D. S. (2021). Evaluation of *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of aqueous and ethanolic extract of *Prosopis cineraria* (L.). *Natural Volatiles and Essential Oils*, 8(5), 12722-12746. <https://www.nveo.org/index.php/journal/article/view/3979>
- Pinto-González, R. M. (2022). *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora celular y toxicidad de extractos/fracciones obtenidas por dos métodos (Wall y secuencial) y de melaninas solubles del fruto de Randia echinocarpa* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa.
- Powell, M. D., Lu, P., Neeld, D. K., Kania, A. K., George-Alexander, L. M. M., Bally, A. P. R., . . . Boss, J. M. (2022). IL-6/STAT3 signaling axis enhances and prolongs pdcd1 expression in murine CD8 T cells. *Immunohorizons*, 6(12), 872-882. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2100112>

- POWO. (2023). *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. Recuperado 9 de septiembre de 2023 <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2018). *Kuby Immunology* (8th ed.). Mc Graw Hill.
- Qi, Q., Dong, Z., Sun, Y., Li, S., y Zhao, Z. (2018). Protective effect of bergenin against cyclophosphamide-induced immunosuppression by immunomodulatory effect and antioxidation in Balb/c mice. *Molecules*, 23(10), 2668. <https://doi.org/10.3390/molecules23102668>
- Rawal, G., Yadav, S., y Nagayach, S. (2015). Phytosterols and the health. *Medico Research Chronicles*, 2(3), 441-444. <https://medrech.com/index.php/medrech/article/view/104>
- Salinas-Sánchez, D., Arteaga-Najera, G. L., León-Rivera, I., Dorado-Ramírez, O., Valladares-Cisneros, G., y Navarro-García, V. M. (2009). Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla sierra biosphere reserve in Morelos (México). *Polibotánica*, 28, 213-225. <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n28/n28a10.pdf>
- Sánchez, C., Gupta, M., y Santana, A. I. (2002). Actividad inmunomoduladora de las plantas. *Revista de Fitoterapia*, 2(2), 151-162. [https://www.fitoterapia.net/php/descargar\\_documento.php?id=4765&doc\\_r=sn&num\\_volumen=6&secc\\_volumen=5952](https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4765&doc_r=sn&num_volumen=6&secc_volumen=5952)

- Sangwan, N. S., Farag, M. A., y Modolo, L. V. (2022). *Plants and phyto molecules for immunomodulation: recent trends and advances* (1st, Ed.). Springer.  
<https://doi.org/10.1007/978-981-16-8117-2>
- Santos-Cervantes, M. E., Ibarra-Zazueta, M. E., Loarca-Piña, G., Paredes-López, O., y Delgado-Vargas, F. (2007). Antioxidant and antimutagenic activities of *Randia echinocarpa* fruit. *Plant Foods for Human Nutrition* 62(2), 71-77.  
<https://doi.org/10.1007/s11130-007-0044-x>
- Santos, E. W., de Oliveira, D. C., Hastreiter, A., da Silva, G. B., de Oliveira-Beltran, J. S., Tsujita, M., . . . Borelli, P. (2016). Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(2), 138-145.
- Sen, S., y Chakraborty, R. (2017). Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2), 234-244.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.006>
- Shantilal, S., Vaghela, J. S., y Sisodia, S. S. (2018). Review on immunomodulation and immunomodulatory activity of some medicinal plant. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5(8), 163-174.  
<https://www.researchgate.net/publication/329611387>
- Shin, D. Y., Kim, B. S., Lee, H. Y., Park, Y. M., Kim, Y. W., Kim, M. J., . . . Bae, J. S. (2023). *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold leaf extract enhanced immunostimulatory effects in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed

rat model. *Food and Nutrition Research*, April 19, 67.

<https://doi.org/10.29219/fnr.v67.9422>

Sianipar, E. A. (2021). The potential of Indonesian traditional herbal medicine as immunomodulatory agents: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 12(10), 5229.

<https://www.researchgate.net/publication/358587389>

Singh, V. K., Dwivedi, P., Chaudhary, B. R., y Singh, R. (2015). Immunomodulatory effect of *Gymnema sylvestre* (R.Br.) leaf extract: an *in vitro* study in rat model.

*PLoS One*, 10(10), e0139631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139631>

Song, Y., Zhang, C., Wang, C., Zhao, L., Wang, Z., Dai, Z., . . . Ma, X. (2016). Ferulic acid against cyclophosphamide-induced heart toxicity in mice by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016,

1261270. <https://doi.org/10.1155/2016/1261270>

Stackowicz, J., Jönsson, F., y Reber, L. L. (2020). Mouse models and tools for the *in vivo* study of neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 10, 3130.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03130>

Torres-Montúfar, A., y Torres-Díaz, A. N. (2022). Las Rubiáceas de México: ¿Ya está hecho el trabajo? *Botanical Sciences*, 100(2), 446-468.

Tukshipa, S. D., y Chakravorty, J. (2022). *In vivo* antioxidant and immunomodulatory effect of the aqueous extract of *Mimela* sp. on cyclophosphamide induced immunocompromised mice. *International Journal of Pharmacognosy and Life Science*, 3, 13-19.

<https://doi.org/10.33545/27072827.2022.v3.i2a.54>

- UNAM. (2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana Grangel: Randia echinocarpa Moc. & Sessé – Rubiaceae*. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado 15 de julio de 2023 <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=randia-echinocarpa>
- Vargas-Solis, R., y Perez-Gutierrez, R. M. (2002). Diuretic and urolithiatic activities of the aqueous extract of the fruit of *Randia echinocarpa* on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1-2), 145-147. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00091-0](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00091-0)
- Vega-Aviña, R., Vega-López, I. F., y Delgado-Vargas, F. (2021). *Flora nativa y naturalizada de Sinaloa* (Primera ed.). Universidad Autónoma de Sinaloa y Colegio de Postgraduados.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Wahyuningsih, S. P. A., Pramudya, M., Putri, I. P., Winarni, D., Savira, N. I. I., y Darmanto, W. (2018). Crude polysaccharides from okra pods (*Abelmoschus esculentus*) grown in indonesia enhance the immune response due to bacterial infection. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 8505383. <https://doi.org/10.1155/2018/8505383>
- Wall, M. E., Wani, M. C., Brown, D. M., Fullas, F., Olwald, J. B., Josephson, F. F., . . . Farnsworth, N. R. (1996). Effect of tannins on screening of plant extracts for

enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*, 3(3), 281-285.

Wang, H., Wang, X., Li, Y., Zhang, S., Li, Z., Li, Y., . . . Guo, Y. (2021). Structural properties and *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of an arabinofuranan from the fruits of *Akebia quinata*. *Carbohydrate Polymers*, 256, 117521. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117521>

Wang, S., Huang, S., Ye, Q., Zeng, X., Yu, H., Qi, D., y Qiao, S. (2018). Prevention of cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice with the antimicrobial peptide sublancin. *Journal of Immunology Research*, 2018, 4353580. <https://doi.org/10.1155/2018/4353580>

Wikström, N., Bremer, B., y Rydin, C. (2020). Conflicting phylogenetic signals in genomic data of the coffee family (Rubiaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 58(4), 440-460.

Wolford, S. T., Schroer, R. A., Gohs, F. X., Gallo, P. P., Brodeck, M., Falk, H. B., y Ruhren, R. (1986). Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 18(2), 161-188.

Wu, M., Ma, M., Tan, Z., Zheng, H., y Liu, X. (2020). Neutrophil: a new player in metastatic cancers. *Frontiers in Immunology*, 11, 565165. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.565165>

Xiang, X., Cao, N., Chen, F., Qian, L., Wang, Y., Huang, Y., . . . Li, W. (2020). Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* koidz (PAMK) alleviates

cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice by upregulating CD28/IP3R/PLC $\gamma$ -1/AP-1/NFAT signal pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 529657. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.529657>

Yepes-Perez, A. F., Herrera-Calderón, O., Oliveros, C. A., Flórez-Álvarez, L., Zapata-Cardona, M. I., Yepes, L., . . . Zapata, W. (2021). The hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa* (cat's claw) inhibits the infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021, 6679761. <https://doi.org/10.1155/2021/6679761>

Yoo, H. J., You, D. J., y Lee, K. W. (2019). Characterization and immunomodulatory effects of high molecular weight fucoidan fraction from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Mar Drugs*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/md17080447>

Yu, J., Cong, L., Wang, C., Li, H., Zhang, C., Guan, X., . . . Sun, J. (2018). Immunomodulatory effect of *Schisandra* polysaccharides in cyclophosphamide-induced immunocompromised mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(6), 4755-4762. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6073>

Yusuf, A. A., Lawal, B., Abubakar, A. N., Berinyuy, E. B., Omonije, Y. O., Umar, S. I., . . . Alhaji, Y. M. (2018). *In vitro* antioxidants, antimicrobial and toxicological evaluation of Nigerian *Zingiber officinale*. *Clinical Phytoscience*, 4(1), 1-8.

Zarobkiewicz, M. K., Wawryk-Gawda, E., Kowalska, W., Janiszewska, M., y Bojarska-Junak, A. (2021).  $\gamma\delta$  T lymphocytes in asthma: a complicated picture. *Archivum*

<https://doi.org/10.1007/s00005-021-00608-7>

Zatarain-Irigoyen, M. (2022). *Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vivo y caracterización fitoquímica de extractos y fracciones del fruto de papache (Randia echinocarpa)* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Culiacán, Sinaloa.

Zeng, B., Su, M., Chen, Q., Chang, Q., Wang, W., y Li, H. (2020). *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide prevents carbon tetrachloride-induced liver injury in mice by metabolomic analysis. *Journal of Chromatography B*, 1152, 122202. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122202>

Zhang, J., Gao, S., Li, H., Cao, M., Li, W., y Liu, X. (2021). Immunomodulatory effects of selenium-enriched peptides from soybean in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Food Science and Nutrition*, 9(11), 6322-6334. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2594>

#### XIV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
µL	Microlitro
µm	Micra
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransaminasa
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
BCR	Receptores de linfocito B
CBA	Cytometric bead array
CD	Control daño
CMP	Carboximetil paquimarán
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
CPA	Células presentadoras de antígeno
CS	Control sano
CSF	Factores estimuladores de colonias
DAMP	Patrones moleculares asociados a la lesión
DMSO	Dimetil sulfóxido

EA	Extracto acuoso
EAE	Extracto acetato de etilo
EC	Extracto clorofórmico
e.g	Ejemplo
EH	Extracto hexánico
EM	Extracto metanólico
FAE	Fracción acetato de etilo
FC	Fracción clorofórmica
FH	Fracción hexánica
FH-100	Fracción hexánica a una concentración de 100 mg/kg p.c.
FH-200	Fracción hexánica a una concentración de 200 mg/kg p.c.
FH-400	Fracción hexánica a una concentración de 400 mg/kg p.c.
GMC-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua destilada
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua desionizada
IFs	Interferones
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
LPS	Lipopolisacárido
MDA	Malondialdehido

mg	Miligramo
min	Minuto
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NK	Células asesinas NK ("Natural killer")
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa de las células
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
p.c.	Peso corporal
pg	Picogramo
PGE2	Prostaglandina E2
p/v	Peso/volumen
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por segundo
SBT	Sambu-Tang
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCR	Receptores de linfocito T
TGF	Factor transformador de la diferenciación
TLR4	Receptor tipo toll 4

TNF	Factores de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
U/L	Unidad por litro
$\mu$ L	Microlitro