



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**“Actividad inmunomoduladora *in vitro* de
extractos y compuestos de plantas
Mexicanas medicinales”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

María del Carmen Juárez Vázquez

Director de Tesis:

Dr. Ángel Josabad Alonso Castro



MÉXICO, D. F.

Febrero/2013

Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología de la Subdirección de Investigación Básica en el laboratorio de “Virus y Cáncer” bajo el apoyo del **Dr. Alejandro García Carrancá** y dirección del **Dr. Ángel Josabad Alonso Castro**.

A mis padres y hermano

*“Comprender las cosas que nos rodean es la mejor preparación para
comprender las cosas que hay más allá”
Hipatia (370- 415)*

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a **Dios** su infinito amor, todas las alegrías, las bendiciones, por darme siempre el valor y la fuerza necesaria para continuar y realizar mis metas. Por el conocimiento y permitirme apreciar los detalles de la vida.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios superiores Zaragoza**, porque me ha permitido formarme académicamente y ser parte de una generación de profesionistas.

Al **Dr. Alejandro García Carrancá** por su apoyo y permitirme integrarme al grupo de trabajo del Laboratorio de "Virus y Cáncer" del **Instituto Nacional de Cancerología**.

Al **Dr. Ángel Josabad Alonso Castro** por su valiosa amistad, asesoría, dirección en el trabajo de investigación. Le agradezco su confianza, apoyo y por contribuir en mi desarrollo profesional. Por transmitirme el agrado por la investigación y permitirme ser independiente, una persona a la que aprecio y admiro.

Al **M. en C. Heriberto A. Valencia González** por su interés, consejo académico y ayudarme gracias por su amistad.

A los sinodales **M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, Dra. María de Lourdes García Mora, Dra. Hortensia Rosas Acevedo, Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez**, por revisar el trabajo de tesis.

A mis muy queridos **Padres Isabel Vázquez, Mateo Juárez y Hermano Israel Juárez**, con amor y respeto quienes me enseñaron a valorar cada momento, por su esfuerzo y dedicación. Gracias a ellos tengo la oportunidad de seguir adelante.

Considero que todos mis amigos merecen una especial mención ya que forman parte importante de nosotros, tornando la vida más simple y bella gracias a todos.

A **Gabriela Olayo Vázquez** porque con el tiempo y la distancia nuestra amistad ha crecido, por estar a mi lado y sobre todo por ser mi Nakama.

A la **Biól. Luz María Santiago López**, por acompañarme en este andar hacia el conocimiento, por tu invaluable amistad, complicidad y aprecio incondicional gracias.

A **Carolina Cuahutle G., Araceli Uribe** por su amistad, las agradables charlas y grandes aventuras vividas.

A mis grandes amigos y compañeros de laboratorio:

A la **M. en C. Graciela Ruíz R.** gracias por su apreciable amistad, la calidez, por tus palabras, la convivencia y el cariño.

A la **Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez**, por el aprendizaje compartido, gracias por creer y confiar en mí y sobre todo por su amistad.

A mis muy queridos amigos cómplices de diversión, de risas, cada uno con especial cariño: **Alejandra García, Ángel J., Pedro Rosendo C., Vincent O., Raquel, Ángel O., Miriam, Silvia, y demás**, por brindarme momentos inolvidables y ser una nueva familia para mí, los aprecio.

Amigos muy queridos de la Facultad con los que me divertí en cada clase y en esas salidas a campo **Mirna, Ángel, Natalia, Ana L., Sandra, Eunice y demás gracias.**

A mis nuevos, viejos amigos y aquellos que contribuyeron en mi formación académica.

"Lecciones aprendidas sin sacrificar algo no significan nada, porque no se puede obtener algo sin entregar nada a cambio. Si alguien puede sobreponerse al dolor de esos sacrificios y aprender la lección, esa persona obtendrá un corazón de acero, que es invaluable." FMA

RESUMEN

La medicina tradicional Mexicana constituye un legado de conocimiento, el cual se ha ido acumulado a través del tiempo sobre la relación del hombre con las prácticas para prevenir, tratar y diagnosticar diversas patologías mediante el uso empírico de los recursos naturales. México posee una gran diversidad florística y el empleo de plantas en la medicina tradicional ofrece la oportunidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos con potencial farmacológico que pueden modificar la respuesta inmunitaria. Esto permitirá una opción terapéutica a padecimientos como inmunodeficiencias, hipersensibilidad y autoinmunidad.

En la medicina tradicional Mexicana, especies como *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl. (Burseraceae), *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. (Asteraceae) han sido ampliamente utilizadas para tratar diferentes padecimientos y estudios avalan que poseen efectos farmacológicos. Sin embargo, se desconoce si estos productos naturales presentan efectos inmunoestimuladores.

Algunos componentes celulares para llevar a cabo una eficaz respuesta inmunológica son los macrófagos, los linfocitos y las células NK (natural killer). Sin embargo, una desregulación en estas células puede ocasionar estados patológicos.

En este trabajo se determinó en modelos celulares *in vitro*, diferentes concentraciones de los extractos de *B. fagaroides*, *P. serotinum* y del compuesto acetato de matorin (ACM), obtenido de *P. peltatum*, en la función de macrófagos murinos, a través de la actividad fagocítica y liberación de NO, actividad de las células NK y proliferación en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y esplenocitos murinos.

Se obtuvo como resultados que los extractos de *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM poseen una función activadora de los macrófagos revelada por su actividad pinocítica, fagocítica y capacidad para modular la producción de óxido nítrico y mejorar la actividad de los linfocitos sobre su viabilidad. Los resultados sugieren la habilidad de estos productos naturales para mejorar la respuesta inmune, lo que supone la cooperación de estos productos naturales con las células natural killer y los macrófagos.

Abreviaturas

- **ACM:** Acetato de Maturin
- **ANOVA:** Análisis de la Varianza (del inglés Analysis of Variance)
- **BCG:** Bacilo de Calmette y Guérin
- **BRMs:** Modificadores de la Respuesta Biológica (del inglés Biological Response Modifiers)
- **COX:** Ciclooxygenasa
- **CPH II:** Complejo Principal de Histocompatibilidad Tipo II
- **CTL:** Células T citotóxicas (CTL, citolíticas)
- **D.E:** Desviación Estándar
- **D.O:** Densidad óptica
- **DMSO:** Dimetil Sulfoxido
- **FDA:** Agencia de Drogas y Alimentos (del inglés Food and Drug Administration)
- **IFN- γ :** Interferon Gamma
- **IL:** Interleucina
- **K562:** Células de Eritroleucemia Humana
- **L5178Y :** Linfoma Murino
- **LPS:** Lipopolisacáridos
- **MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- **m.s.n.m:** Metros sobre el nivel del mar
- **NK:** Natural Killer
- **NO:** Óxido Nítrico
- **NOS₂:** Óxido Nítrico Sintetasa
- **O₂⁻:** Anión Superóxido
- **ONOO⁻:** Anión Peroxinitrito
- **PBMC:** Células Mononucleares de Sangre Periférica Humana
- **PBS:** Solución Amortiguadora de Sales de Fosfato
- **p-NPP :** p-nitrofenil Fosfatasa
- **RAW264.7:** Línea celular de Macrófagos Murinos
- **SFB:** Suero Fetal Bovino
- **SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
- **Th:** Células T Colaboradoras (del inglés T-Helper).
- **TNF- α :** Factor de Necrosis Tumoral Alfa
- **VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

Índice General

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| MARCO TEÓRICO | 3 |
| 1. El sistema inmune..... | 3 |
| 1.1. Mediadores celulares de la respuesta inmune | 4 |
| 1.2. Mediadores moleculares implicados en la respuesta inmune..... | 5 |
| 1.3. Actividad inmunomoduladora de compuestos naturales..... | 7 |
| 1.3.1. Estrategias para la evaluación de la actividad inmunomoduladora..... | 8 |
| 1.3.2. Plantas Mexicanas <i>Bursera fagaroides</i> , <i>Phoradendron serotinum</i> , <i>Psacalium peltatum</i> con probables efectos inmunomoduladores | 9 |
| 1.3.2.1. <i>Bursera fagaroides</i> | 9 |
| 1.3.2.2. <i>Phoradendron serotinum</i> | 10 |
| 1.3.2.3. <i>Psacalium peltatum</i> | 11 |
| 1.4. Planteamiento del problema | 12 |
| 1.5. Justificación | 14 |
| 1.6. Hipótesis | 15 |
| 1.7. Objetivo general..... | 15 |
| 1.8. Materiales y métodos | 16 |
| 1.9. Resultados..... | 21 |
| 1.10. Discusión | 31 |
| 1.11. Discusión general <i>B. fagaroides</i> , <i>P. serotinum</i> y el compuesto ACM | 34 |
| 1.12. Conclusiones | 36 |
| 1.13. Anexos..... | 37 |
| 1.14. Bibliografía..... | 53 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Células y factores humorales que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa | 3 |
| Figura 2. Los mecanismos moleculares y celulares de la inmunidad innata y adquirida... .. | 6 |
| Figura 3. <i>Bursera fagaroides</i> | 9 |
| Figura 4. <i>Phoradendron serotinum</i> | 10 |
| Figura 5. <i>Psacalium peltatum</i> | 11 |
| Figura 6. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales sobre la producción de nitritos totales por macrófagos murinos.. .. | 23 |
| Figura 7. Actividad pinocítica de macrófagos de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales..... | 24 |
| Figura 8. Actividad de la enzima lisosomal celular de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales en macrófagos..... | 25 |
| Figura 9. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales en la viabilidad celular de esplenocitos de ratón..... | 28 |
| Figura 10. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)... .. | 29 |
| Figura 11. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales sobre la actividad de células natural killer..... | 30 |

Introducción

El uso empírico de plantas medicinales como agentes antitumorales, antivirales, antiinflamatorios, antidiabéticos y antibióticos se ha incrementado en las últimas décadas (WHO, 2004). El interés de utilizar las plantas en la medicina tradicional ha permitido el descubrimiento de fármacos, a partir del aislamiento de compuestos bioactivos que sirven también como precursores sintéticos. Algunos medicamentos utilizados comercialmente, aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) fueron obtenidos a partir de principios naturales, entre estos compuestos se encuentran la aspirina (ácido acetilsalicílico), medicamento diseñado a partir de la salicilina, sustancia aislada de la corteza del árbol *Salix alba*. Flavocoxid (Limbrel), la cual es una mezcla patentada de flavonoides obtenida de *Scutellaria baicalensis* Georgi y *Acacia catechu* Willd., se comercializa como “suplemento alimenticio”. En Estados Unidos esta preparación aún se encuentra en la fase I de ensayos clínicos como terapia para la osteoartritis de la rodilla. Flavocoxid contiene componentes activos con propiedades antiinflamatorias, cuya función es la inhibición de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) y lipoxigenasa (5-LOX). Iscador® (*Viscum album* L.) está aprobado por la FDA en Estados Unidos como remedio homeopático, en la actualidad se encuentra en la fase II de ensayos clínicos como tratamiento complementario para pacientes con cáncer de pulmón. La toxicidad de Iscador® se ha demostrado contra células tumorales y su actividad inmunomoduladora. Asimismo, Iscador® posee lectinas que son capaces de inducir necrosis tumoral, aumentar la producción de IL-1, IL-6, las cuales son responsables de efectos inmunoestimuladores (Salim *et al.*, 2008).

En México se usan plantas medicinales para la atención primaria de salud en comunidades rurales y urbanas, donde los conocimientos etnobotánicos se han transmitido por generaciones. México posee una gran biodiversidad florística y alrededor de 3,000 especies de plantas se han reportado con propiedades medicinales empíricas (Linares *et al.*, 1999), de las cuales un porcentaje pequeño cuenta con estudios fitoquímicos, farmacológicos y biológicos.

Enfermedades del sistema inmunológico donde la respuesta inmune es ineficaz (inmunodeficiencia), exagerada (hipersensibilidad) o actúa contra el propio organismo (autoinmunidad) y padecimientos como el cáncer, han dirigido la búsqueda de compuestos naturales con actividad inmunomoduladora. Estos nuevos compuestos se espera que puedan estimular, modificar o intensificar la participación de factores celulares y humorales en la respuesta inmune. El término inmunomodulador en la medicina tradicional no existe, por lo cual es difícil seleccionar plantas que tengan efectos adyuvantes sobre el sistema inmune. Sin embargo, se ha reportado que plantas con propiedades antiinflamatorias y citotóxicas pueden presentar efectos inmunomoduladores (Yamada, 1991; Sánchez *et al.*, 2002). Las plantas representan una fuente importante de compuestos inmunomoduladores (Sánchez *et al.*, 2002). Investigaciones revelan que plantas medicinales y sus compuestos activos tienen la capacidad de regular la respuesta inmune en ensayos *in vivo* e *in vitro*, modulando la actividad de

linfocitos, incrementando la fagocitosis, secreción de inmunoglobulinas, liberación de moléculas como la histamina y citocinas (Patwardhan y Gautam, 2005). Algunas plantas Mexicanas que han mostrado efectos inmunomoduladores son las especies *Carica papaya* (papaya), la cual reduce la producción de IL-2 e IL4 en células mononucleares de sangre periférica mejorando su actividad citotóxica en células K562 (Otsuki *et al.*, 2010). En el mismo estudio se demostró que *Carica papaya* mejoró la expresión de genes inmunoreguladores tales como CCL2, CCL7, CCL8 y SERPINB2. Por otro lado, *Persea americana* (aguacate) posee una actividad proliferativa en linfocitos T de ratas en pruebas *in vitro* (Gomez-Flores *et al.*, 2008). *Lophophora williamsii* (Peyote) activa la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos, estimula la proliferación de linfocitos del timo murinos, incrementa las señales de ARNm para las citocinas inflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8 en linfocitos de humano (Franco-Molina *et al.*, 2003).

En la medicina tradicional Mexicana, especies como *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl. (Burseraceae), *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. (Asteraceae) han sido ampliamente utilizadas para tratar diferentes padecimientos y estudios realizados avalan que poseen diversos efectos farmacológicos (Puebla-Pérez *et al.*, 1998; Alarcon *et al.*, 2010; Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no se conoce bien el efecto que tienen estas plantas sobre el sistema inmune.

Bursera fagaroides (Burseraceae) se utiliza tradicionalmente para combatir la diarrea, fiebre, gingivitis, tos y sarampión (Yasunaka *et al.*, 2005) y se ha reportado que posee la capacidad de disminuir el crecimiento tumoral del linfoma murino L5178Y en ratones (Puebla-Perez *et al.*, 1998). Así mismo se ha descrito que *Bursera fagaroides* podría presentar propiedades inmunoestimuladoras (Puebla-Perez *et al.*, 1998). *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) es utilizada tradicionalmente como analgésico, antiviral, anticancerígeno, antidiabético, infecciones del tracto urinario, dismenorrea (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). *Psacalium peltatum* (Asteraceae) se ha empleado principalmente como hipoglucemiante y se reporta que tiene efectos antiinflamatorio y antioxidante por la presencia del alcaloide maturin (Alarcon *et al.*, 2010). De acuerdo con Alarcon *et al.*, (2010), esta especie también podría tener efectos inmunoestimuladores.

Marco teórico

1. El sistema inmune

El sistema inmune está constituido por células y mediadores moleculares responsables de la protección del huésped frente a sustancias extrañas, mediante el reconocimiento e inicio de una respuesta global y coordinada, destinada a eliminar patógenos.

La respuesta inmune se divide en dos categorías: la respuesta innata (natural, no específica) y la respuesta inmune adaptativa (adquirida, específica) (Roitt *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2004; Twycross y Aickelin, 2010). Los mecanismos moleculares y celulares de la inmunidad innata y adquirida participan de manera integrada para mantener la homeostasis y protección del huésped (Abbas *et al.*, 2004; Chaplin, 2010),

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa ante microorganismos. Sin embargo, es incapaz de reconocer diferencias específicas entre sustancias extrañas y no genera memoria. Las células que participan en la respuesta inmune innata son barreras anatómicas, físicas, químicas, así como las células NK (natural killer), fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos, células dendríticas) y fagocitos polimorfonucleares (mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos), los cuales liberan factores humorales, colectinas, interferones, quimiocinas y sistema del complemento (Abbas *et al.*, 2004; Chaplin, 2010) (Fig. 1A).

La respuesta inmune adaptativa actúa hasta que existe un reto antigénico para el organismo, cuando la respuesta inmune innata es superada ante la infección de determinado patógeno. Por lo cual, la respuesta inmune adaptativa es un mecanismo mucho más evolucionado, presenta alta especificidad a distintos tipos de agentes infecciosos y tiene la capacidad de recordar y responder con más intensidad tras exposiciones repetidas a mismos patógenos (Parkin y Cohen, 2001; Chaplin, 2010). Los componentes principales de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos B, T y sus productos de secreción (Fig. 1B).

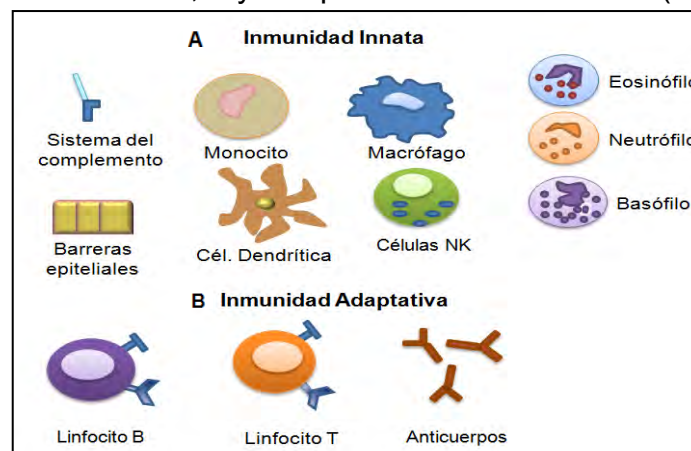


Figura 1. Células y factores humorales que participan en la respuesta inmune innata (A) y adaptativa (B).

1.1. Mediadores celulares de la respuesta inmune

Linfocitos

Los linfocitos son las células principales que participan en la respuesta inmune adaptativa y se caracterizan por su especificidad en reconocer determinados antígenos (Parkin y Cohen, 2001; Abbas *et al.*, 2004; Goldsby *et al.*, 2004). Se pueden distinguir distintos subtipos de linfocitos que difieren en función y productos proteicos (Fig. 2A).

-Linfocitos B. Son células capaces de producir anticuerpos (inmunoglobulinas) en los mamíferos. La función del linfocito B es reconocer el antígeno específico para después multiplicarse y diferenciarse a células plasmáticas y producir moléculas solubles del receptor (anticuerpos) que se unen al antígeno (Parkin y Cohen, 2001, Roitt *et al.*, 2003).

-Linfocitos T. Los precursores de los linfocitos T, provienen de la médula ósea pero migran y maduran en el timo. Su función es liberar citocinas e interactuar con otras células. Sin embargo, sólo son capaces de reconocer su antígeno cuando es presentado en la superficie de otra célula por las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH tipo I y II) (Roitt *et al.*, 2003; Chaplin, 2006).

Los linfocitos T se dividen en subgrupos:

-Células T colaboradoras (Th, del inglés T-Helper). Interaccionan con las células B para estimular su proliferación, diferenciación y síntesis de anticuerpos, además colaboran con fagocitos mononucleares para destruir patógenos intracelulares.

-Células T citotóxicas (citólíticas, CTL). Se encargan de destruir células infectadas por patógenos intracelulares, células infectadas con virus, células tumorales, etc.

-Linfocitos NK (natural killer, citólíticos naturales). Derivan de la médula ósea, se encuentran en la sangre, en tejidos linfoides, especialmente en el bazo y participan en la inmunidad innata. Los linfocitos NK poseen gránulos que contienen perforinas, granzimas y proteoglicanos. Los receptores que presentan estas células son diferentes al linaje de las células B y T. Los linfocitos NK expresan moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), reconocen y destruyen a células tumorales y células infectadas con virus (Roitt *et al.*, 2003; Goldsby *et al.*, 2004; Chaplin, 2006; Chaplin, 2010) (Fig. 2B).

Fagocitos mononucleares

El sistema mononuclear fagocítico comprende células que tienen origen en la médula ósea y su principal función es la fagocitosis de microorganismos patógenos.

Los monocitos son células que se derivan de un precursor mieloide que da origen a un promonocito y más tarde a monocitos sanguíneos que abandonan la médula ósea para entrar a circulación. Los monocitos migran hacia diferentes tejidos para diferenciarse en macrófagos específicos dependiendo de sus funciones y localización.

La principal función efectora del macrófago en la inmunidad innata es fagocitar y sintetizar citocinas que activan y reclutan a otras células inflamatorias. También participan en la inmunidad adaptativa, son activadas por las células T estimuladas

por antígenos, así mismo actúan como células presentadoras de antígenos (Goldsby *et al.*, 2004) (Fig. 2C).

Fagocitosis y Pinocitosis

Existen dos formas en el que las células introducen partículas por medio de invaginación de su membrana formando vesículas: fagocitosis y pinocitosis.

La fagocitosis es el proceso conservado filogenéticamente e importante dentro de la inmunidad innata en el cual leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y macrófagos ingieren y eliminan partículas grandes (Chaplin, 2006), cuyo tamaño es mayor de 1 μm , agentes infecciosos, células senescentes y los desechos celulares (Greenberg y Grinstein, 2002).

La fagocitosis tiene dos finalidades en la respuesta inmune: introducir al agente extraño dentro de vesículas denominadas fagosomas, que luego se unirán con los lisosomas, formando el fagolisosoma que contiene enzimas hidrolíticas. La segunda, la presentación de antígenos, que consiste en tomar los péptidos antigénicos de los microorganismos y separarlos para luego poder procesarlos y unirlos a las moléculas del CPH II (Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo II). Este proceso contribuye a que las células B que han sido activadas produzcan y liberen anticuerpos específicos que se unirán a los antígenos, lo cual ayuda a reclutar macrófagos que los eliminarán con eficacia (Abbas *et al.*, 2004) (Fig. 2C).

La pinocitosis se refiere a la absorción de fluido y solutos mediante la formación de vesículas pinocíticas, también es conocida como macropinocitosis cuando la célula es capaz de captar grandes volúmenes de fluido en el que no intervienen receptores y permite internalizar antígenos. Esta actividad endocítica es característica de las células dendríticas, mientras que en macrófagos y células epiteliales solo se induce a través de la activación celular (Aderem y Underhill, 1999).

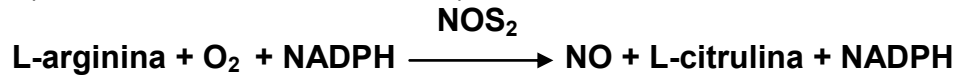
1.2. Mediadores moleculares implicados en la respuesta inmune

Producción de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos

Células fagocitarias como macrófagos y neutrófilos participan en la defensa antimicrobial y antitumoral por medio de la liberación de moléculas altamente tóxicas como intermediarios de nitrógeno reactivo (INR) y especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fig. 2C).

El óxido nítrico (NO) es producido por macrófagos a través de la óxido nítrico sintetasa (NOS₂), la cual es activada por la inducción de citocinas (IFN- γ y TNF- α), citocinas inhibitoras (IL-4, IL-10, IL-13), producto de células Th1 o Th2, componentes microbianos y otros estímulos inmunológicos (Bogdan *et al.*, 2000; Bogdan, 2001).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y el oxígeno molecular por la actividad enzimática de la óxido nítrico sintetasa (iNOS o NOS₂) y se requiere de NADPH como donador y sustrato (Bogdan *et al.*, 2000). El NO también puede combinarse con el anión superóxido (O₂⁻) para formar anión peroxinitrito (ONOO⁻), un agente oxidante con actividad citotóxica que puede nitrosilar residuos de tirosina como el de la actina y miosina, además de enzimas como la creatina cinasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato cinasa. Sin embargo, la producción de altas cantidades de NO puede dañar las células del huésped (Ramirez-Emiliano *et al.*, 2007).



De esta manera, el NO que producen los macrófagos resulta tóxico para los patógenos y células infectadas. El NO ingresa a las células e inactiva proteínas que participan en la producción de energía, transducción de señales y síntesis de ácidos nucleicos induciendo la muerte celular (Ramirez-Emiliano *et al.*, 2007).

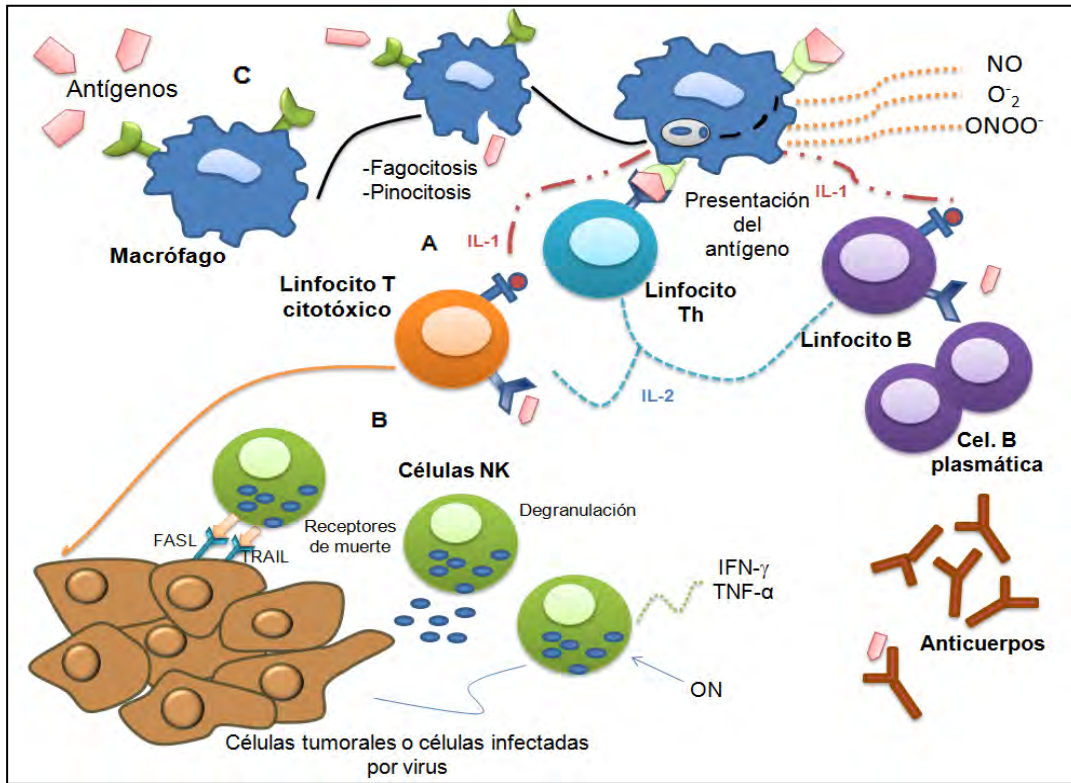


Figura 2. Los mecanismos moleculares y celulares de la inmunidad innata y adquirida participan de manera integrada para mantener la homeostasis y protección del huésped. Los linfocitos B y linfocitos T, son células que actúan en la respuesta inmune adaptativa y se caracterizan por su especificidad en reconocer determinados antígenos (A). Los linfocitos NK participan en la inmunidad innata, reconociendo y destruyendo células tumorales y células infectadas con virus (B). Los macrófagos participan en la defensa antimicrobial y antitumoral por medio de la liberación de moléculas altamente tóxicas, su principal función efectora en la inmunidad innata es fagocitar y sintetizar citocinas que activan y reclutan a otras células inflamatorias (C).

1.3. Actividad inmunomoduladora de compuestos naturales

La actividad inmunomoduladora se refiere al efecto que algunos fármacos tienen sobre factores humorales o celulares que participan tanto en la respuesta inmune innata como en la adquirida. Este efecto puede ser un regulador para inhibir o intensificar selectivamente poblaciones de células como linfocitos, macrófagos, neutrófilos, natural killer y citotóxicas (CTL) o producir mediadores solubles como las citocinas (Atal *et al.*, 1986; Sánchez *et al.*, 2002).

Dentro de las sustancias inmunomoduladoras se encuentran los agentes inmunoestimuladores, los cuales restauran y aumentan las funciones del sistema inmune cuando existen procesos de inmunosupresión (cáncer, SIDA, etc.) y los inmunosupresores, los cuales inhiben una respuesta inmune sobre expresada, como es el caso de procesos inflamatorios.

Muchas preparaciones vegetales utilizadas en la medicina tradicional tienen la capacidad de influir sobre el sistema inmunológico y se ha demostrado, en varios ensayos *in vivo* e *in vitro*, que modulan la secreción de citocinas, la liberación de histamina, la secreción de inmunoglobulinas, el cambio de clase de inmunoglobulinas y la expresión de correceptores celulares (Patwardhan y Gautam, 2005). Por ejemplo saponinas glicosiladas triterpénicas aisladas de *Randia dumetorum*, planta utilizada en la medicina india, incrementaron *in vitro* la proliferación de linfocitos humanos (Yamada, 1991). Se ha observado que algunas plantas que son capaces de modificar la respuesta inmune, también poseen una influencia natural de citotoxicidad contra células tumorales. El extracto de *Viscum álbum* L. (Viscaceae) (Isclador-M®) posee componentes que aumentan considerablemente la actividad citolítica de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (Yamada, 1991).

1.3.1. Estrategias para la evaluación de la actividad inmunomoduladora

Una de las forma para detectar compuestos inmunoestimuladores es a través de modelos *in vivo* utilizando animales tratados con compuestos que causan inmunosupresión, que permiten indicar si un extracto¹ o compuesto² de origen natural es capaz de mejorar la respuesta inmune (Tabla 1). Sin embargo, estos modelos podrían representar inconvenientes si se requieren evaluar un número mayor de compuestos (Sánchez *et al.*, 2002), debido a que resulta muy costoso el mantenimiento de animales de laboratorio.

Los ensayos *in vitro* son los más utilizados para el escrutinio de compuestos, permiten evaluar el estado funcional de diferentes tipos celulares del sistema inmune (fagocitos mononucleares, linfocitos etc.) (Tabla 1). El modelo *in vitro* permite evaluar los mecanismos de acción molecular a través de los cuales, compuestos y extractos ejercen sus efectos inmunomoduladores. En los ensayos *in vitro* se puede evaluar un gran número de compuestos y extractos.

| <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> |
|--|--|
| Fagocitosis (Chen <i>et al.</i> , 2001) | Ensayo de proliferación linfocitaria (Weifa <i>et al.</i> , 2007) |
| Ensayo de quimiotaxis (Ward, 1979) | Ensayo de la actividad de las NK (Hai-Shun <i>et al.</i> , 2009) |
| Prueba de aclaramiento de carbón (Chen <i>et al.</i> , 2010) | Producción de NO por macrófagos (Oviedo Chávez <i>et al.</i> , 2005) |
| | Pinocitosis y fagocitosis en macrófagos (Jiong-Ran <i>et al.</i> , 2010) |

Tabla 1. Modelos *in vivo* e *in vitro* utilizados en la evaluación de efectos inmunomoduladores.

¹ Extracto: Es un preparado obtenido por concentración de líquidos extractivos, resultando una mezcla compleja de compuestos, que contiene la porción biológica activa. Definición modificada de Kuklinski C., (2003).

² El compuesto y/o principio activo: se definen como la sustancia química que ejerce actividad farmacológica. La purificación y aislamiento de los principios activos se puede llevar a cabo por métodos no cromatográficos o por métodos cromatográficos. Tomado de Kuklinski C., (2003).

1.3.2. Plantas Mexicanas *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum*, *Psacalium peltatum* con probables efectos inmunomoduladores

1.3.2.1. *Bursera fagaroides*

Las especies de *Bursera* se encuentran distribuidas a lo largo de Estados Unidos, Perú y México. Nuestro país presenta una mayor diversidad con cerca de 85 subespecies, de las cuales 75 son endémicas de México (Rzedowski, 1978). Las especies del género *Bursera* se caracterizan por ser resinosas y olorosas debido a la presencia de terpenos volátiles tales como α -pineno, β -felandreno, limoneno, careno (Becerra *et al.*, 2001).

Bursera fagaroides se puede localizar en matorrales espinoso, subespinoso, subinermes, matorral subtropical-encino, selva baja caducifolia-bosque de encino. *Bursera fagaroides* (Fig. 3) es un árbol o arbusto, dioico de 0.5 a 8 m de altura, glabro, el tronco puede tener un diámetro de 30 cm. La corteza externa, exfoliante de láminas delgadas de color amarillo-grisáceo, látex blanquecino o amarillento, hojas imparipinnadas (trifoliadas o simples), pecíolo de 0.5 a 2.5 cm de largo, raquis con alas inconspicuas, la nervadura es central conspicua en el envés. Las flores se presentan generalmente solitarias o a veces agrupadas en inflorescencias cortas, aglomeradas densamente en las puntas de ramillas cortas. Las flores masculinas son pentámeras, algunas veces trímeras o tetrámeras, pétalos verdosos a blanco-amarillentos, oblongos a oblongo-oblancheolados, de 3 a 6 mm de largo. Las flores femeninas son similares en forma y tamaño, casi siempre trímeras (Cerde-Lemus, 2011).

Es utilizado tradicionalmente para combatir la diarrea, fiebre, gingivitis, tos y sarampión (Yasunaka *et al.*, 2005). Se ha descrito la presencia de lignanos, relacionados a podofilotoxina en los extractos etanólicos del exudado seco de *Bursera fagaroides* (Rojas-Sepulveda *et al.*, 2012).

El extracto hidroalcohólico de la corteza de *B. fagaroides* presentó la capacidad de disminuir el crecimiento tumoral del linfoma murino L5178Y en modelos de ratones BALB/c (Puebla-Pérez *et al.*, 1998). *B. fagaroides* también posee efectos de aglutinación e inmovilización en espermatozoides humanos y de ratón (Huacuja *et al.*, 1990).



Figura 3. *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl., (Burseraceae) (Cerde-Lemus, 2011).

1.3.2.2. *Phoradendron serotinum*

El género *Phoradendron*, perteneciente a la familia (Viscaceae), conocido comúnmente como muérdago, es un arbusto hemiparásito, localizado principalmente en ambientes semicálidos de América.

Phoradendron serotinum es una especie con taxonomía y nomenclatura complicadas. Kuijt (2003) subdivide esta especie en subespecies: *P. serotinum* ssp. *tomentosum*, *P. serotinum* ssp. *angustifolium*.

Phoradendron serotinum se distribuye desde el este y el oeste de Estados Unidos hasta el centro de México. Es un arbusto parásito con alturas de hasta 1 m. Generalmente de color amarillo, hojas elípticas a ovadas o suborbiculares, de 1.5 a 3 cm de largo, 0.8 a 2 cm de ancho, inflorescencias hasta de 8 cm de largo, fruto subgloboso a ovoide (Fig. 4) *Phoradendron serotinum* usualmente parasita varias especies de *Quercus* (Rzedowski y Calderón De Rzedowski, 2011).

Phoradendron serotinum se utiliza en la medicina tradicional como analgésico, antiviral, anticancerígeno, cicatrizante, presión baja, infecciones del tracto urinario, venas varicosas y dismenorrea (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011).

Estudios fitoquímicos han demostrado la presencia de c-glicósido de flavona vitexina en las hojas de *Phoradendron serotinum* (Dossaji *et al.*, 1983).

Estudios farmacológicos demuestran que el extracto acuoso de *Phoradendron serotinum* presentó efectos tóxicos en células humanas de cáncer, estimuló la proliferación de las células humanas mononucleares de sangre periférica con fitohemaglutinina 1 µg/mL (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). Se conoce que la especie Europea del muérdago *Viscum álbum* L. (Viscaceae) y sus lectinas se han asociado a la reducción en el tamaño de tumores en ratones. Por tanto se evidencia una actividad antitumoral que además involucra inmunomodulación y apoptosis de células cancerígenas (Jean-Paul *et al.*, 2006). De esta manera es probable que la especie Americana de muérdago *Phoradendron serotinum* también pudiera presentar efectos inmunomoduladores.



Figura 4. *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae). Fuente: <http://www.delawarewildflowers.org/plant.php?id=1437>

1.3.2.3. *Psacalium peltatum*

Psacalium peltatum también denominado “Matarique” (maturi=mata dolor), pertenece a la familia Asteraceae y se distribuye en la Sierra Madre Oriental y el Centro de México en los estados de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán y Puebla. Se encuentra en los bosques de encino, bosques de coníferas, matorral xerófilo y pastizales. Se distribuye a un intervalo altitudinal que abarca desde los 1 300 a 4 200 m.s.n.m (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Psacalium peltatum (Fig. 5A) es una hierba perenne que mide de 0.3 a 1.3 m, la raíz es gruesa y fibrosa, los tallos con hojas y brácteas involucrales esparcidas, densamente pilosas o hirsutas, con pelos multicelulares. El tallo principal estriado-acanalado y meduloso, lanoso en la base cerca de la raíz, hojas basales 3 ó 4 cm en roseta, láminas suborbiculares, peltadas y palmatinerves, profundamente multilobadas. Sus hojas son caulinares intermedias reducidas, subpeltadas y semiamplexicaules, presenta inflorescencia paniculadocorimbosa, las ramillas y los pedicelos a veces densamente glandular-estipitados. Cabezuelas discoidales 10 a 100, de 1 a 1.5 cm de alto, sobre pedúnculos de 0.3 a 2 cm de largo: involucre campanulado o ligeramente cilíndrico. Sus brácteas de 8 a 14, oblongoelípticas, de 8 a 12 mm de largo, acuminadas en el ápice, café rojizas, cálculo con 2 a 5 brácteas angostamente ovadas a lineares, frecuentemente más largas y anchas que las brácteas involucrales, receptáculo plano y ligeramente alveolado. Flores de 10 a 24, de color crema a café o algo purpúreas, con olor desagradable de 14 a 21 mm de largo; frutos aquenios maduros elipsoides a claviformes, de 3 a 6 mm de largo, multiestriados, glabros a tomentulosos, de color crema o verdosos (Bye *et al.*, 1995).

En la medicina tradicional se utiliza para tratar la diabetes, reumatismo, enfermedades renales y gastrointestinales (Bye *et al.*, 1995; Garduño-Ramírez *et al.*, 2001)

Alarcon *et al.* (1997), reportaron que las decocciones de las raíces *P. peltatum* y *P. decompositum* mostraron la presencia de maturin (Fig. 5B). Asimismo, se indicó que alcaloides presentes en estas especies pudiesen estar actuando como antioxidantes y antiinflamatorios (Alarcon *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que una fracción acuosa de *Psacalium peltatum* contenía componentes del tipo carbohidratos que reducen los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el suero. También, esta fracción incrementó los niveles de interferon gamma (IFN- γ) e IL-10 en ratones que fueron tratados con estreptozotocina para inducir diabetes (Alarcon *et al.*, 2010).

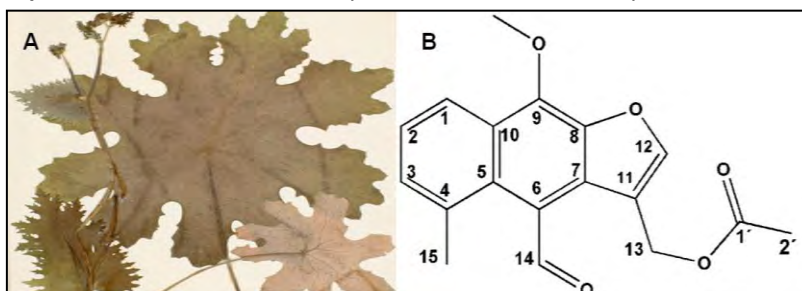


Figura 5. *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. (Asteraceae) (A). Estructura química del acetato de maturin (B). Fuente: <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=Psacalium+peltatum>

1.4. Planteamiento del problema

La modulación del sistema inmune a través de su estimulación o supresión puede contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud. El uso de agentes que activan los mecanismos de defensa del huésped (inmunoestimuladores o inmunopotenciadores) proporcionaría una herramienta terapéutica adicional a la quimioterapia convencional en personas inmunosuprimidas (Cutler, 2003). Por tal motivo, un elevado número de investigaciones biomédicas se orientan a la búsqueda de nuevos compuestos que sean capaces de estimular la respuesta inmune en pacientes inmunodeficientes, como los que padecen VIH/SIDA, cáncer y desnutrición. Numerosas sustancias estimuladoras del sistema inmunológico han sido aisladas de plantas y hongos superiores, lo cual abre las puertas para el desarrollo de fármacos con propiedades inmunoestimulantes.

Las inmunodeficiencias secundarias o adquiridas se desarrollan como consecuencia de estados de malnutrición, cáncer metastásico, tratamientos con fármacos inmunosupresores o infecciones víricas que afectan a las células del sistema inmune, especialmente por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Abbas *et al.*, 2002). En estos casos surge la necesidad de inmunoestimulación, para restaurar y aumentar las funciones del sistema inmune.

Entre los fármacos estimuladores del sistema inmune frecuentemente utilizados se encuentran los modificadores de la respuesta biológica (BRMs, del inglés *Biological Response Modifiers*), como la vacuna BCG (bacilo de Calmette y Guérin), el OK-432, o citocinas como el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-2 (IL-2) (Mocellin, 2005). Una limitación en el empleo de estos fármacos, de manera general, son los efectos secundarios que causan, como fiebre, escalofríos, erupciones, edema, hipotensión arterial, insuficiencia cardíaca congestiva o toxicidad a nivel del sistema nervioso central (Hirotsu *et al.*, 2001).

En México existen escasas investigaciones sobre plantas medicinales que tengan un efecto adyuvante sobre el sistema inmune. Sin embargo, se ha reportado que plantas con propiedades antiinflamatorias y citotóxicas poseen efectos inmunomoduladores con capacidad de influir sobre factores celulares y humorales de la respuesta inmune (Yamada, 1991; Sánchez *et al.*, 2002). Enfermedades como el cáncer, infecciones crónicas e inflamaciones son consideradas como inmunosupresoras. Por lo cual, es necesario la búsqueda de compuestos que pudieran, además de presentar un efecto citotóxico, antibiótico o antiinflamatorio, ser adyuvantes al sistema inmune. De esta manera se pudiera potenciar el efecto farmacológico.

En este trabajo se evaluó la actividad inmunoestimuladora de extractos y compuestos vegetales de plantas utilizadas en la medicina tradicional Mexicana, *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl., (Burseraceae), *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. (Asteraceae).

Previamente se reportó que *Bursera fagaroides* (Puebla-Perez *et al.*, 1998) y *Phoradendron serotinum* (Jacobó-Salcedo *et al.*, 2011) presentan efectos tóxicos en células humanas de cáncer. Además, Puebla-Perez *et al.*, (1998) indicaron que *Bursera fagaroides* posee efectos inmunomoduladores. Sin embargo, estos autores no reportan evidencia científica sobre este efecto. Por otro lado, el compuesto acetato de maturin obtenido de extractos hexánicos de las raíces de *Psacalium peltatum* presentó efectos antiinflamatorios (resultados no publicados).

1.5. Justificación

Las plantas utilizadas en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento de inflamaciones locales y sistémicas denotan una fuente importante de moléculas con propiedades inmunomoduladoras (Sánchez *et al.*, 2002). Estas plantas tienen un efecto estimulante, supresor o regulador de la respuesta inmune y pueden también presentar actividad citotóxica contra células tumorales (Patwardhan y Gautam, 2005; Licciardi *et al.*, 2011).

Compuestos naturales con actividad inmunoestimuladora capaces de intensificar la participación de factores celulares y humorales en la respuesta inmune (Sánchez *et al.*, 2002) permitirán tratar enfermedades del sistema inmunológico como inmunodeficiencias y padecimientos como el cáncer.

En la medicina tradicional Mexicana, especies como *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl., (Burseraceae), *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. (Asteraceae) han sido ampliamente utilizadas para tratar diferentes padecimientos y estudios realizados avalan que poseen efectos farmacológicos (Puebla-Pérez *et al.*, 1998; Alarcon *et al.*, 2010; Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no se conoce bien el efecto que tienen estas plantas sobre el sistema inmune.

Nuestros estudios permitirán obtener mayor información sobre el efecto farmacológico de *Phoradendron serotinum*, *Bursera fagaroides* y acetato de matorin en células del sistema inmune. Nuestros resultados indicarán si estos extractos vegetales y el compuesto presentan efectos inmunoestimuladores. El descubrimiento de extractos y compuestos con actividad citotóxica y además que presenten efectos inmunomoduladores, sería una gran ventaja para el tratamiento de enfermedades que suprimen la actividad del sistema inmune.

1.6. Hipótesis

Los extractos de Plantas Mexicanas medicinales *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin, aislado de *Psacalium peltatum*, poseen actividad inmunoestimuladora en modelos *in vitro*.

1.7. Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto inmunoestimulador de los extractos de Plantas Mexicanas medicinales, *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin aislado de *Psacalium peltatum*.

Objetivos específicos

-Evaluar *in vitro* el efecto de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin aislado de *Psacalium peltatum*, en la producción de óxido nítrico de la línea celular RAW264.7 (macrófagos murinos) por el método de Griess.

-Estimar el efecto de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin aislado de *Psacalium peltatum*, en la actividad pinocítica de macrófagos por el método de rojo neutro.

-Evaluar el efecto de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin aislado de *Psacalium peltatum*, en la actividad fagocítica de macrófagos por medio de la actividad enzimática lisosomal de la fosfatasa ácida.

-Evaluar la viabilidad celular de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin aislado de *Psacalium peltatum*, en cultivos primarios de esplenocitos de ratón CD1 y linfocitos humanos de sangre periférica por el método con MTT.

-Analizar el efecto de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto acetato de maturin aislado de *Psacalium peltatum*, en la actividad de las células Natural Killer de la línea celular K562 por el método con MTT.

1.8. Materiales y Métodos

Recolección y Preparación del Material Vegetal

Bursera fagaroides

Semillas de *Bursera fagaroides* se colectaron en el municipio de Metepec, Puebla, México, durante Octubre de 2010. Una muestra de *Bursera fagaroides* se conservó en el herbario de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León (CFNL) con el número de referencia E. Estrada, 201612, CFNL. El material vegetal se secó bajo oscuridad a temperatura ambiente. Extractos de *Bursera fagaroides* se obtuvieron a partir de 100 g de semillas, las cuales se maceraron con etanol por 2 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a sequedad. El extracto seco se disolvió en 15 mL de metanol y se filtró por una membrana de nylon de 0.45 μm . Del extracto se obtuvieron 2.49 g, que posteriormente fue suspendido en DMSO conservándose a temperatura ambiente protegido de la luz.

Phoradendron serotinum

Hojas de *Phoradendron serotinum*, parasitarias en *Prosopis glandulosa* Torr var. torreyana M.C. Johnston, se colectaron en el municipio de Santa Catarina, Nuevo León, México, durante Julio de 2009. Una muestra de *Phoradendron serotinum* se conservó en el herbario de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León (CFNL) con el número de referencia E. Estrada, 20768, CFNL. El material vegetal se secó bajo oscuridad a temperatura ambiente. Extractos de *Phoradendron serotinum* se obtuvieron a partir de 100 g de hojas secas, las cuales se maceraron con etanol por 2 h. El disolvente se evaporó a sequedad. El extracto se disolvió en 15 mL de metanol y se filtró por una membrana de nylon de 0.45 μm . Del extracto se obtuvieron 5.5 g que posteriormente fue suspendido en DMSO conservándose a temperatura ambiente protegido de la luz.

Aislamiento de acetato maturin (ACM) de *Psacalium peltatum*

El aislamiento de acetato de maturin se llevó a cabo como se ha descrito recientemente (Rojano-Vilchis, *et al.*, 2012). Brevemente, las raíces de *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass., se obtuvieron del bosque de pino-encino en Mineral del Chico, Hidalgo, México. Un ejemplar de muestra fue depositado en el Herbario Nacional (MEXU 1.138.692), del Instituto de Biología, UNAM, México. Las raíces de *P. peltatum* (4,381 kg) se secaron al aire, se pulverizaron y se extrajeron con n-hexano por maceración exhaustiva a temperatura ambiente. El extracto hexánico de las raíces de *P. peltatum*, se separó en un proceso cromatográfico en columna y se eluyó con hexano-acetato de etilo en un gradiente de mezcla (98:2) para aislar el acetato de maturin (ACM). Las características espectroscópicas de este compuesto se compararon con los datos descritos previamente (Correa y Romo, 1966; Bohlmann *et al.*, 1977).

El extracto de *Bursera fagaroides* y el extracto de *Phoradendron serotinum* se resuspendieron en medio de cultivo. El acetato de maturin se disolvió en DMSO a una concentración final de 10 mM. La concentración máxima de DMSO que se empleó en los cultivos celulares fue de 0.05%. Las alícuotas preparadas fueron almacenadas a -4°C hasta su uso en cultivos celulares.

Animales

Se utilizaron ratones machos CD1, con un peso aproximado entre 25 a 30 g, del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento, se mantuvieron en jaulas con temperatura y humedad controladas. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (Guía para el tratamiento y cuidado de animales de laboratorio) y por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Los animales fueron alojados en cajas con filtros de aire en un ambiente controlado de temperatura y luz con ciclos de 12 h de luz/ oscuridad.

Líneas y condiciones de cultivo

Se emplearon las líneas celulares RAW264.7 (macrófagos murinos) y K562 (eritroleucemia humana), las cuales se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con bencilpenicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y suero fetal bovino (SFB) al 10 % (v/v), en incubación a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂. Se realizó el cambio de medio de cultivo a las células cada tercer día.

Al inicio de cada experimento, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con 3 mL de PBS (Solución Amortiguadora de Sales de Fosfato pH 7.3). Posteriormente el PBS se retiró y se adicionó 2 mL de tripsina (0.005 %) para despegar las células. Las cajas de cultivo se incubaron durante cinco minutos a 37 °C y después se adicionó 1 mL de medio de cultivo con SFB para inactivar la enzima. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Finalmente la pastilla celular se resuspendió en el volumen necesario de medio de cultivo para realizar el conteo de células, con hemocitómetro, para cada experimento.

Ensayo *in vitro* para la determinación de la concentración de Óxido Nítrico

La producción de NO por macrófagos se determinó mediante la reacción de Griess por medición de la cantidad total de nitritos obtenidos en el sobrenadante del cultivo (Green *et al.*, 1981). Se sembraron en placas de 96 pozos células RAW264.7 a una densidad de 1×10^5 por pozo durante 4 h para lograr su total adherencia antes del desarrollo del ensayo. Posteriormente, las células se trataron con los extractos *Bursera fagaroides* o *Phoradendron serotinum*, a concentraciones entre 1 y 50 µg/mL. Por otra parte, el compuesto acetato de maturin se evaluó a concentraciones de 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM. Los extractos y el compuesto se incubaron 48 h en presencia o ausencia de lipopolisacáridos 1 µg/mL.

La acumulación de nitritos se determinó mediante la mezcla de volúmenes iguales del medio de cultivo celular y la solución de Griess (1 % sulfanilamida, 0.1 % N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato, 5 % ácido fosfórico (H_3PO_4) a temperatura ambiente por 10 min. Al término de la reacción, se determinó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de Elisa. La concentración de nitritos (μM) se obtuvo por interpolación con referencia a una curva estándar de $NaNO_2$ en concentraciones entre 1 y 100 μM . De cada condición se realizaron 3 réplicas. Se utilizó LPS como control positivo y como control negativo células sin tratar. Los resultados se expresaron como % de concentración de NO_2 (μM).

Ensayo *in vitro* de la actividad enzimática lisosomal

Se determinó la actividad de la enzima lisosomal celular por la fosfatasa ácida en macrófagos de acuerdo a lo descrito anteriormente por Manosroi *et al.*, (2003). Células RAW264.7 se sembraron en placas de 96 pozos a una concentración de 1×10^6 células por pozo en medio RPMI 1640 suplementado al 10 % con SFB. Posteriormente, se adicionaron las concentraciones de los extractos entre 1 y 50 $\mu g/mL$ y de 1 a 25 μM con el compuesto. Al finalizar las placas se incubaron a 37 °C a 5 % de CO_2 durante 48 h. Después se descartó el sobrenadante y la monocapa de macrófagos de cada pozo se solubilizó en 20 μL de Tritón X-100 al 0.1 % y se adicionó 100 μL de 10 mM p-nitrofenil fosfatasa (p-NPP) y 50 μL de buffer de citratos a 0.1 M (pH 5.0) durante 30 min. Para terminar la reacción, se adicionó 150 μL de Buffer de borato a 0.2 M (pH 9.8). Se determinó la absorbancia en un lector de Elisa a 405 nm. Se utilizó LPS como control positivo y como control negativo células sin tratar. Los resultados se expresaron en porcentaje de la actividad de la enzima lisosomal $\% = (DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}) \times 100 / DO \text{ control negativo}$, donde DO= densidad óptica.

Ensayo de la actividad pinocítica por el método de rojo neutro

La capacidad pinocítica de los macrófagos se determinó por la captación del rojo neutro. Se sembraron 2×10^6 células de RAW264.7 por pozo en placas de 96 pozos en RPMI 1640 10% SFB, incubando a 37 °C a 5 % de CO_2 durante 3 h. Posteriormente se descartó el medio y se adicionó nuevo medio a los pozos, se agregó a las células los tratamientos de los extractos y compuesto en presencia o ausencia de LPS (1 $\mu g/mL$) por 48 h. Posteriormente se adicionó 100 μL (rojo neutro en PBS 10 mM a una concentración de 0.075 %), durante 2 h. Los sobrenadantes se descartaron y las células se lavaron con PBS para remover el exceso de rojo neutro que no fue fagocitado por los macrófagos y las células se lisaron con 100 μL de buffer de lisis (Etanol y ácido acético 0.001 %) en proporción de 1:1 por pozo. Finalmente, las células se incubaron a temperatura ambiente toda la noche y la densidad óptica se determinó a 540 nm (Jiong-Ran *et al.*, 2010). Se utilizó LPS como control positivo y como control negativo células sin tratar. Los resultados se expresaron como % de pinocitosis $\% = (DO \text{ control} - DO \text{ control negativo}) \times 100 / DO \text{ control negativo}$, donde DO= densidad óptica.

Ensayo de viabilidad celular en esplenocitos murinos

La extracción de esplenocitos del bazo de ratón se realizó como se describió previamente por Weifa *et al.*, (2007). Tras el sacrificio de los ratones, se procedió a extraer el bazo en condiciones estériles para la obtención de esplenocitos. El bazo se colocó en un tamiz de tela estéril sobre una caja de Petri con 3 mL de PBS, presionando suavemente y utilizando el émbolo de una jeringa desechable sin aguja (5 mL). La suspensión celular se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. El sedimento celular se resuspendió en RPMI al 10 % SFB y los esplenocitos se sembraron a una concentración de 2×10^5 células por pozo en placas de 96 pozos, incubando durante 4 h. Después, se descartó el medio de cultivo y se adicionó nuevo medio. Posteriormente, las células se trataron con los extractos de *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum*, a concentraciones de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ y el compuesto acetato de matorin a 1 a 25 μM durante 48 h. Los extractos y el compuesto se incubaron en presencia o ausencia de lipopolisacáridos (1 $\mu\text{g/mL}$). Se realizaron 3 replicas por cada ensayo. Se utilizó LPS como control positivo y como control negativo células sin tratar. La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico basada en la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán. Después de la incubación, se adicionó 10 μL del reactivo MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pozo, incubando por 4 h a 37 °C. Al finalizar se retiró el medio de cultivo adicionando 100 μL de DMSO (Dimetil sulfoxido). Se determinó la absorbancia en un lector de Elisa a 540 nm. Los resultados se expresaron como % de viabilidad celular = $(\text{DO control} - \text{DO muestra}) \times 100 / \text{DO control}$, donde DO = densidad óptica.

Ensayo de viabilidad celular en linfocitos de sangre periférica humano

El aislamiento de linfocitos se realizó por la técnica de gradiente sobre Ficoll/Hypaque. Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica humana de individuos sanos. La sangre se diluyó en PBS 1:1, los linfocitos se prepararon empleando la técnica Ficoll-Hypaque en una relación 1:3. El paquete celular se centrifugó por 20 min a 2500 rpm. Posteriormente, la pastilla celular se lavó 2 veces con PBS y se centrifugó 15 min a 1500 rpm. Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 10% SFB, se contaron y sembraron a 1×10^5 células por pozo. Después de 24 h, las células se trataron con los extractos de *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum*, a concentraciones de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ y el compuesto acetato de matorin a 1 a 25 μM durante 48 h. Se utilizó LPS como control positivo y como control negativo células sin tratar. Después de la incubación, se adicionó 10 μL del reactivo MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pozo, incubando por 4 h a 37 °C. Posteriormente las placas fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. Al finalizar se adicionó 100 μL de DMSO (Dimetil sulfoxido). Se determinó la absorbancia en un lector de Elisa a 540 nm. Los resultados se expresaron como % de viabilidad celular = $(\text{DO control} - \text{DO muestra}) \times 100 / \text{DO control}$, donde DO = densidad óptica.

Ensayo de actividad de las células Natural Killer (NK)

El ensayo se llevo a cabo de acuerdo a lo descrito por Hai-Shun *et al.*, (2009). Brevemente, se utilizó la línea celular K562 como células diana, sembrando 2×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos en medio RPMI 1640 suplementado al 10 % SFB. Esplenocitos obtenidos del bazo (proceso descrito anteriormente) se utilizaron como células efectoras adicionando 1×10^6 células por pozo para tener un radio de 50:1. Después de adicionar los tratamientos con los extractos a diferentes concentraciones, se incubaron las placas por 48 h. Como control se utilizo las células diana y células efectoras sin tratar, LPS como control positivo. A continuación se adicionó la solución MTT (5 mg/mL en PBS) incubando durante 4 h, descartando el sobrenadante y adicionando 100 μ L de DMSO durante 15 min, finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de Elisa. Los resultados se expresaron como % de actividad de NK = $(DOB - (DO \text{ muestra} - DOE)) / DOB \times 100\%$, donde DOB, densidad óptica de las células blanco, DOE, densidad óptica de las células efectoras.

Análisis estadístico

Los datos serán expresados como la media \pm de la desviación estándar (D.E). Las diferencias entre medias serán evaluadas con la prueba estadística ANOVA a un nivel de confianza del 95%. Los datos estadísticamente significativos fueron representados como ($p \leq 0.05$).

1.9. Resultados

Efecto del extracto *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* en la producción de nitritos totales por macrófagos murinos (RAW264.7).

La producción de NO por macrófagos se determinó mediante la reacción de Griess por medición de la cantidad total de nitritos obtenidos en el sobrenadante del cultivo (Green *et al.*, 1981). El NO se forma *in vitro* como resultado de la acción de la enzima NOS₂, la cual presenta una rápida oxidación a nitritos, permitiendo determinar de manera indirecta la producción de NO (Green *et al.*, 1981).

Se evaluaron las concentraciones 1 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y las concentraciones de 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM del compuesto ACM durante 48 h, en presencia y ausencia de LPS 1 µg/ml para inducir la producción de NO, en sobrenadantes de cultivo celular.

Los resultados demuestran que en ausencia de LPS, *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto ACM carecieron de efectos en la producción de NO con respecto a las células sin tratamiento (Fig.6). Por el contrario, en presencia de LPS solamente *B. fagaroides* 1 µg/mL, *P. serotinum* 50 µg/mL y el compuesto ACM 1 µM estimularon la producción de NO con mayor potencia ($p \leq 0,05$) que el control LPS 1 µg/mL (Fig.6).

Actividad pinocítica de macrófagos del extracto *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* en macrófagos RAW264.7.

Una medida para la activación de macrófagos se determinó por el aumento en la actividad de pinocitosis, por medio de la captación del rojo neutro en cultivos celulares de macrófagos murinos que se incubaron a diferentes concentraciones de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y del compuesto ACM durante 48 h, en presencia o ausencia de lipopolisacáridos, obteniendo que en ausencia de LPS, *B. fagaroides* 25 µg/mL, 50 µg/mL y el compuesto ACM 25 µM estimularon la actividad pinocítica con mayor potencia ($p \leq 0,05$) respecto al control sin tratamiento (Fig. 7). Mientras que *P. serotinum* a todas las concentraciones probadas mostró una potencia similar en la actividad de pinocitosis con respecto a LPS 1 µg/mL. En presencia de LPS, *B. fagaroides* 25 µg/mL y 50 µg/mL incrementó la actividad de pinocitosis ($p \leq 0,05$) con mayor potencia que el control LPS 1 µg/mL (Fig. 7). Sin embargo, en presencia de LPS *P. serotinum* y el compuesto ACM carecieron de efectos en la actividad de pinocitosis (Fig. 7).

Modulación de la actividad enzimática lisosomal por los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* en macrófagos RAW264.7.

La actividad celular enzimática lisosomal se determinó por la fosfatasa acida en macrófagos RAW264.7 en respuesta a diferentes concentraciones de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y del compuesto ACM, en presencia o ausencia de lipopolisacáridos (1 µg/mL). Se obtuvo que en ausencia de LPS, *B. fagaroides* 10 µg/mL y el compuesto ACM 10 µM y 25 µM mostraron una mayor potencia ($p \leq 0,05$) de la actividad enzimática lisosomal con respecto al control positivo LPS (Fig. 8). En presencia de LPS, *B. fagaroides* 25 µg/mL y 50 µg/mL, *P. serotinum* 50 µg/mL, el compuesto ACM 5 µM, 10 µM y 25 µM mostraron un incremento superior ($p \leq 0,05$) en la actividad enzimática lisosomal respecto al control LPS 1 µg/mL (Fig. 8).

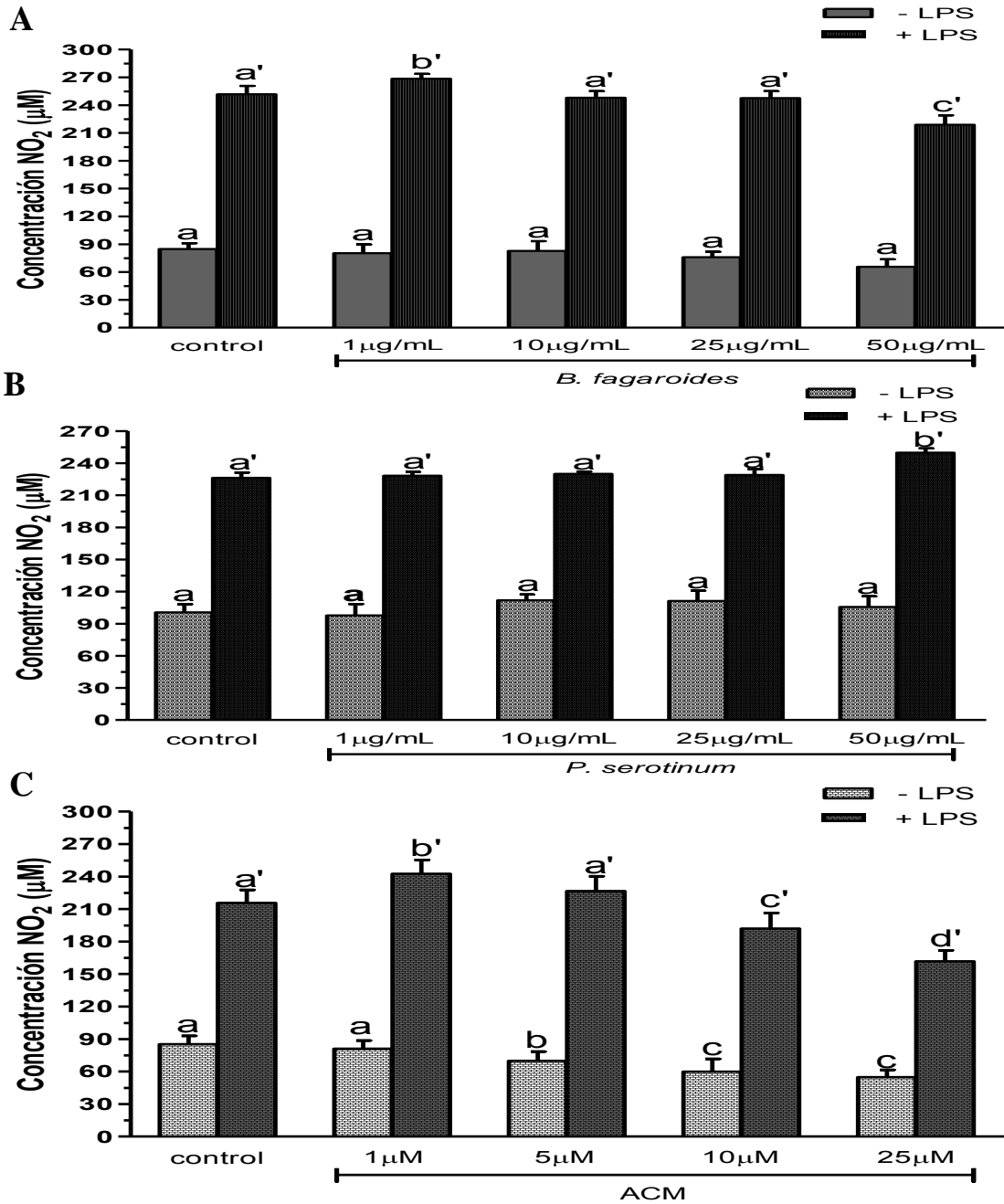


Figura 6. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales sobre la producción de nitritos totales por macrófagos murinos RAW264.7. Las células se incubaron con LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, como control positivo, concentraciones (1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) de los extractos *B. fagaroides* (A), *P. serotinum* (B) y el compuesto ACM (C) (1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM) durante 48 h, en presencia o ausencia de LPS 1 $\mu\text{g/mL}$. La acumulación de nitritos se determinó mediante el reactivo de Griess (Oviedo Chávez *et al.*, 2005). La concentración de nitritos (μM) de las muestras se obtuvo por interpolación con una curva estándar de NaNO_2 . Los valores representan la media \pm D.E de al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

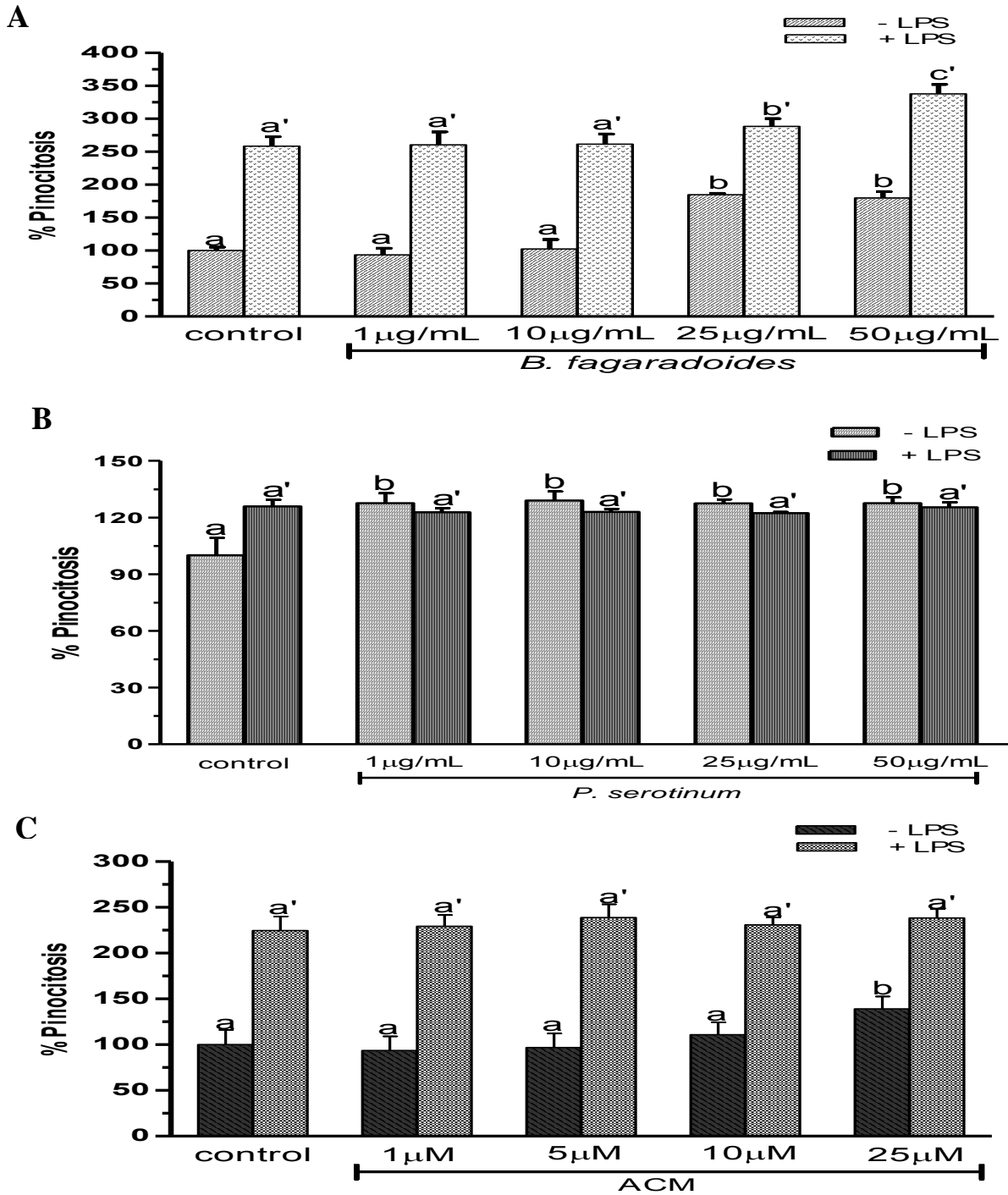


Figura 7. Actividad pinocítica de macrófagos de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales. Las células se incubaron con LPS 1 µg/mL, como control positivo, concentraciones (1 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) de los extractos *B. fagaroides* (A), *P. serotinum* (B) y el compuesto ACM (C) (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM) durante 48 h, en presencia o ausencia de LPS 1 µg/mL. La capacidad de fagocitar de los macrófagos fue determinada por la captación del rojo neutro. Los valores representan la media ± D.E de al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

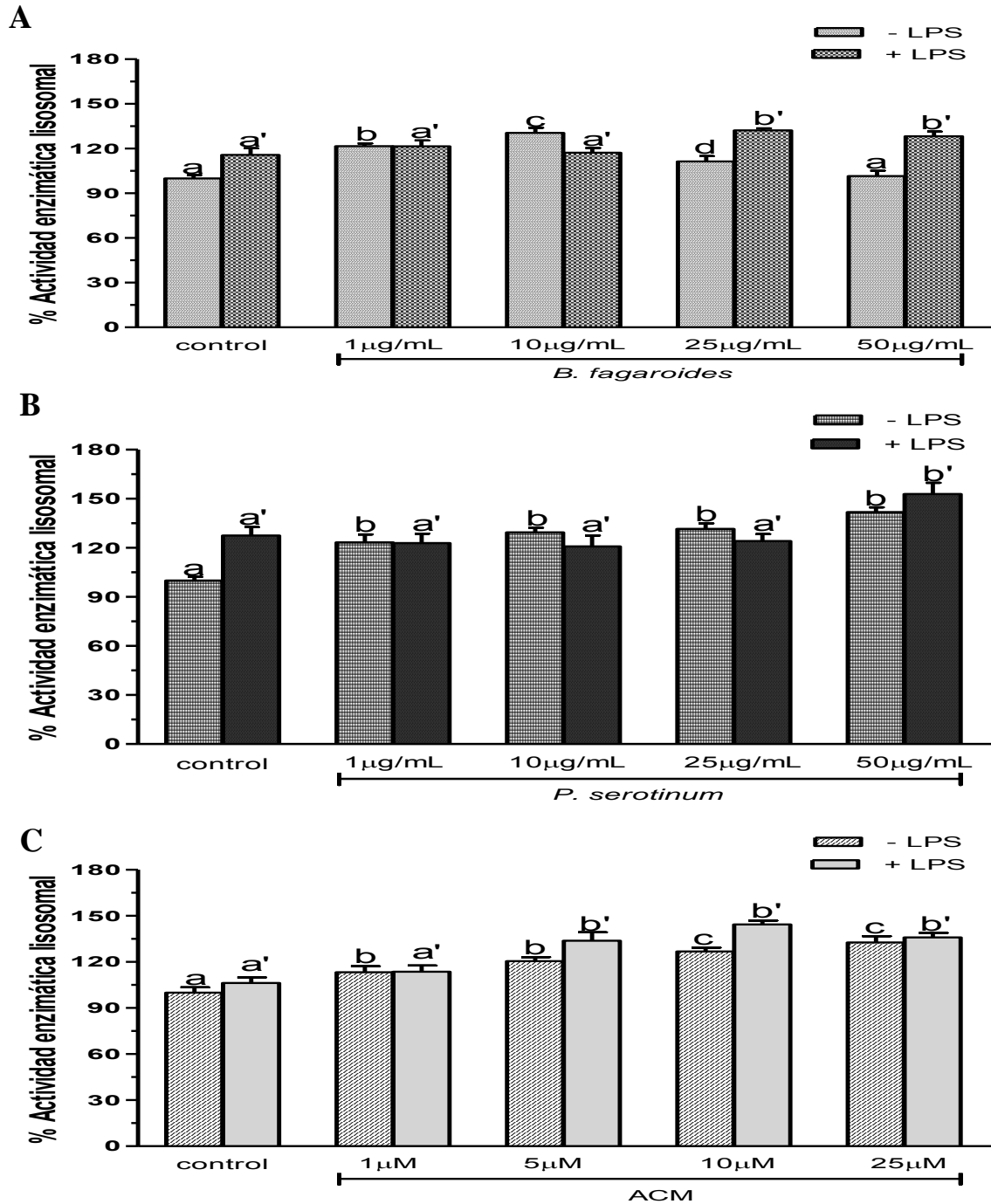


Figura 8. Actividad de la enzima lisosomal celular de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales en macrófagos RAW264.7. Las células se incubaron con LPS 1 µg/mL, como control positivo, concentraciones (1 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) de los extractos *B. fagaroides* (A), *P. serotinum* (B) y el compuesto ACM (C) (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM) durante 48 h, en presencia o ausencia de LPS 1 µg/mL. Se determinó la actividad de la enzima lisosomal celular por la fosfatasa ácida en macrófagos (Manosroi *et al.*, 2003). Los valores representan la media ± D.S de al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

Efecto del extracto *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* en la viabilidad de esplenocitos de ratón.

Se determinó por medio de la técnica MTT, si diferentes concentraciones de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto ACM tenían un efecto sobre la viabilidad celular de esplenocitos murinos en presencia y ausencia de LPS. Los resultados del ensayo MTT indicaron que los extractos y compuestos no son tóxicos y no afectan la viabilidad de las células tratadas comparadas con el control negativo, y el control positivo LPS

Los resultados demuestran que en ausencia de LPS, únicamente el compuesto ACM 10 μ M y 25 μ M incrementó de manera significativa ($p \leq 0,05$) la viabilidad de esplenocitos con una potencia superior al LPS 1 μ g/mL (Fig. 9). En presencia de LPS, *B. fagaroides* 10 μ g/mL, 25 μ g/mL y 50 μ g/mL, *P. serotinum* 50 μ g/mL, el compuesto ACM a todas las concentraciones incrementaron la viabilidad de esplenocitos con mayor potencia ($p \leq 0,05$) que el LPS 1 μ g/mL (Fig. 9). Por lo anterior, los resultados sugieren un efecto sinérgico superior ($p \leq 0,05$) en la viabilidad entre estos productos naturales con respecto al control LPS 1 μ g/mL (Fig. 9).

Efecto del extracto *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

Se determinó por medio de la técnica MTT si diferentes concentraciones de los extractos *Bursera fagaroides*, *Phoradendron serotinum* y el compuesto ACM tenían un efecto sobre la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de individuos sanos en presencia y ausencia de LPS. Los resultados del ensayo MTT indicaron que los extractos y compuestos no son tóxicos y no afectan la viabilidad de las células, observando un aumento de la viabilidad celular. Los resultados demuestran que en ausencia de LPS, únicamente *B. fagaroides* 50 μ g/mL y el compuesto ACM 25 μ M ejercieron un incremento en la viabilidad de PBMC con mayor potencia que el LPS ($p \leq 0,05$) (Fig. 10). En presencia de LPS, solo el compuesto ACM 25 μ M indujo un efecto potenciador en la viabilidad de PBMC con mayor actividad ($p \leq 0,05$) respecto al control LPS 1 μ g/mL (Fig. 10).

Efecto del extracto *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* sobre la actividad de células Natural Killer.

Mediante la acción citolítica de las Natural Killer se pueden destruir células infectadas y tumorales sin necesidad de una sensibilización antigénica previa, así como puede ser estimulada y aumentada su función biológica. Se utilizaron células K562 como células diana y como células efectoras esplenocitos, obtenidos del bazo de ratones CD-1, de esta manera se determinó el efecto de las concentraciones 1 μ g, 10 μ g, 25 μ g, 50 μ g de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y las concentraciones de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M del compuesto

ACM durante 48 h, sobre la actividad citotóxica de las NK contra células K562. Los resultados indicaron que *B. fagaroides* probado a 25 µg/mL y 50 µg/mL, *P. serotinum* 50 µg/mL y el compuesto ACM administrado a 25 µM ejercieron una actividad de NK con mayor potencia ($p \leq 0,05$) que el control positivo LPS (Fig. 11).

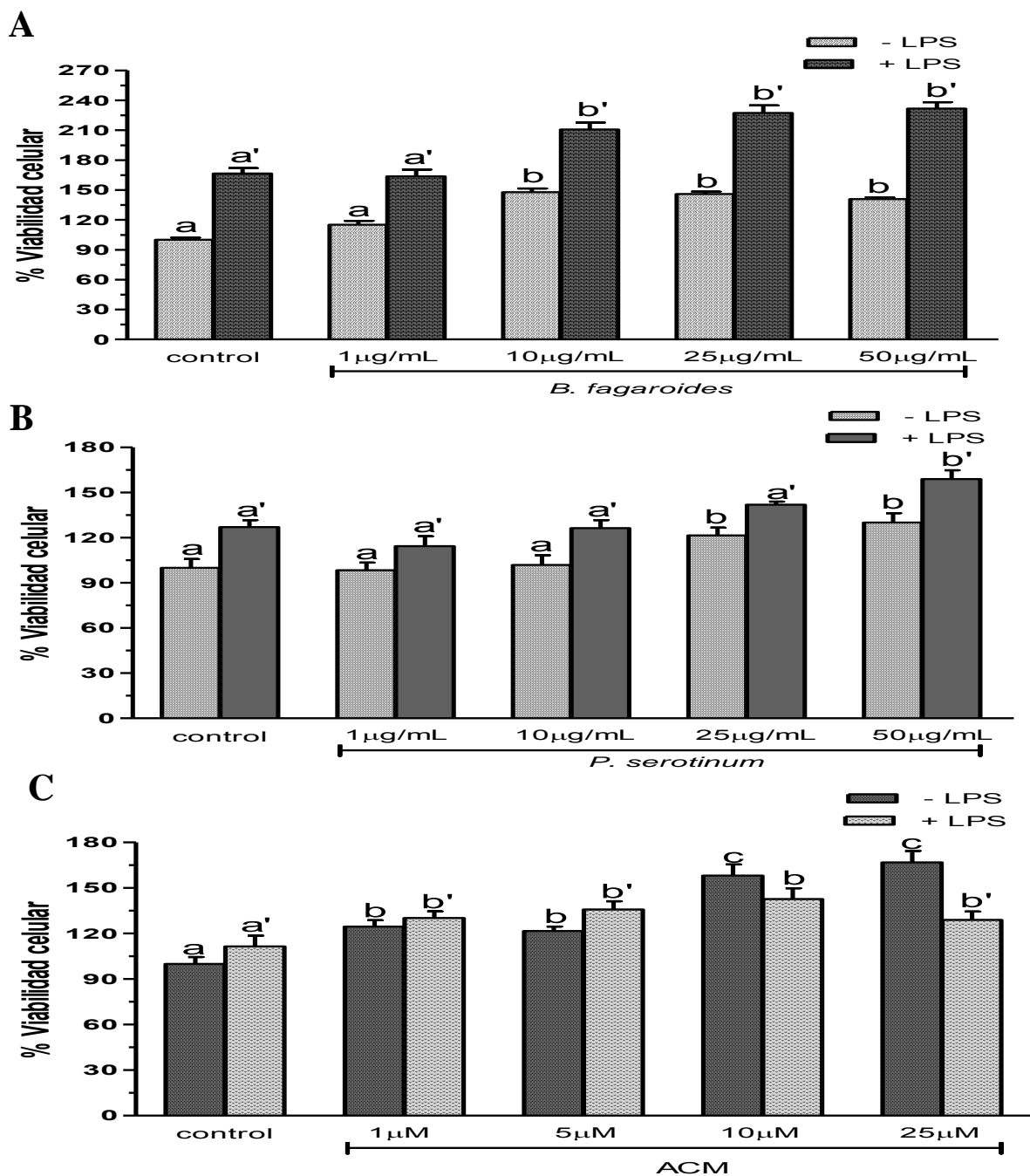


Figura 9. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales en la viabilidad de esplenocitos de ratón. Esplenocitos del bazo de ratones CD-1 (Weifa *et al.*, 2007.) se incubaron con LPS 1 µg/mL, como control positivo, concentraciones (1 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) de los extractos *B. fagaroides* (A), *P. serotinum* (B) y el compuesto ACM (C) (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM) durante 48 h, en presencia o ausencia de LPS 1 µg/mL. La proliferación celular se determinó por el método MTT. Los valores representan la media ± D.E de al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

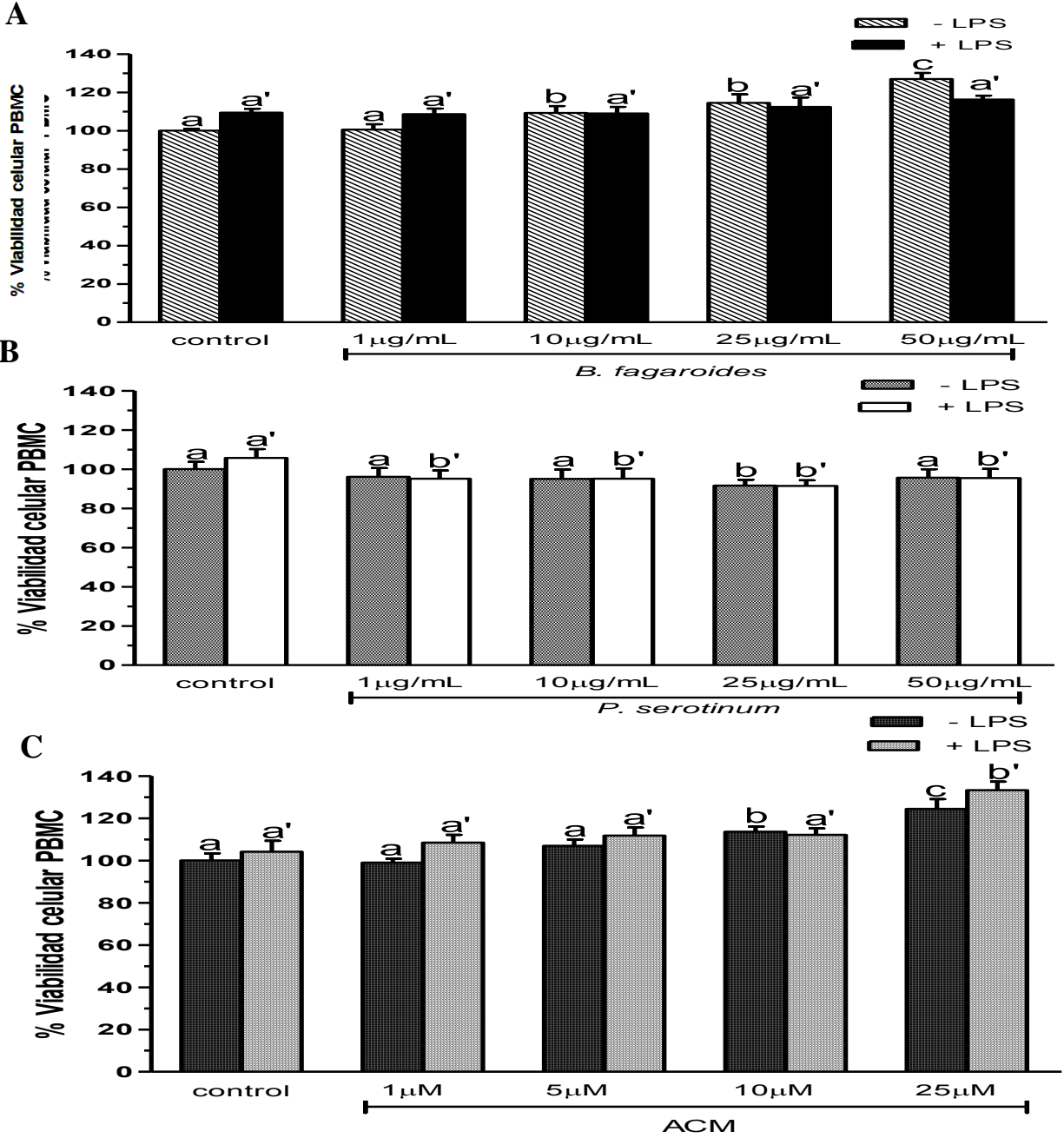


Figura 10. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBMC) humana de individuos sanos mediante la técnica Ficoll-Hypaque. Los linfocitos se incubaron con LPS 1 µg/mL, como control positivo, concentraciones (1 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) de los extractos *B. fagaroides* (A), *P. serotinum* (B) y el compuesto ACM (C) (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM) durante 48 h, en presencia o ausencia de LPS 1 µg/mL. La proliferación celular se determinó por el método MTT. Los valores representan la media ± D.E de al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

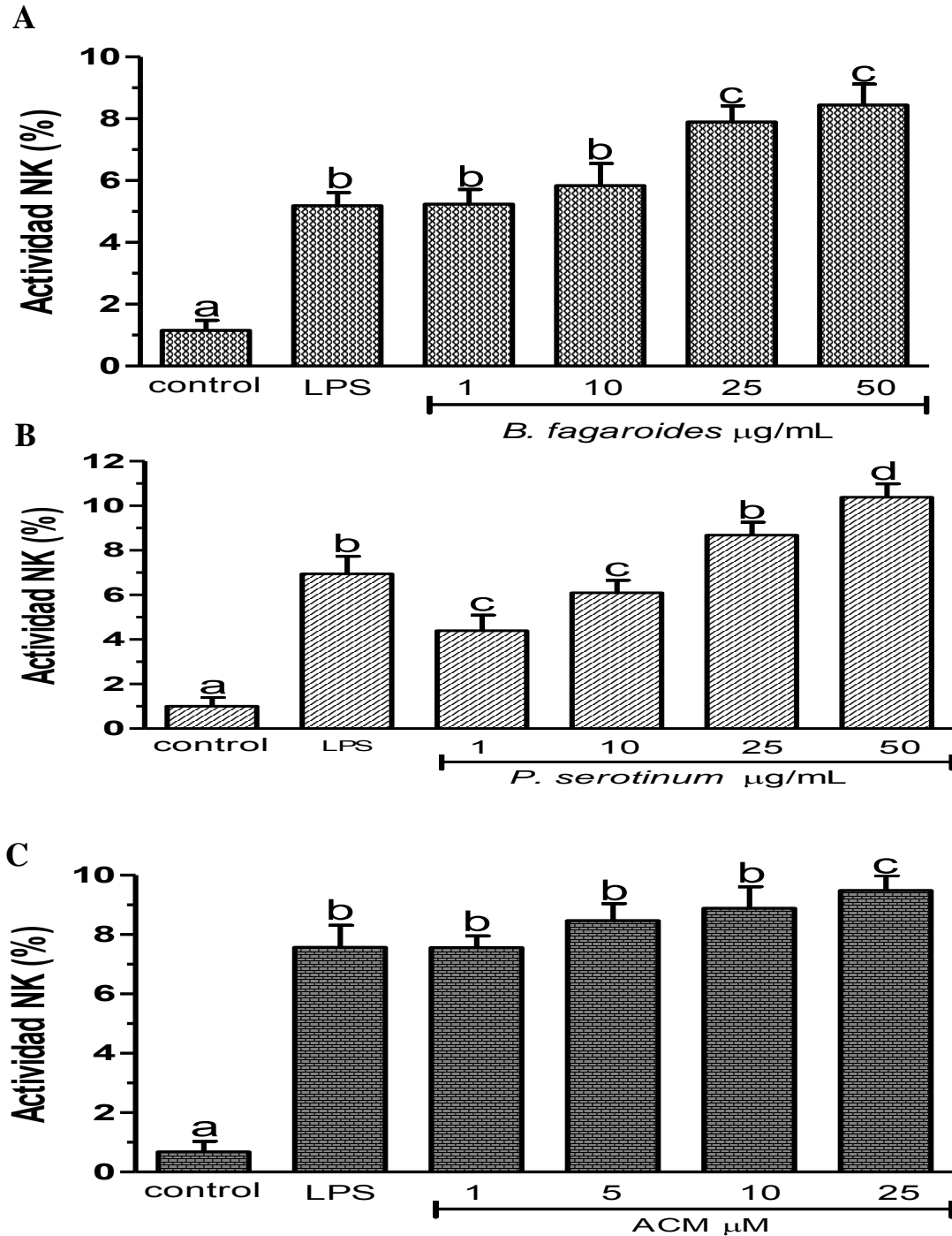


Figura 11. Efecto de los extractos y compuesto de plantas Mexicanas medicinales sobre la actividad de células natural killer. Se utilizaron células K562 como células diana y como células efectoras esplenocitos, obtenidos del bazo de ratones CD-1. Los cultivos celulares se incubaron con LPS 1 µg/mL, como control positivo, concentraciones (1 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) de los extractos *B. fagaroides* (A), *P. serotinum* (B) y el compuesto ACM (C) (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM) durante 48 h. La actividad de las células natural killer se calculó como se describió por Hai-Shun *et al.*, (2009) con la prueba MTT. Los valores representan la media ± D.E de al menos tres experimentos independientes realizados por hexaplicado. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos.

1.10. Discusión

Las especies *Bursera fagaroides* (H.B.K.) Engl. (Burseraceae), *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. (Asteraceae), utilizadas en la medicina tradicional Mexicana tienen diversos efectos farmacológicos (Puebla-Pérez *et al.*, 1998; Alarcon *et al.*, 2010; Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011), algunos de los cuales sugieren efectos inmunoestimuladores.

Por lo que se evaluaron los efectos de *Phoradendron serotinum*, *Bursera fagaroides* y el acetato de maturin en la función de macrófagos murinos a través de la actividad fagocítica y liberación de NO, función biológica de las células NK, viabilidad de esplenocitos murinos y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

Activación de macrófagos murinos (RAW264.7) por los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum*

Los macrófagos son células efectoras de la respuesta inmune innata y están involucradas en el inicio y la regulación de las respuestas adaptativas, en la defensa antimicrobial y tumoricida. Los macrófagos son estimulados al entrar en contacto con patógenos o con partículas (LPS), e incluso se ha demostrado que componentes de extractos y compuestos aislados de plantas tienen esta capacidad (Choi, *et al.*, 2001).

En el presente estudio se demostró que el extracto *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM modulan la activación de macrófagos debido a la liberación de NO, la capacidad de pinocitar y fagocitar que se determinó por la actividad enzimática lisosomal.

El extracto *B. fagaroides* mostró un efecto sinérgico con LPS sobre la liberación de NO, incrementó y potenció en presencia de LPS la capacidad de pinocitar así como la actividad enzimática lisosomal determinada por la fosfatasa ácida, por lo cual sugiere la digestión enzimática intracelular. Sin embargo, parece que a mayores concentraciones del extracto de *B. fagaroides* se observó un efecto inhibitorio sobre la producción de NO, esto podría ser debido a que se produjo una saturación en la producción de NO, este efecto puede deberse a que el ON que se libera en mayores cantidades es tóxico para la célula misma en el ensayo *in vitro*.

El extracto *P. serotinum* mostró un efecto potenciador en la liberación de NO en presencia de LPS, aumentó la actividad pinocítica y la actividad enzimática lisosomal con potencia similar a la de LPS. Lo cual sugiere que el extracto activa los macrófagos y que presenta un efecto sinérgico en la actividad enzimática lisosomal.

Por otra parte, el compuesto ACM incrementó la producción de NO en presencia de LPS pero únicamente a las concentraciones más bajas probadas. Lo que sugiere probablemente, este compuesto tenga afinidad con lugares de unión que están involucrados en la activación de la liberación de óxido nítrico y dependiendo de su concentración tendrá un efecto sinérgico o antagónico. Así mismo, ACM ejerció actividad pinocítica de macrófagos, una activación y efecto sinérgico con LPS en la actividad enzimática lisosomal.

La actividad inmunomoduladora ejercida en macrófagos por *B. fagaroides*, *P. serotinum* y ACM, podría estar relacionada al uso de *B. fagaroides* en la medicina tradicional para el tratamiento de gingivitis, la utilización de *P. serotinum* como antiviral, anticancerígeno, infecciones del tracto urinario (Jacobó-Salcedo *et al.*, 2011) y los efectos antiinflamatorios de *Psacalium peltatum* (Alarcon *et al.*, 2010).

Efecto de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* en la viabilidad de esplenocitos y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

Dentro de los mecanismos celulares de la inmunidad adaptativa también se encuentran los linfocitos, células que responden ante un reto antigénico, una vez que han sido activados mediante la unión específica de receptores en la superficie de su membrana. Incluso los linfocitos pueden ser activados de manera inespecífica por componentes de origen bacteriano tales como el LPS (Abbas *et al.*, 2004; Goldsby *et al.*, 2004).

Un modelo para determinar la actividad inmunomoduladora es probar la acción del extracto en presencia de un mitógeno (LPS). La técnica de MTT permitió medir de manera indirecta el efecto de los extractos y compuesto en la proliferación de esplenocitos murinos y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a través del aumento en la viabilidad celular, lo que evidenció que los extractos y compuesto no tienen efectos negativos sobre la viabilidad celular. Al aumento y potenciación junto LPS, sobre la viabilidad celular, se discutió como proliferación.

En este estudio se demostró que el extracto *B. fagaroides* incrementó con la misma potencia la proliferación de esplenocitos murinos con respecto a LPS, también el extracto *P. serotinum* tuvo una potencia similar a la de LPS. Por otro lado, el compuesto ACM tuvo una mayor potencia que el LPS lo que nos indica que los compuestos presentes en los extractos y el compuesto ACM tienen la capacidad de activar a los esplenocitos murinos para su proliferación. Por otro lado, se observó un efecto de sinergismo con el LPS de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM en la proliferación de esplenocitos murinos.

Respecto al efecto de los extractos y compuesto sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), *B. fagaroides* y el compuesto ACM activaron la proliferación de PBMC y solo el compuesto ACM presentó un efecto sinérgico con LPS. Sin embargo *P. serotinum* no parece tener actividad en la proliferación de PBMC.

Con lo que se demuestra que el extracto *B. fagaroides* y el compuesto ACM son capaces de estimular a los linfocitos en ausencia de sus correspondientes antígenos. Lo cual sugiere que estos productos naturales podrían actuar como un mitógeno.

Por otro lado, datos obtenidos del extracto *P. serotinum* indicaron que el extracto puede tener compuestos que en mayor o menor concentración ejercen una actividad sinérgica en la proliferación de esplenocitos y antagónica en PBMC (Jacobó-Salcedo, *et al.*, 2011). También se puede descartar un efecto tóxico en

estas células ya que en ensayos anteriores utilizando PHA (fitohemaglutinina) han demostrado en PBMC un efecto de proliferación en estas células (Jacobo-Salcedo, *et al.*, 2011). Sin embargo, en el estudio anterior se usaron extractos acuosos y en el presente estudio se usaron extractos etanólicos.

Efecto de los extractos *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM obtenido de *P. peltatum* en la actividad de las células natural killer

Las células NK son uno de los componentes celulares que participan en la defensa contra infecciones virales y el crecimiento tumoral con capacidad de destruirlas mediante su acción citolítica. Las NK ejercen su actividad sin necesidad de una sensibilización previa.

Bursera fagaroides, *Phoradendron serotinum* y el compuesto ACM incrementaron la actividad de las NK. Se sabe que las células natural killer tienen actividad antitumoral y esto se podría relacionar con lo ya informado por Puebla-Pérez *et al.*, (1998), en donde el extracto hidroalcohólico de la corteza de *B. fagaroides* presentó la capacidad de disminuir el crecimiento tumoral del linfoma murino L5178Y en modelos de ratones BALB/c., correlacionado con el efecto tóxicos en células que presentó *P. serotinum* (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011).

1.11. Discusión General *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM

Se han realizado algunas investigaciones sobre las especies Mexicanas *B. fagaroides*, *P. serotinum* y *P. peltatum* utilizadas empíricamente por sus propiedades medicinales, sin embargo no existen reportes científicos del efecto de estas plantas sobre el sistema inmunológico. Los resultados obtenidos de *B. fagaroides* evidencian su potencial para modular componentes celulares que participan en la respuesta inmunológica, los cuales se corroboran con otras especies de la familia Burseraceae, como los extractos de la especie *Bursera simaruba*, nativa de regiones tropicales de América con un efecto antiinflamatorio, similar al fármaco fenilbutazona (80 mg/kg) y la indometacina (3 mg/kg) en modelos *in vivo* (Abad *et al.*, 1996). Carretero *et al.*, (2008) reporta que fracciones obtenidas de *B. simaruba*, tenían una mayor actividad antiinflamatoria que fenilbutazona (80 mg/kg). Los extractos de la corteza de *B. simaruba* inhibieron, el edema de la oreja de ratones inducido por aceite de crotón, después de la aplicación tópica (Sosa *et al.*, 2002). Por lo tanto la especie *B. fagaroides* se propone como una fuente de componentes inmunomodulares, es probable que sus efectos biológicos y farmacológicos sean debido a que las especies pertenecientes a la familia Burseraceae son resinosas.

La especie Mexicana *P. serotinum* demostró poseer componentes que tienen una actividad inmunomoduladora y es probable que su actividad antitumoral se deba también a la inducción de citocinas y a los efectos inmunoadyuvantes (Hostanska *et al.*, 1995, Alonso-Castro *et al.*, 2012). Los resultados se correlacionan con estudios anteriores realizados con otras especies de muérdago que han revelado tener propiedades citotóxicas e inmunomoduladoras. Es bien conocido que el extracto del muérdago europeo tiene actividad citotóxica contra células cancerosas y capacidad de estimular al sistema inmune (Khwaja y Dias, 1986). En la medicina popular de Argentina, *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) por su similitud externa con el muérdago europeo (*Viscum album* L.) se ha utilizado para disminuir la presión arterial alta (Varela *et al.*, 2004). Otra especie hemiparásita de Argentina, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) conocido como “muérdago criollo” demostró que ejerce actividad inmunomoduladora y efectos antitumorales *in vitro* (Fernández *et al.*, 1998). Investigaciones de ácidos triterpenicos de *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mostro actividad vaso-relajante, debido a ello se sugiere la participación de que la COX y eNOS en la actividad vaso relajante (Rios *et al.*, 2012).

Dado los resultados obtenidos y conociendo que los sesquiterpenos tienen actividades antiinflamatorias, hipoglucémica (Alarcon *et al.* 1997; Inman, *et al.*, 1999), antimicrobianas (Jiménez, *et al.*, 1992), antitumorales, antioxidantes (Krasovskaya, *et al.*, 1989), y la posible similitud del compuesto ACM con sesquiterpenos como el cacalol (antiinflamatoria, antitumoral) y cacalona (antiinflamatoria) presentes en *P. decompositum*, especie también utilizada en la medicina tradicional Mexicana y perteneciente al complejo “matarrique”. Se

evidencia la capacidad del compuesto ACM de modular componentes del sistema inmune.

En resumen los resultados muestran que *B. fagaroides*, *P. serotinum* y el compuesto ACM poseen una función activadora de los macrófagos revelada por su actividad pinocítica y fagocítica, además de modular la producción de NO y mejorar la actividad de los linfocitos sobre su proliferación demostrado por el aumento de viabilidad celular. Esto sugiere su habilidad para mejorar la respuesta inmune y la cooperación de otros mecanismos efectores como el de las células natural killer y los macrófagos en contra de células tumorales. Lo que supone que existen compuestos bioactivos en los extractos *B. fagaroides* y *P. serotinum* que tienen la capacidad de modular el sistema inmune a los cuales se debe su actividad medicinal. Sin embargo, aún es de interés conocer los principios activos presentes en los extractos vegetales y establecer los mecanismos moleculares a través de los cuales actúa el ACM y ejerce sus efectos inmunoestimuladores.

1.12. Conclusiones

Este estudio mostró que el extracto de *B. fagaroides* presenta un efecto sinérgico con LPS sobre la liberación de NO, la capacidad de pinocitar, así como la actividad enzimática lisosomal en macrófagos murinos (RAW264.7). El extracto de *B. fagaroides* incrementó la proliferación de esplenocitos murinos con la misma potencia que el LPS, activo la proliferación de PBMC e incremento la actividad de las NK.

El extracto de *P. serotinum* mostró un efecto potenciador en la liberación de NO en presencia de LPS, aumentó la actividad pinocítica y la actividad enzimática lisosomal con potencia similar a la de LPS en macrófagos murinos (RAW264.7). El extracto de *P. serotinum* tuvo una potencia similar a la de LPS en la proliferación de esplenocitos murinos e incremento la actividad de las NK. Sin embargo, *P. serotinum* no parece tener actividad en la proliferación de PBMC.

El compuesto ACM incrementó la producción de NO en presencia de LPS pero únicamente a las concentraciones más bajas probadas. ACM ejerció actividad pinocítica en macrófagos murinos (RAW264.7), una activación y efecto sinérgico con LPS en la actividad enzimática lisosomal. El ACM incrementó con mayor potencia que el LPS la proliferación de esplenocitos murinos. En PBMC, el ACM activó la proliferación de PBMC y tuvo un efecto sinérgico con LPS. Incremento la actividad de las NK.

1.13. ANEXOS

El trabajo realizado en licenciatura y esta tesis han contribuido a la publicación de los siguientes artículos:

1. Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sanchez, E., Dominguez, F., Arana-Argáez, V., **Juárez-Vázquez, MdC**, Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carrancá, A., (2012), Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, **14**:888-894.
2. Alonso-Castro, A.J., **Juárez-Vázquez, MdC**, González-Sánchez, I., Dominguez, F., Estrada-Castillón, E., López-Toledo, G., Chávez, M., Cerbón, M.A., García-Carrancá, A., (2012), The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines, *Journal of Ethnopharmacology*, **142**:857-864.
3. Jacobo-Salcedo, MdR, **Juárez-Vázquez, MdC**, Gonzalez-Espindola, L. A., Maciel-Torres, S.P., García-Carrancá, A., Alonso-Castro A.J., en prensa. Biological effects of aqueous extract from turkey vulture *Cathartes aura* (Cathartidae) meat, *Journal of Ethnopharmacology*, DOI [/dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.014](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.014)
- 4.- **Juárez-Vázquez, MdC**, Alonso-Castro, A.J., Rojano-Vilchis, N., Jiménez-Estrada, M., García-Carrancá, A., en prensa. Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects *in vitro* and *in vivo*, *Toxicology in Vitro*, DOI [/dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.021](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.021)



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae)

Angel Josabad Alonso-Castro^{a,b,*}, Elizabeth Ortiz-Sánchez^b, Fabiola Domínguez^c, Victor Arana-Argáez^d, María del Carmen Juárez-Vázquez^b, Marco Chávez^{e,f}, Candy Carranza-Álvarez^g, Octavio Gaspar-Ramírez^h, Guillermo Espinosa-Reyes^h, Gabriela López-Toledo^b, Rolffy Ortiz-Andrade^d, Alejandro García-Carranca^{b,i,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

^b Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, México, D.F., Mexico

^c Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS, Metepec, Puebla, Mexico

^d Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, Mexico

^e Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, D.F., Mexico

^f Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas, Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, D.F., Mexico

^g Unidad Académica Multidisciplinaria de la Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ciudad Valles, San Luis Potosí, Mexico

^h Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

ⁱ Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2011

Received in revised form 4 February 2012

Accepted 17 March 2012

Available online 28 March 2012

Keywords:

Justicia spicigera

Cancer

Antitumor

Apoptosis

Toxicity

Immunomodulatory

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Medicinal plants are an important source of antitumor compounds. This study evaluated the acute toxicity *in vitro* and *in vivo*, as well as the cytotoxic, antitumor and immunomodulatory effects of ethanolic extracts of *Justicia spicigera* leaves (JSE).

Materials and methods: The *in vitro* and *in vivo* toxicity of JSE was evaluated with comet assay in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and acute toxicity in mice, according to the Lorke procedure, respectively. The apoptotic effect of JSE on human cancer cells and human noncancerous cells was evaluated using flow cytometry with annexin-Alexa 488/propidium iodide. Also, different doses of JSE were injected intraperitoneally daily into athymic mice bearing tumors of HeLa cells during 18 days. The growth and weight of tumors were measured. The *in vitro* immunomodulatory effects of JSE were evaluated estimating the effects of JSE on the phagocytosis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, NO production and H₂O₂ release in macrophages, as well as the proliferation of splenocytes and NK activity.

Results: The comet assay showed that only JSE tested at 200 and 1000 µg/ml induced a significantly DNA damage in PBMC, compared to untreated cells, whereas the LD₅₀ was >5000 mg/kg by intraperitoneal route (*i.p.*) and by oral route. JSE showed pro-apoptotic (Annexin/PI) effects by 35% against HeLa cells, but lack toxic effects against human normal cells.

JSE administrated at 10, 50 and 100 mg/kg *i.p.* inhibited the tumor growth by 28%, 41% and 53%, respectively, in mice bearing HeLa tumor. JSE stimulated, in a concentration dependent manner, the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, the NO production and H₂O₂ release by human differentiated macrophages. In addition, JSE stimulated the proliferation of murine splenocytes and induced the NK cell activity.

Conclusion: *Justicia spicigera* shows low toxic effects *in vitro* and *in vivo*, exerts apoptotic effects on HeLa cells, has antitumor effects in mice bearing HeLa tumor and induces immunomodulatory activities *in vitro*.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: CDDP, cisplatin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; FBS, fetal bovine serum; JSE, *Justicia spicigera* ethanolic extract; KM, kaempferitrin; LPS, lipopolysaccharides; MTT, thiazolyl blue tetrazolium bromide; NK, natural killer cells; NO, nitric oxide; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

* Corresponding authors at: Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, D.F., Mexico. Tel.: +52 55 56280433; fax: +52 55 54854371.

E-mail addresses: angeljosabad@hotmail.com (A.J. Alonso-Castro), carranca@biomedicas.unam.mx (A. García-Carranca).

1. Introduction

The efficacy of antitumor therapies would improve if it benefits immune response against tumor development (Mitchell, 2003). However, many of antitumoral drugs are known to produce immunosuppression. Therefore there is a worldwide need to investigate antitumor agents with low toxic effects and with effects that improve host defense mechanisms against tumor growth.

Plants have represented an important source for anti-cancer drugs, and México possesses a great diversity of flora with potential for searching new compounds for cancer treatment (Alonso-Castro et al., 2011).

Justicia spicigera Schlttdl (Acanthaceae), native from México and extending into South America, commonly known as muicle or mohuite, is an evergreen shrub with tubular orange flowers. In Mexican traditional medicine, *Justicia spicigera* is used as immunostimulatory (Herrera-Arellano et al., 2009) and for the empirical treatment of cervical cancer (Márquez et al., 1999). However, the toxic and immunomodulatory effects of this plant are unknown. Thus, it is important to evaluate the toxicology of natural products to support their safety on further clinic studies.

Previous reports indicated that *Justicia spicigera* exerted toxic effects against the human cancer cells TF-1, CaLo, InBI, T47D and HeLa (Caceres-Cortes et al., 2001; Vega-Avila et al., 2009). Recently, we showed that ethanolic extracts of *Justicia spicigera* leaves had high cytotoxic effects against HeLa cells ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/ml}$), and stimulated the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells in a concentration dependent manner, and tested at $100 \mu\text{g/ml}$ showed a similar potency as compared to phytohemagglutinin $1 \mu\text{g/ml}$ (Jacobo-Salcedo et al., 2011).

Previous phytochemical determination of ethanol extracts of *Justicia spicigera* leaves revealed the presence of kaempferol-3,7-bisrhamnoside (kaempferitrin) (Euler and Alam, 1982; Domínguez et al., 1990).

This work demonstrates, for first time, that an ethanolic extract of *Justicia spicigera* (JSE) exerts low toxic effects *in vitro* and *in vivo*, induces antitumor and immunomodulatory effects.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), RPMI medium and fetal bovine serum (FBS) were from GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA). Kaempferitrin (KM) obtained from ChromaDex (Laguna Hills, CA, USA) was 98% purity according to the manufacturer. Cisplatin (CDDP) was from Accord Farma (Distrito Federal, México).

2.2. Cells and culture conditions

Human cervical carcinoma cells (HeLa) and the human immortalized keratinocytes (HaCaT), used as normal cells, obtained from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained in DMEM supplemented with 7% FBS and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 pg/ml streptomycin). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), obtained from healthy volunteers as described (Yañez et al., 2004), were used as normal cells in toxic assays and as effector cells in immunomodulatory assays. PBMC were seeded in RPMI medium supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 pg/ml streptomycin). All the procedures carried out in this study were approved by the Research Ethic Committee from Instituto Nacional de Cancerología (Distrito Federal, México). All cell cultures were grown at 37°C and 5% CO_2 .

2.3. Animals

In this study, C57BL/6 and CD-1 mice were obtained from Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, whereas athymic mice nu/nu were from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán, México. The *in vivo* experiments were performed following the NIH Guide for Treatment and Care for Laboratory Animals and by the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). The mice, having free access to food and water, were housed in cages with filtered air in a climate and light controlled room with a 12 h light/dark cycle.

2.4. Preparation of *Justicia spicigera* extract and quantification of kaempferitrin

Samples of *Justicia spicigera* collected in Ciudad Valles, San, Luis Potosí, México on August 2010 were identified by a specialist (J. Garcia-Perez, UASLP) and preserved at the herbarium Isidro Palacios of Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (SLPM) for future reference with voucher number 46450.

Powdered dried leaves of *Justicia spicigera* (10 g) were extracted with ethanol using a Soxtherm apparatus (Soxtherm automatic, Gerhardt, Germany) for 2 h. The extract was filtered and concentrated under reduced pressure to dryness and the residue was dissolved in DMSO and protected from light. The detection and quantification of KM in JSE were performed by reversed-phase HPLC method in a waters 2795 (Waters Corp., Milford, MA, USA) instrument equipped with autosampler and a 996 photodiode array detector, Kromasil column C-18 150 mm \times 4.6 mm (Metachem

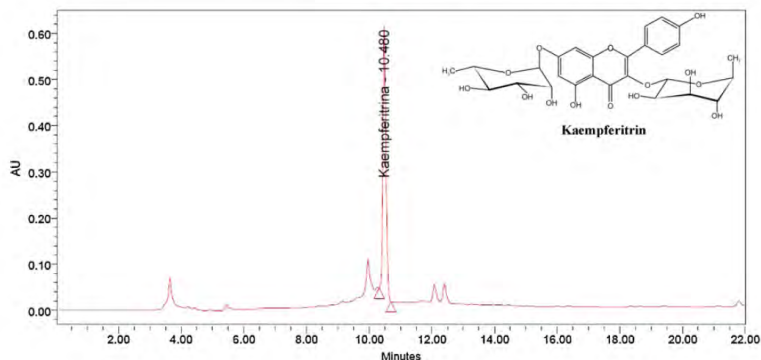


Fig. 1. HPLC elution pattern of kaempferitrin from *Justicia spicigera* ethanolic extract.

Technologies Inc.) with injection volume 5 μ l, flow 0.4 ml/min. The mobile phase was acetic acid (HPLC grade Merck Dormstadt, Germany) 2% in water and the stationary phase was acetonitrile (HPLC grade Merck, Dormstadt, Germany). Retention times and UV spectra of KM were compared to those of high-purity commercial standards. The calibration plot was obtained in the range of concentrations 124–496 μ g/ml. The concentration of kaempferitrin in the extracts was calculated from calibration plot. Maximum of absorbance was 260 nm with retention time of 10.54 min.

2.5. Comet assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were treated in the presence of vehicle (DMSO 0.1%), with different concentrations of JSE (10, 50, 200 and 1000 μ g/ml) or sodium arsenite NaAsO₂ 65 ng/ml (positive control) during 5 h. DNA damage in PBMC was assessed by comet assay (Singh et al., 1988). The extent of DNA migration was analyzed in 100 cells (50 randomly selected cell nucleoids by duplicate) using an epifluorescent microscope (Nikon LABOPHOT-X2), whereas the olive tail moment [(tail mean – head mean) \times tail %DNA/100] was determined using Komet 4.0 Image Analysis and Data Capture Software (Komet, versión 4; Kinetic Imaging Ltd., Merseyside, UK). The comet image magnification was 200 \times . DNA migration was measured by image analysis (Image Plus-Pro Plus Version 3.0) as the length of the comet image (total image length). The total image length included the tail and the nucleus of the comet and was reported in μ m \pm SD.

2.6. Acute toxicity test

Six weeks old female CD-1 mice, weighing 25–30 g, were used. The acute toxicity of the JSE, administered intraperitoneal or intragastric in mice, was estimated according to Lorke method (1983). Mice were observed daily during 14 days for mortality, behavioral changes and other toxic signs.

2.7. Apoptosis assay

HeLa or HaCaT cells were seeded in 60 mm culture plates at 8×10^4 cells/plate. After 24 h, control vehicle (DMSO 0.01%), IC₅₀ of JSE or CDDP was added to cells during 48 h. Then, cells were stained with annexin-Alexa 488 and propidium iodide (PI) contained in the Vybrant Apoptosis Assay Kit no. 2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The apoptosis assay was carried as described by Ortiz-Sánchez et al. (2009) using FACScan analytic flow cytometer (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). The level of apoptosis of cells treated with JSE or CDDP is calculated by the subtraction of the total percentage of apoptosis of untreated cells from the percentage of apoptosis of cells treated with JSE or CDDP. The software Weasel cytometry analysis software v.2.6.1 (Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia) was used for data analysis.

2.8. Antitumor assay

The antitumor assay was carried out as described by Alonso-Castro et al. (2012). Six weeks old athymic nu/nu mice, weighing 20–23 g, were used. Mice were injected subcutaneously in the back with HeLa cells (1.5×10^6). Nine days after tumor implantation, groups of five mice received doses of JSE from 10 to 100 mg/kg dissolved in 0.1 ml of 0.9% saline solution, injected intraperitoneally, daily over 15 days. The control animals received 0.1 ml of the vehicle solution. Tumors were measured with a Vernier caliper, and their size in mm³ was calculated as follows (Looney et al., 1971):

$$\text{Tumor volume} = \frac{\text{length} \times \text{width} \times \text{height}}{2}$$

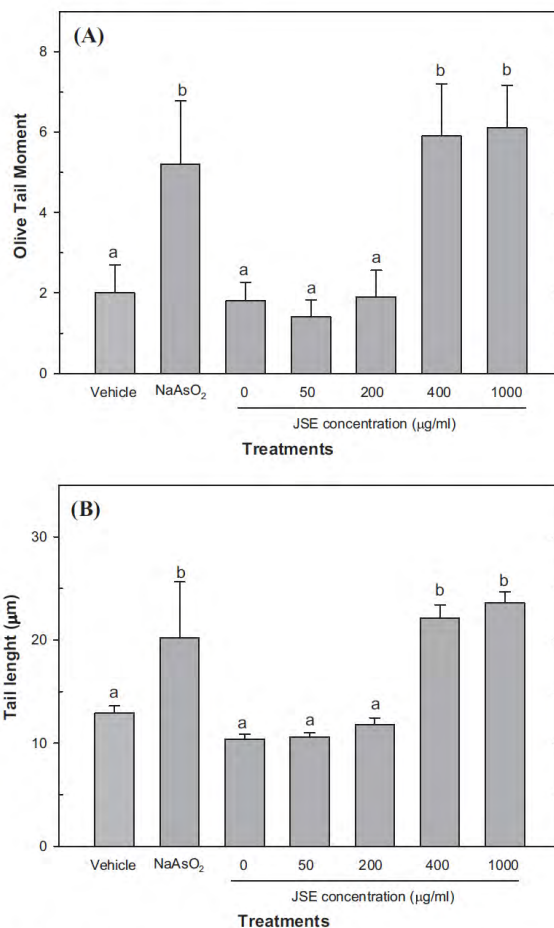


Fig. 2. JSE exerts low toxic effects *in vitro*. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy volunteers, and treated in the presence of vehicle (DMSO 0.1%), different concentrations (10, 50, 200 and 1000 μ g/ml) of JSE or sodium arsenite NaAsO₂ 65 ng/ml (positive control) during 5 h. DNA damage in PBMC was assessed by comet assay, represented as olive tail moment (A) and tail length (B), taken as the mean value of the total image length in 100 cells per treatment. Results represent the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments in quadruplicate. Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey tests.

2.9. Phagocytosis assay

The phagocytosis assay was carried out as described previously (Esteban et al., 1998).

PBMC were seeded in 24-well plates at 5×10^5 cells/well and cultured overnight in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 50 ng/ml to permit the differentiation into macrophages. Then, non adherent cells were removed and various concentrations of JSE (1–200 μ g/ml) or LPS 1 μ g/ml was added. After 24 h, cells were co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts (5×10^6 yeast/well) and labeled with 100 μ g/ml of propidium iodide. After 90 min, non-ingested labeling yeasts were removed and the amount of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosed by macrophages was determinate measuring the cellular fluorescent intensity using a Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter) flow cytometer.

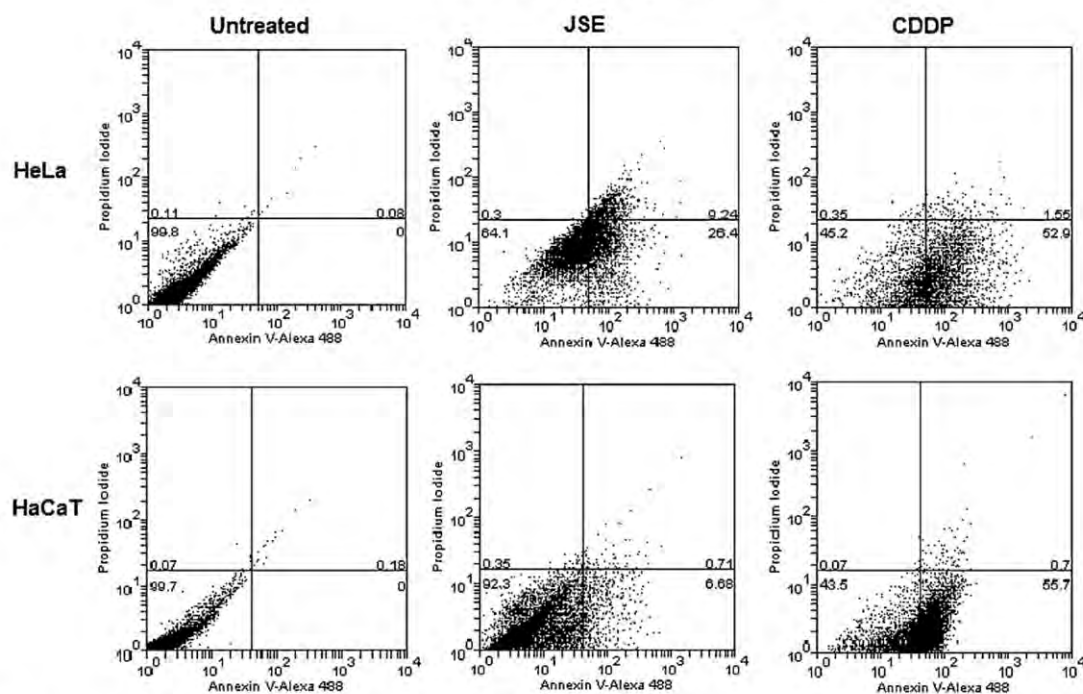


Fig. 3. JSE induces apoptosis in HeLa cells. HeLa or HaCaT cells were treated with vehicle (DMSO 0.01%), JSE 17 $\mu\text{g/ml}$ or CDDP 4 $\mu\text{g/ml}$ during 48 h. The apoptosis assay was carried out as described in Section 2, recording 10,000 events. The percentage of cells in each quadrant is localized in the corner. The cells in the right quadrants (Annexin V⁺/PI⁻ and Annexin V⁺/PI⁺) are considered as apoptotic cells. Data are representative of four independent experiments in duplicate.

2.10. Nitric oxide (NO) production

Nitric oxide (NO) production was determined based on Griess reaction (Green et al., 1981). Human macrophages, differentiated as described above, were co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts (5×10^6 yeast/well) and treated with various concentrations of JSE (1–200 $\mu\text{g/ml}$) or LPS 1 $\mu\text{g/ml}$. After 24 h of incubation, the plate was centrifuged for 10 min at $300 \times g$ and the cell culture supernatants were mixed with equal volume of Griess reagent (Sigma). The absorbance was spectrophotometrically measured at 540 nm and the NO concentration was determined by a standard curve of NaNO_2 (5–60 μM) and expressed as μM .

2.11. Hydrogen peroxide release

Hydrogen peroxide release by macrophages was determined according to Pick and Mizel (1981). Cell culture supernatants (100 μl) of monocyte-macrophages co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* were mixed with an equal volume of fresh phenol red solution (5.5 mM dextrose, 0.056 g phenol red and 8.5 U/ml Type I HRP in DPBS) in 96-well plate and incubated for 3 h. Reaction was stopped adding 10 μl of NaOH 1 N solution. The absorbance was spectrophotometrically measured at 620 nm and the H_2O_2 concentration determined by standard curve of H_2O_2 (5–40 μM) and expressed as μM .

2.12. Isolation of murine splenocytes and proliferation assay

Six weeks old male C57BL/6 mice were sacrificed and their spleens were removed aseptically and passed through a stainless mesh on ice. The cells were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 5 min with erythrocytes lysis buffer (NH_4Cl 150 mM, KHCO_3 10 mM,

Na_2EDTA 0.1 mM). After centrifugation at 1500 rpm for 5 min, the pelleted cells were washed in PBS, resuspended and cultured in RPMI medium with 7% FBS, penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$. Cells were counted with a hemocytometer by trypan blue dye exclusion technique. Cell viability exceeded 95%. Murine splenocytes were seeded in 96 well plates at a density of 2×10^5 cells/well. After 24 h of incubation, JSE concentrations between 1 and 200 $\mu\text{g/ml}$ were added to the cells. Positive controls received lipopolysaccharides (LPS) 1 $\mu\text{g/ml}$. After 48 h of treatment, the MTT assay was performed and the relative viability was calculated as described (Jacobo-Salcedo et al., 2011).

2.13. NK cell activity

The activity of natural killer (NK) cells was measured as previously described (Tu et al., 2008) with some modifications. Briefly, K562 cells (human erythromyeloblastoid leukemia) used as target cells, were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in RPMI medium. After 24 h, murine splenocytes, used as the effector cells, were added at 1×10^6 cells/well to give effector/target cells a ratio of 50:1. After incubation for 4 h, cells were treated with JSE concentrations between 1 and 200 $\mu\text{g/ml}$ during 48 h. Then, cells were subjected to MTT assay (Jacobo-Salcedo et al., 2011). NK cell activity was calculated as follows: NK activity (%) = $(\text{ODT} - (\text{ODS} - \text{ODE})) / \text{ODT} \times 100\%$ where ODT is optical density value of target cells control, ODS is optical density value of test samples and ODE is optical density value of effector cells control.

2.14. Statistical analysis

Experimental values are expressed as the mean \pm the standard deviation of at least three experiments in triplicate. Data were

analyzed using one-way ANOVA, followed by *post hoc* Tukey tests. The level of $P \leq 0.05$ was used to determine statistical significance. All calculations were performed using the Graph Pad Prisma V.3 software system (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. KM quantitation

HPLC analysis showed that KM was the major component in JSE (Fig. 1). The content of this compound in the extract was 12.75 mg/g. Therefore, JSE concentrations assayed *in vitro* contained 7.7 μM KM (JSE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 13.1 μM KM (JSE 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 38.5 μM KM (JSE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 77 μM KM (JSE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 154 μM KM (JSE 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The JSE concentrations assayed *in vivo* contained 19.1 μM KM (JSE 10 mg/kg), 95.5 μM KM (JSE 50 mg/kg) and 191 μM KM (JSE 100 mg/kg).

3.2. JSE exerts low toxic effects *in vitro* and *in vivo*

In comet assay, the tail length and the olive tail moment in cells treated with JSE at 200 and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were significantly higher and with the same potency than the positive control NaAsO_2 65 ng/ml ($P \leq 0.05$), whereas lower JSE concentrations did not show DNA damage (Fig. 2A and B). The LD_{50} estimated by the Lorke method (1983) was >5000 mg/kg *i.p.* and >5000 mg/kg *o.p.* At doses of 1600 mg/kg or higher, neurological deficit was observed in the mice only in the first 4 h after treatment. The symptoms included immobility, dizziness and sedation. Also, JSE at doses up to 1000 mg/kg decreased significantly body weight, whereas lower concentrations had no such effect (results not shown). On the contrary, lower dose increases body weight as much as vehicle treated mice (results not shown).

3.3. JSE induces apoptosis in HeLa cells

Previously, we showed that *Justicia spicigera* had the highest cytotoxic activity on HeLa cells ($\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Jacobó-Salcedo et al., 2011). To analyze whether JSE has the potential effect to induce apoptosis in cancer cell lines, HeLa cells were treated with JSE and analyzed by flow cytometry. JSE induced 35% of apoptosis (Annexin⁺/PI⁻ plus Annexin⁺/PI⁺) compared to untreated cells, whereas CDDP induced 54% of apoptosis (Fig. 3). In human normal HaCaT cells, JSE and CDDP induced 7% and 56%, respectively, of apoptosis (Fig. 3).

3.4. JSE exerts antitumor effects

After 15 days of treatment, JSE administrated at 10, 50 and 100 mg/kg *i.p.* inhibited the growth of the HeLa cell tumors significantly ($P \leq 0.05$) by 28%, 41% and 53%, whereas CDDP 1 mg/kg inhibited the tumor growth by 63% compared to untreated mice (Fig. 4A). Furthermore, JSE inhibited significantly ($P \leq 0.05$) tumoral weight in mice by 24% (10 mg/kg) and 44% (50 mg/kg) and 51% (100 mg/kg) whereas CDDP 1 mg/kg inhibited tumor weight by 67% as compared to untreated mice (Fig. 4B).

3.5. JSE induces immunomodulatory effects *in vitro*

We found that JSE stimulated the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* cells by human differentiated macrophages, in a concentration dependent manner, and tested at concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ induced the phagocytosis with higher potency than the positive control LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 5A). JSE induced the NO production and H_2O_2 release in human macrophages in a concentration dependent manner, and tested at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ showed

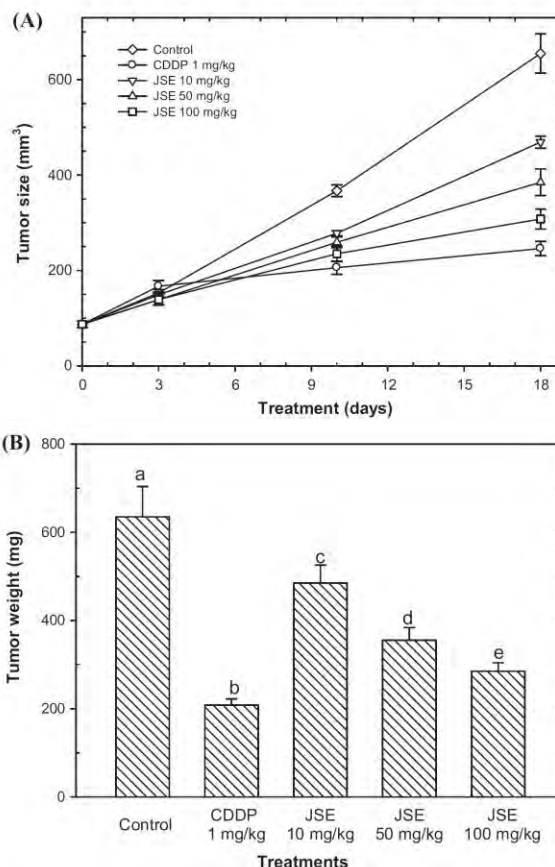


Fig. 4. JSE inhibits the growth and decreases tumor weight in nu/nu mice bearing HeLa tumor. Mice were injected with HeLa cells (1×10^6) and 8 days after tumor implantation were treated intraperitoneally with varying doses of JSE (10–100 mg/kg) or CDDP 1 mg/kg daily over a period of 18 days. Tumors were measured (A) and weighed (B) as described in Section 2. Data are representative of three independent experiments in quintuplicate. Results represent the mean \pm standard deviation (SD). Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey tests.

a higher potency than LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 5B). In murine splenocytes, JSE stimulated the proliferation by 127% (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 134% (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), compared to untreated cells (Fig. 5C). Furthermore, JSE induced the NK cell activity by 9.9% and 10.7% added at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively (Fig. 5D).

4. Discussion

In Mexican traditional medicine, leaves of *Justicia spicigera* are used as immunostimulatory (Herrera-Arellano et al., 2009) and for the empirical treatment of cervical cancer (Márquez et al., 1999). However, the antitumor effects of *Justicia spicigera* as well as its toxic and immunomodulatory effects are still unknown.

Previously it was shown the presence of kaempferitrin in ethanol extracts of *Justicia spicigera* (Euler and Alam, 1982; Domínguez et al., 1990). In this study, we showed that KM was the most abundant compound in JSE and that its content (12.75 mg/g) was 2.3-fold and 5.9-fold lower than those reported for the medicinal plants *Hibiscus cannabinus* and *Cinnamomum osmophloeum*, respectively (Rho et al., 2010; Lin et al., 2011). However, a more

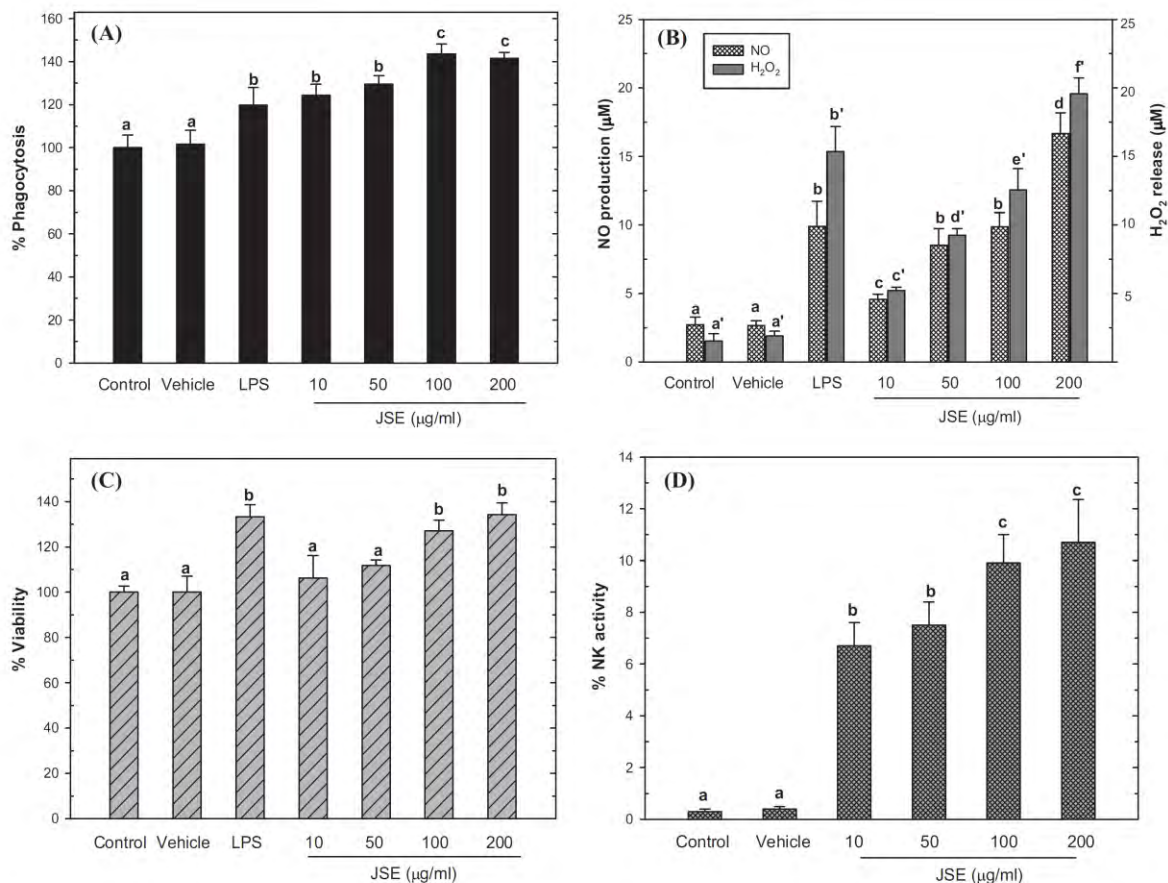


Fig. 5. JSE exerts immunomodulatory effects *in vitro*. PBMC differentiated into macrophages, with MPA, and co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* yeast were treated with DMSO 0.01% (vehicle), LPS 1 μg/ml (positive control) or indicated concentrations of JSE for 24 h. The amount of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosed was measured by flow cytometry (A), and NO production and H₂O₂ release were quantified from the cell culture medium supernatants (B). Murine splenocytes were treated with LPS 1 μg/ml or various concentrations of JSE for 48 h. Cell proliferation was measured with the MTT assay (C). K562 cells cultured in the presence of murine splenocytes were treated with various concentrations of JSE for 48 h. NK activity was measured with the MTT assay and calculated as described in Section 2 (D). Results represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments in quadruplicate. Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey tests.

efficient protocol to extract kaempferitrin from *Justicia spicigera* is currently being performed in our laboratory. The HPLC results also showed additional unidentified compounds with retention times of 9.8 min and 11.9–12.4 min as constituents of JSE. Experiments currently in course in our group seek to identify these JSE components. Toxicological studies with natural products are needed to provide security in future clinical studies. In this study, we first evaluated the *in vitro* toxic effects of JSE using the comet assay. Only JSE tested at concentrations of 400 and 1000 μg/ml showed significant ($P \leq 0.05$) toxic effects. Then we evaluated the *in vivo* toxic effects of JSE by the acute toxicity test according to the Lorker method (1983). The results showed that the LD₅₀ for JSE was >5000 mg/kg *i.p.* and >5000 mg/kg *o.p.* However, the chronic toxicity study should be carried out in order to validate JSE safety on long term use. The relative species *Justicia pectoralis* showed a LD₅₀ of 3531 mg/kg *o.p.* in Swiss albino mice and no symptoms of toxicity were reported (Lagarto Parra et al., 2001). The results regarding the toxicological effects of JSE evaluated *in vitro* and *in vivo* suggest that this plant might be considered as low toxic.

Apoptosis is recognized as an efficient strategy for cancer chemotherapy and an indicator for cancer treatment and prevention. Previously, we showed that *Justicia spicigera* showed strong cytotoxic effects against HeLa cells (Jacobo-Salcedo et al., 2011). In this study, we showed that JSE exerted cytotoxic effects and induced 35% apoptosis in HeLa cells, compared to untreated cells. Although JSE showed lower pro-apoptotic potency on HeLa cells compared to CDDP, this plant extract did not display toxic effects on the normal cells HaCaT (7% of apoptosis). In contrast, CDDP showed high toxic effects on normal cells (56% of apoptosis). The results suggest that *Justicia spicigera* exerts cytotoxic effects against cancer cells with low toxic effects on human normal cells.

The JSE doses used to evaluate antitumor effects were selected based on their lack of toxic effects, as evaluated in acute toxicity test and on preliminary studies carried out in our laboratory. Although the capability of JSE 100 mg/kg to decrease tumor weight was 1.5-fold lower compared to CDDP 1 mg/kg, this plant extract did not have any effect on body weight in mice (results not shown). In contrast, CDDP reduced body weight by 11% (results

not shown). In this study, JSE showed a tumor growth inhibition by 53%, which indicates that *Justicia spicigera* might be an important source of antitumor compounds. It is highly desirable to find new antitumor agents with same or similar potency than drugs currently used in chemotherapy, but with lower toxic effects. *Justicia spicigera* showed a similar antitumor potency compared to CDDP, but showed much lower toxic effects *in vitro* and *in vivo* than CDDP.

Immunosuppression is one of the main obstacles in chemo- and radiotherapy. Therefore, it is necessary to find new antitumor drugs which can potentiate the immune system. Activated macrophages play an important role in the immune system against tumor growth due to their ability of phagocytosis, synthesis and release of NO and H₂O₂, which are considered cytotoxic agents toward certain tumors (Mavrier and Edgington, 1984). The NO and H₂O₂ produced by macrophages inhibit mitochondrial respiration and DNA replication which affects essential enzymes in target cells (Hibbs et al., 1987). Spleen is involved in fighting the systemic infections, whereas NK cells play a critical role in immune surveillance by the secretion of cytokines such as IFN- γ (Randy and Venkataraman, 2002). Previously, we showed that *Justicia spicigera* ethanol extracts tested at 100 μ g/ml stimulated the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells with similar potency as compared to phytohemagglutinin 1 μ g/ml (Jacobo-Salcedo et al., 2011). In this study, we showed that *Justicia spicigera* stimulates the phagocytosis, NO production and H₂O₂ release with higher potency than LPS in human differentiated macrophages. Also, *Justicia spicigera* stimulates the proliferation of murine splenocytes and induces the activity of natural killer cells. Thus, *Justicia spicigera* exerts significant immunomodulatory effects on immune responses mediated by macrophages, splenocytes and NK cells.

In summary, this study shows that *Justicia spicigera* is a good source of the flavonoid kaempferitrin. In addition, *Justicia spicigera* exerts low toxic effects *in vitro* and *in vivo*, induces high toxic effects *in vitro* and *in vivo* against HeLa cells and exerts immunomodulatory activities *in vitro*. Thus, *Justicia spicigera* could be a good source of potential anticancer drugs due to its low toxicity, antitumor effects and immunomodulatory activities.

Experiments are currently being carried out in our laboratory to isolate and evaluate active compound(s) from JSE responsible of toxic effects on HeLa cells *in vitro* and *in vivo*. Future results will describe the molecular mechanism of action by which JSE and its active compound(s) exert their cytotoxic effects on cancer cells. In addition, further experiments will evaluate the capability of *Justicia spicigera* to stimulate immune system in an *in vivo* model. Nevertheless, it is needed to realize more studies to elucidate the immunomodulatory mechanisms.

Acknowledgments

AJAC (174493), GLT (199976) and OGR (205072) were endowed with graduate fellowships from CONACYT. We acknowledge generous grant support from Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal (ICyT-GDF; GI/PIFUTP08-142 to AGC), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACYT-México grant 127822 to AGC). We thank Miriam Guido-Jimenez and Rocio Mendez-Martinez for their technical assistance.

References

Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 945–972.

- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Dominguez, F., López-Toledo, G., Chávez, M., Ortiz-Tello, A.J., Garcia-Carranca, A., 2012. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 140, 438–442.
- Caceres-Cortes, J.R., Cantu-Garza, F.A., Mendoza-Mata, M.T., Chavez-Gonzalez, M.A., Ramos-Mandujano, G., Zambrano-Ramirez, I.R., 2001. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy Research* 15, 691–697.
- Dominguez, X., Achenbach, H., González, C.C., Ferré-D'Amare, A.R., 1990. Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). *Revista Latinoamericana de Química* 21, 142–143.
- Esteban, M.A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer, J., 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 293, 133–141.
- Euler, K.L., Alam, M., 1982. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products* 45, 220–221.
- Green, L.C., Luzuriaga, K.R., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7764–7768.
- Herrera-Arellano, A., Jaime-Delgado, M., Herrera-Alvarez, S., Oaxaca-Navarro, J., Salazar-Martinez, E., 2009. Uso de terapia alternativa/complementaria en pacientes seropositivos a VIH. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 47, 651–658.
- Hibbs Jr., J.B., Vavrin, Z., Taintor, R.R., 1987. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *Journal of Immunology* 138, 550–565.
- Jacobo-Salcedo, M.d.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Álvarez, C., Gonzalez-Espindola, L.A., Dominguez, F., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Lujan, C., Gonzalez-Martinez, M.d.R., Gomez-Sanchez, M., Estrada-Castillon, E., Zapata-Bustos, R., Medellin-Milan, P., Garcia-Carranca, A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications* 6, 1925–1928.
- Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., Iglesias Buela, L., 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8, 395–400.
- Lin, T.Y., Liao, J.W., Chang, S.T., Wang, S.Y., 2011. Antidyslipidemic activity of hot-water extracts from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. *Phytotherapy Research* 25, 1317–1322.
- Looney, W.B., Mayo, A.A., Janners, M.Y., Mellon, J.G., Allen, P., Salak, D., Morris, H.P., 1971. Cell proliferation and tumor growth in hepatomas 3924A. *Cancer Research* 31, 821–825.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Márquez, A., Lara-Ochoa, F., Esquivel-Rodriguez, B., Mata, R., 1999. Plantas Medicinales de México II Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México, p. 178.
- Mavrier, P., Edgington, T.S., 1984. Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. I. Demonstration of an oxygen-dependent myeloperoxidase-independent mechanism. *Journal of Immunology* 132, 1980–1986.
- Mitchell, M.S., 2003. Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer. *International Immunopharmacology* 3, 1051–1059.
- Ortiz-Sánchez, E., Daniels, T.R., Helguera, G., Martinez-Maza, O., Bonavida, B., Penichet, M.L., 2009. Enhanced cytotoxicity of an anti-transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein in combination with gambogic acid against human malignant hematopoietic cells: functional relevance of iron, the receptor, and reactive oxygen species. *Leukemia* 23, 59–70.
- Pick, E., Mizel, D., 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods* 46, 2111–2126.
- Randy, R.B., Venkataraman, S., 2002. Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 41, 287–298.
- Rho, H.S., Ahn, S.M., Lee, B.C., Kim, M.K., Ghimeray, A.K., Jin, C.W., Cho, D.H., 2010. Changes in flavonoid content and tyrosinase inhibitory activity in kenaf leaf extract after far-infrared treatment. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters* 20, 7534–7536.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.
- Tu, J., Sun, H.X., Ye, Y.P., 2008. Immunomodulatory and antitumor activity of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 266–271.
- Vega-Avila, E., Espejo-Serna, A., Alarcon-Aguilar, F., Velazco-Lesama, R., 2009. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 52, 78–82.
- Yañez, L., Borja-Aburto, V.H., Rojas, E., de la Fuente, H., Gonzalez-Amaro, R., Gomez, H., Jonjitud, A., Diaz-Barriga, F., 2004. DDT induces DNA damage in blood cells. Studies *in vitro* and in women chronically exposed to this insecticide. *Environmental Research* 94, 18–24.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines

Angel Josabad Alonso-Castro^{a,b,*}, Maria del Carmen Juárez-Vázquez^b, Fabiola Domínguez^c, Ignacio González-Sánchez^a, Eduardo Estrada-Castillón^d, Gabriela López-Toledo^b, Marco Chávez^{e,f}, Marco A. Cerbón^a, Alejandro García-Carranca^{b,g,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico

^b División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología México, México, DF, Mexico

^c Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS, Metepec, Puebla, Mexico

^d Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, Linares, Nuevo León, Mexico

^e Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, México, DF, Mexico

^f Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas, Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, México, DF, Mexico

^g Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2012

Received in revised form

8 June 2012

Accepted 11 June 2012

Available online 23 June 2012

Keywords:

Phoradendron serotinum

Cancer

Antitumor

Apoptosis

Toxicity

Immunomodulatory

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Phoradendron serotinum* is commonly used in Mexican traditional medicine for the empirical treatment of cancer. However, there are no studies regarding the antitumoral or immunomodulatory activities of *Phoradendron serotinum*.

Materials and methods: The *in vivo* toxicity of ethanolic extracts of *Phoradendron serotinum* (PSE) was evaluated in mice according to the Lorke procedure. The *in vitro* immunomodulatory effects of PSE were evaluated estimating the effects of PSE on the pinocytosis, NO production and lysosomal enzyme activity in murine macrophages RAW 264.7. The effects of PSE on the proliferation of murine splenocytes and NK cell activity were also assayed. The cytotoxic effects on TC-1 (lung murine cancer cells) were evaluated using the MTT assay, whereas the apoptotic effect of PSE on TC-1 cells was evaluated using TUNEL assay. Also, different doses of PSE were injected intraperitoneally daily into C57BL/6 mice bearing tumors of TC-1 cells during 25 days. The growth and weight of tumors was measured. In addition, the levels of IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 and IFN- γ in murine serum and supernatants of K562 cell–murine splenocyte cocultures were measured.

Results: PSE stimulated the proliferation, pinocytosis and lysosomal enzyme activity in murine macrophages with a similar potency than lypopolisaccharides 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In addition, PSE stimulated the proliferation of murine splenocytes and induced the NK cell activity. PSE showed cytotoxic ($\text{IC}_{50} = 1.9 \mu\text{g}/\text{ml}$) and apoptotic effects against TC-1 cells. The LD_{50} was 125 mg/kg by intraperitoneal route (i.p.) and 375 mg/kg by oral route. PSE administrated at 1, 5 and 10 mg/kg i.p. inhibited the tumor growth by 18%, 40% and 69%, respectively, in mice bearing TC-1 tumor. PSE increased the *in vitro* and *in vivo* release of IL-2, IL-6 and IFN- γ but lacked effect on IL-12 and IL-23 release.

Conclusions: *Phoradendron serotinum* shows moderate toxic effects *in vivo*, exerts cytotoxic and apoptotic effects on TC-1 cells. *Phoradendron serotinum* also has antitumor effects in mice bearing TC-1 tumor and induces immunomodulatory activities *in vivo*. The results suggest that antitumoral effects of PSE are related with the production of immunity-related cytokines.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mistletoes are parasitic plants, distributed worldwide, that infest several tree species. The European mistletoe *Viscum album* is the most studied species. In certain European countries, preparations made from *Viscum album* are among the most prescribed drugs offered to cancer patients (Kienle and Kiene, 2010).

* Corresponding authors at: Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, DF, Mexico. Tel.: +52 55 56280433; fax: +52 55 54854371.

E-mail addresses: angeljosabad@hotmail.com (A.J. Alonso-Castro), carranca@biomedicas.unam.mx (A. García-Carranca).

Clinical trials have revealed that *Viscum album* increases survival and quality of life, as well as exerts anticancer and immunomodulatory effects (Kienle and Kiene, 2010).

The American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (synonym *Phoradendron tomentosum* (DC) Engelm.), an evergreen parasitic plant that infests tree species such as hackberry, mesquite, oak, and elm, is distributed from South United States to Northern México. The aerial parts of this plant are used in the Mexican traditional medicine for the empirical treatment of body pain, cancer, diabetes, urinary tract infections, varicose veins and dysmenorrhea (González-Ferrara, 1998; Adame and Adame, 2000; JacoboSalcedo et al., 2011). Recently, we reported that *Phoradendron serotinum* showed high cytotoxic effects against human cancer cells (JacoboSalcedo et al., 2011). In addition, *Phoradendron serotinum* stimulated the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells with similar potency as compared to phytohemagglutinin 1 µg/ml (JacoboSalcedo et al., 2011). However, there are no studies regarding the antitumoral or immunomodulatory activities of *Phoradendron serotinum*. Some *in vivo* studies regarding the toxicological effects of *Phoradendron serotinum* have been carried out (Calzado-Flores et al., 2002; Echávarri-Guzmán et al., 2005). However, it is necessary to perform more toxicological studies with this plant in order to evaluate its safety.

On the other hand, phytochemical studies have shown the presence of the c-glycoside flavone vitexin (VTX) in the leaves of *Phoradendron serotinum* (Dossaji et al., 1983).

This study shows, for the first time, that ethanolic extracts of *Phoradendron serotinum* leaves exert antitumoral activities and immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), RPMI medium and fetal bovine serum (FBS) were from GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA). Cisplatin (CDDP) was from Accord Farma (Distrito Federal, México). Lipopolysaccharides (LPS) and *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) were purchased from Sigma Chem (St. Louis, MO, USA). Vitexin (VTX) was from Fluka (Buchs, Switzerland). Sevoflurane was from Abbot Laboratories (Chicago, IL, USA). ELISA kits for the quantitation of IL-6, IL-12 and IL-23 (Superarray Biosciences, Frederick, MD, USA), IL-2 (Peprotech Inc, Rocky Hill, NJ, USA) and IFN-γ (Qiagen, Germantown, MD, USA) were acquired. All other chemicals were from Sigma.

2.2. Cells and culture conditions

TC-1 cells, derived from primary lung epithelial cancer cells of C57BL/6 mice, were kindly provided by Prof. L. Gissman (DKFZ, Heidelberg, Germany) and maintained in culture flasks with DMEM supplemented with 7% FBS, penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml and gentamicin 400 µg/ml. RAW 264.7 (murine macrophages) and K562 (human erythromyeloblastoid leukemia), obtained from ATCC (Manassas, VA, USA), were cultured with DMEM supplemented with 7% FBS and antibiotics. All cell cultures were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

2.3. Animals

Six week old C57BL/6 mice, weighing 18–23 g, from the Experimental Animal Center at the Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, México, were used. The experiments were performed following the NIH Guide for Treatment and Care for

Laboratory Animals and the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). All the procedures carried out in this study were approved by the Research Ethic Committee from Instituto Nacional de Cancerología (Distrito Federal, México). The mice, having free access to food and water, were housed in cages with filtered air in a climate and light controlled room with a 12 h light/dark cycle.

2.4. Preparation of *Phoradendron serotinum* extract and quantitation of vitexin

Leaves of *Phoradendron serotinum*, parasitic on *Prosopis glandulosa* Torr var. *torreyana* M.C. Johnston, were collected in the municipality of Santa Catarina, Nuevo León, México during July 2009. Plant material was dried under darkness at room temperature. A voucher specimen (E. Estrada, 20768, CFNL) of *Phoradendron serotinum* was preserved at the herbarium of Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León (CFNL). *Phoradendron serotinum* extracts (PSE) were obtained as follows. Powdered dry leaves of *Phoradendron serotinum* (100 g) were extracted with ethanol using a Soxtherm apparatus (Soxtherm automatic, Gerhardt, Germany) by 2 h. The solvent was evaporated to dryness in a vacuum rotatory evaporator below 60 °C. The dried residue was dissolved in 15 ml of methanol and filtered by an acrodisk nylon membrane 0.45 µm pore size (Gelman Sciences, Northampton, UK). Detection and quantification of vitexin (VTX) was performed by reverse-phase HPLC in a Waters 2795 (Waters Corp., Milford, MA, USA) instrument equipped with autosampling and a 996 photodiode array detector. PSE and VTX were separated on Kromasil C-18 150 mm × 4.6 mm (Metachem Technologies Inc, Torrance, CA, USA) column and eluted with acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany HPLC grade) and acetic acid (HPLC grade Merck Darmstadt, Germany) at the concentration of 2% (50:50, v/v), at a flow rate of 0.4 ml/min and an injection volume of 5 µl. A linear gradient program was used as follows 10% B (0 min) and 70% B (20 min). All the chromatographic operations were carried out at room temperature. For VTX, maximum detection wavelength was 340 nm with retention time of 10.4 min. Retention time and UV spectra of VTX from PSE were compared with those of high-purity commercial standards. VTX concentrations in the extract were calculated from calibration plots ($R^2 = 0.9932$) obtained from dilutions, from 0.354 to 1.062 mg/ml, of the commercial standards. For bioassays, extracts were suspended in DMSO (Sigma Chem., St. Louis, MO, USA) and preserved at room temperature protected from light.

2.5. *In vitro* tests

2.5.1. Proliferation assay of murine macrophages

Murine macrophages were seeded in 96 wells plates at a density of 5×10^4 cells/well. After 24 h of incubation, concentrations of PSE between 1 to 50 µg/ml in the presence or absence of LPS 1 µg/ml were added to the cells. Positive controls received lipopolysaccharides (LPS) 1 µg/ml. After 48 h of treatment, 10 µl of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] solution 5 mg/ml, in phosphate buffer saline (PBS), was added to each well and incubated for 2 h at 37 °C. Then, the medium was removed and formazan crystals were dissolved in DMSO. The optical density was measured at 590 nm using an ELISA reader (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). The viability of treated cells was expressed as the relative viability as follows:

$$\% \text{ relative viability} = \frac{\text{control OD} - \text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

2.5.2. Nitric oxide (NO) production

Nitric oxide (NO) production was determined based on Griess reaction (Green et al., 1981). RAW 264.7 macrophages were seeded (5×10^4 cells per well) in 96 well plates. After 24 h of incubation, macrophages were treated with various concentrations of PSE (1–50 $\mu\text{g/ml}$) in the absence or presence of LPS 1 $\mu\text{g/ml}$. After 48 h of incubation, equal volumes of cell culture medium and Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/5% H_3PO_4) were mixed and the OD was read on a microplate reader at 515 nm. The nitrite concentration (μM) was determined by the interpolation of standard curves constructed with known concentrations of KNO_2 .

2.5.3. Cellular lysosomal enzyme activity assay

The cellular lysosomal enzyme activity assay was used to determine acid phosphatase activity in macrophages (Suzuki et al., 1988). Briefly, RAW 264.7 macrophages were seeded (5×10^4 cells per well) in 96 well plates. After 24 h of incubation, macrophages were treated with various concentrations of PSE (1–50 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or the absence of LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ during 48 h. Then, the medium was removed and 20 μl of 0.1% Triton X-100, 100 μl of 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) solution and 50 μl of 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) were added in each well. After 30 min of incubation, 150 μl of 0.2 M borate buffer (pH 9.8) was added and the absorbance was measured at 405 nm. The percentage of lysosomal enzyme activity was calculated by the following equation:

$$\% \text{ lysosomal enzyme activity} = \frac{\text{sample OD} - \text{negative control OD}}{\text{negative control OD}} \times 100$$

2.5.4. Neutral red uptake

The pinocytic activity of PSE was evaluated using the neutral red assay as described by Cheng et al. (2008) with some modifications. RAW 264.7 macrophages were seeded (5×10^4 cells per well) in 96 well plates. After 24 h of incubation, macrophages were treated with various concentrations of PSE (1–50 $\mu\text{g/ml}$) in the absence or presence of LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ for 48 h. Then, 100 μl neutral red solution at 0.075%, dissolved in 10 mM phosphate buffer solution (PBS), was added to the cells and incubated for 2 h. The supernatant was discarded and the cells were washed twice with PBS. Murine macrophages were lysed (ethanol and 0.01% acetic acid at the ratio of 1:1, 100 $\mu\text{l/well}$) and incubated for 4 h. The optical density was measured at 540 nm in microplate reader. The red neutral uptake was calculated by the following equation:

$$\% \text{ neutral red uptake} = \frac{\text{sample OD} - \text{negative control OD}}{\text{negative control OD}} \times 100$$

2.5.5. Isolation of murine splenocytes and proliferation assay

Six weeks old male C57BL/6 mice were sacrificed and their spleens were removed aseptically and passed through a stainless mesh on ice. The cells were incubated at 37 °C for 5 min with erythrocytes lysis buffer (NH_4Cl 150 mM, KHCO_3 10 mM, and Na_2EDTA 0.1 mM). After centrifugation at 1500 rpm for 5 min, the pelleted cells were washed in PBS, resuspended and cultured in RPMI medium with 7% FBS, penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$. Cells were counted with a haemocytometer by trypan blue dye exclusion technique. Cell viability exceeded 95%. Murine splenocytes were seeded in 96 wells plates at a density of 2×10^5 cells/well. After 24 h of incubation, concentrations of PSE between 1 and 50 $\mu\text{g/ml}$ were added to the cells. After 48 h of treatment, MTT assay was performed and relative viability was calculated as described above.

2.5.6. NK cell activity

The activity of natural killer (NK) cells was measured as previously described (Tu et al., 2008) with some modifications. Briefly, K562 cells used as target cells, were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in RPMI medium. After 24 h, murine splenocytes, used as the effector cells, were added at 1×10^6 cells/well to give effector/target cells a ratio of 50:1. After incubation for 4 h, cells were treated with PSE concentrations between 1 and 50 $\mu\text{g/ml}$ during 48 h. LPS was used as positive control. Then, cells were subjected to MTT assay. NK cell activity was calculated as follows: $\text{NK activity (\%)} = (\text{ODT} - (\text{ODS} - \text{ODE})) / (\text{ODT} \times 100\%)$ where ODT, optical density value of target cells control, ODS, optical density value of test samples, ODE, optical density value of effector cells control.

2.5.7. Cytokine determination in the supernatants of cultured splenocytes

The assay to determine the cytokine levels *in vitro* was carried out with similar conditions as described in NK cell activity assay. K562 were seeded in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells/well in RPMI medium. After 24 h, murine splenocytes were added at 1×10^7 cells/well. After incubation for 4 h, cells were treated with PSE at 50 $\mu\text{g/ml}$, in the presence or absence of LPS, during 48 h. Then, the plates were centrifuged at 1400 $\times g$ for 5 min and the supernatants were collected for the detection of IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 and IFN- γ using commercially available kits according to the manufacturer's instructions. The optical density was measured at 450 nm in microplate reader.

2.5.8. Cytotoxicity assay

MTT assay was used to evaluate the toxic effects of PSE against cancer cells. TC-1 cells were seeded in 96-well microplates at a density of 5000 cells/well. After 24 h of incubation, concentrations of PSE between 0.1 and 50 $\mu\text{g/ml}$ were added to the cells. Parallel cultures were feed with cisplatin, between 0.1 and 50 $\mu\text{g/ml}$, as positive control. After 48 h of treatment, MTT assay was performed as described above and the concentration leading to 50% inhibition of viability (IC_{50}) was also calculated by regression analysis (percent survival versus log concentration).

2.5.9. TUNEL assay

The *in situ* DNA fragmentation was detected by Dead End Fluorometric TUNEL system (Promega Corporation, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. TC-1 cells, seeded at a density of 5×10^5 on 60 mm Petri dishes, were allowed to adhere and grow on glass coverslips for 24 h. Cells were treated with IC_{50} of PSE or CDDP, or the vehicle (DMSO 0.01%) for 24 h or 48 h. After incubation, cells were treated as described (González-Sánchez et al., 2011). The samples were rinsed with PBS for three times and analyzed by fluorescence microscopy.

2.6. In vivo tests

2.6.1. Acute toxicity test

The acute toxicity of the PSE, administrated intraperitoneal or intragastric, was estimated according to Lorke method (1983) in C57BL/6 mice. Animals were observed daily during 14 days for mortality, behavioral changes and other toxic signs.

2.6.2. Antitumoral assay

C57BL/6 mice were injected subcutaneously in the left flank with TC-1 cells (6×10^4). Seven days after tumor implantation, groups of five mice received intraperitoneally CDDP 1 mg/kg, doses of PSE from 1 to 10 mg/kg, dissolved in 0.1 ml of 0.9% saline solution, daily over 25 days. The control animals received

0.1 ml of the vehicle solution. Tumors were measured with a Vernier caliper, and their size in mm³ was calculated as follows (Looney et al., 1971):

$$\text{tumor volume} = \frac{\text{length} \times \text{height} \times \text{width}}{2}$$

2.6.3. Cytokine determination

After 25 days of treatment, mice bearing tumor was anesthetized by sevoflurane inhalation and their blood was obtained by cardiac puncture. Serum samples were prepared by centrifuging the whole blood at 2000 × g at 4 °C for 10 min. The supernatants and serum levels of cytokine for IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 and IFN-γ were measured using commercially available kits according to the manufacturer's instructions. The optical density was measured at 450 nm in microplate reader.

2.7. Statistical analysis

Experimental values are expressed as the mean ± the standard deviation of at least three experiments in hexaplicate. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by *post hoc* Tukey tests. The level of $P \leq 0.05$ was used to determine statistical significance. All calculations were performed using the Graph Pad Prisma V.3 software system (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Plant extraction and VTX quantitation

The lyophilization of PSE produced 5.5 g. Thus, the ratio of herbal substance to the native herbal drug preparation (DER native) was 18.2:1. The content of VTX in PSE was 0.88 mg/g. Therefore, PSE concentrations assayed *in vitro* contained 0.35 μM VTX (PSE 1 μg/ml), 0.665 μM VTX (PSE 1.9 μg/ml), 3.5 μM VTX (PSE 10 μg/ml), 8.75 μM VTX (PSE 25 μg/ml) and 17.5 μM VTX (PSE 50 μg/ml). The PSE concentrations assayed *in vivo* contained 1.67 μM VTX (PSE 1 mg/kg), 8.35 μM VTX (PSE 5 mg/kg) and 16.7 μM VTX (PSE 10 mg/kg).

3.2. PSE induces immunomodulatory effects *in vitro*

The immunomodulatory effects of PSE were evaluated on murine macrophages and splenocytes. In the absence of LPS, PSE stimulated the proliferation in murine macrophages in a concentration dependent manner with a similar potency than LPS (Fig. 1A). However, in the presence of LPS, PSE lacked proliferation effects on murine macrophages (Fig. 1A). Moreover, in the absence of LPS, PSE did not induce the NO production (Fig. 1B), but enhanced the lysosomal enzyme activity and neutral red uptake with a similar potency than LPS 1 μg/ml (Fig. 1C and D) in murine macrophages. In the presence of LPS, PSE tested at 50 μg/ml induced the NO production and the lysosomal enzyme activity with higher potency than LPS ($P \leq 0.05$) (Fig. 1C and D) but lacked activity on red neutral uptake (Fig. 1D).

Furthermore, in the absence and the presence of LPS, PSE stimulated the proliferation in murine splenocytes in a concentration dependent manner with a similar potency than LPS (Fig. 1E). In addition, PSE induced the NK cell activity by 6.9% and 7.7% added at 25 μg/ml and 50 μg/ml, respectively (Fig. 1F).

3.3. PSE induces the production of immunity-related cytokines *in vitro*

PSE increased the release of IL-2, IL-6 and IFN-γ in murine splenocytes with similar potency than positive control LPS, but lacked effect on the release of IL-12 and IL-23 (Fig. 2). In the presence of LPS, PSE lacked synergistic effect with LPS on the release of cytokines.

3.4. PSE exerts cytotoxic effects against TC-1 cells

The positive control CDDP showed strong toxic effects ($IC_{50} = 1.9 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$) on TC-1 cells, whereas PSE showed also cytotoxic effects against TC-1 cells ($IC_{50} = 5.1 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$).

3.5. PSE exerts apoptotic effects in TC-1 cells

We used the TUNEL assay to further characterize the cell death induced in TC-1 cells by PSE. The results indicated that TC-1 cells incubated with the vehicle DMSO 0.01% showed no DNA damage (Fig. 3A and D). In contrast, cells treated with CDDP 1.9 μg/ml were positive to the TUNEL reaction at 24 h and 48 h (Fig. 3B and E), showing typical signs of apoptosis such as chromatin condensation and appearance of apoptotic bodies. TC-1 cells treated with PSE 5 μg/ml showed an increase in DNA fragmentation and chromatin condensation at 12 and 24 h, which was evident by a significant increase in TUNEL positive cells suggesting cell death by apoptosis (Fig. 3C and F).

3.6. Acute toxic effects of PSE in mice

The LD₅₀ estimated by Lorke (1983) method for PSE was 125 mg/kg *i.p.* and 375 mg/kg *o.p.* Visible symptoms of toxicity such as sedation and immobility were observed in mice treated with PSE at doses higher than 50 mg/kg *i.p.* and 150 mg/kg *o.p.* Also, PSE at doses up to 50 mg/kg *i.p.* and 100 mg/kg *o.p.* decreased significantly body weight whereas lower concentrations had no such effect (results not shown). On the contrary, lower dose increases body weight as much as vehicle treated mice (results not shown).

3.7. PSE exerts antitumor effects

After 25 days of treatment, PSE administrated at 1, 5 and 10 mg/kg *i.p.* decreased the growth of the TC-1 cell tumors significantly ($P \leq 0.05$) by 21%, 46% and 71%, whereas CDDP 1 mg/kg inhibited the tumor growth by 68% compared to untreated mice (Fig. 4A). Furthermore, PSE inhibited significantly ($P \leq 0.05$) tumoral weight in mice by 18% (1 mg/kg) and 40% (5 mg/kg) and 69% (10 mg/kg), whereas CDDP 1 mg/kg inhibited tumor weight by 64% as compared to untreated mice (Fig. 4).

3.8. The production of immunity-related cytokines is associated with the antitumoral effects of PSE

The positive antitumoral compound CDDP 1 mg/kg decreased serum levels of IL-2, IL-6 and IL-12, IL-23 and IFN-γ although with no statistic differences, compared to untreated mice (Fig. 5). On the other hand, PSE increased the release of IL-2, IL-6 and IFN-γ in a dose dependent manner, but lacked effect on the release of IL-12 and IL-23 (Fig. 5).

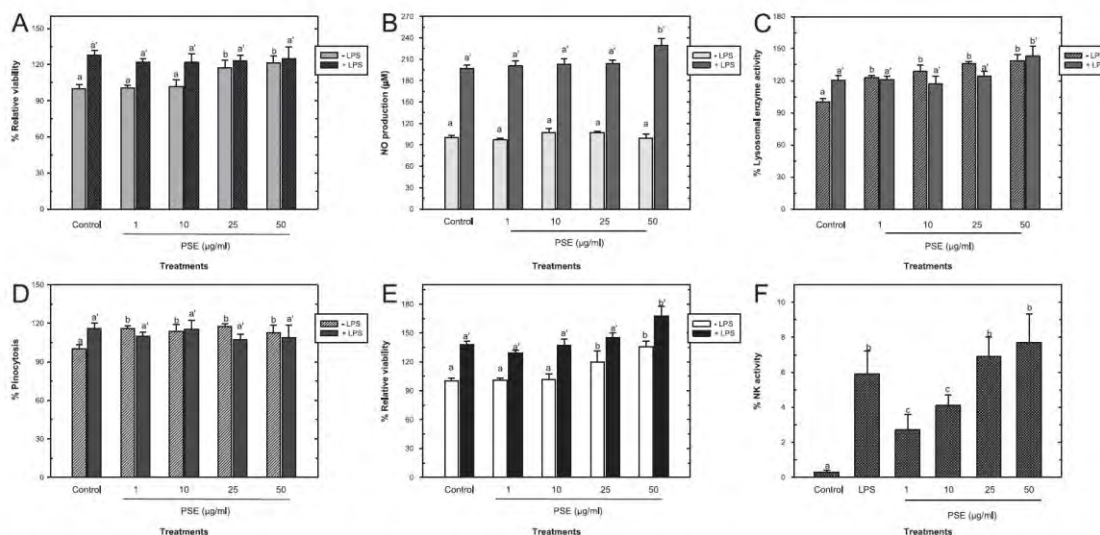


Fig. 1. PSE exerts immunomodulatory effects *in vitro*. RAW 264.7 murine macrophages were treated with DMSO 0.01% (control), LPS 1 µg/ml (positive control) or indicated concentrations of PSE or in the presence or absence of LPS 1 µg/ml for 48 h. The relative viability (A), amount of NO production (B), cellular lysosomal enzyme activity (C) and neutral red uptake (D) were measured. Murine splenocytes were treated with various concentrations of PSE in the presence or absence of LPS 1 µg/ml for 48 h. Cell proliferation was measured with the MTT assay (E). K562 cells cultured in the presence of murine splenocytes were treated with various concentrations of PSE for 48 h. NK cell activity was measured with the MTT assay and calculated as described in Section 2 (F). Results represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments in hexaplicate. Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey test.

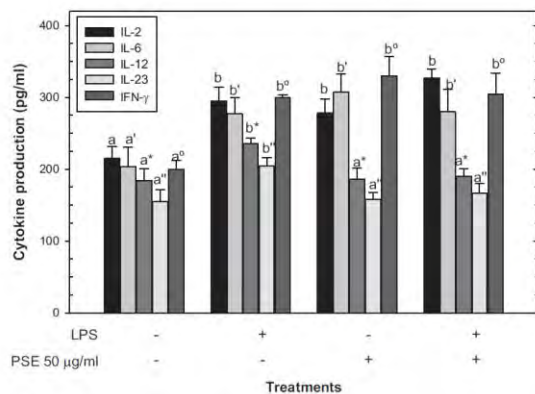


Fig. 2. Effect of PSE on cytokine production from murine splenocytes. K562 was seeded in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells/well. After 24 h, murine splenocytes were added at 1×10^7 cells/well. Cells were treated with PSE 50 µg/ml, in the presence and absence of LPS, during 48 h. Then, the plates were centrifuged and the production of IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 and IFN- γ was measured in supernatants. Data are representative of three independent experiments in quintuplicate. Results represent the mean ± standard deviation (SD). Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey tests.

4. Discussion

Phoradendron serotinum is used in the Mexican traditional medicine for the empirical treatment of cancer (JacoboSalcedo et al., 2011). Recently, we reported that *Phoradendron serotinum* exerted strong cytotoxic effects against human cancer cells and induced the proliferation of human PBMC (JacoboSalcedo et al., 2011). Nonetheless, the antitumoral and immunomodulatory activities of this plant remain to be studied.

In previous studies, Dossaji et al. (1983) showed the presence of vitexin in extracts of *Phoradendron serotinum*. In this study, we showed that the content of VTX in PSE was 0.88 mg/g. The quantity of PSE was 0.2-fold lower but 16-fold higher than those reported for the medicinal plants with cytotoxic effects *Cajanus cajan* and *Carissa opaca*, respectively (Zu et al., 2010; Sahreen et al., 2011).

It is well known that cancer causes immunosuppression. In addition, chemo or radiotherapy causes immunosuppression in patients with cancer (Sulizeanu, 1993). Therefore, it is necessary to find new antitumor drugs which can potentiate the immune system. In this study, we first evaluated whether PSE exerts immunomodulatory effects *in vitro* on murine macrophages and splenocytes. Macrophages represent the first line of host defense after the epithelial barrier. Lysosomal enzyme acid phosphatase is the first step of the macrophage response against invading pathogens (Page et al., 1978). The NO produced by macrophages inhibits mitochondrial respiration and DNA replication which affects essential enzymes in target cells (Page et al., 1978). Spleen is involved in fighting the systemic infections, whereas NK cells play a critical role in immune surveillance by the secretion of cytokines (Randy and Venkataraman, 2002). Previously, we showed that *Phoradendron serotinum* tested at 100 µg/ml stimulated the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells with similar potency as compared to phytohemagglutinin 1 µg/ml (JacoboSalcedo et al., 2011). In this study, we showed that *Phoradendron serotinum* stimulates the proliferation, pinocytosis and lysosomal enzyme activity with similar potency than LPS in murine macrophages. Also, *Phoradendron serotinum* stimulates the proliferation of murine splenocytes and induces the activity of natural killer cells. In the presence of LPS, the results suggest that PSE tested at 50 µg/ml induces synergistic effects with LPS on splenocyte proliferation and lysosomal enzyme activity. Thus, *Phoradendron serotinum* exerts significant immunomodulatory effects *in vitro* on immune responses mediated by macrophages, splenocytes and NK cells.

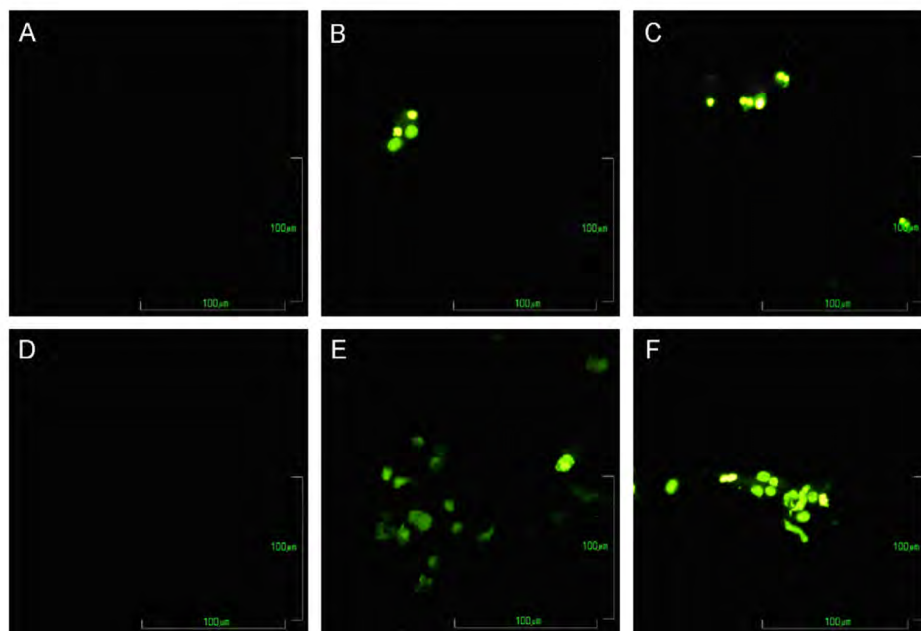


Fig. 3. Determination of apoptosis as evaluated by DNA fragmentation in TC-1 cells treated with PSE by TUNEL assay. Cells were incubated with DMSO 0.01% for 24 h (A) and 48 h (D), cisplatin (CDDP) 1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, as the positive control of apoptosis, for 24 h (B) and 48 h (E) or PSE 5.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h (C) and 48 h (F). Cells were subjected to TUNEL assay. All photographs are shown at 20 \times magnification. Results represent three independent experiments in triplicate.

We also evaluated the cytotoxic effects of PSE against the murine tumoral cell line TC-1. The results indicated that PSE exerted high cytotoxic effects against TC-1 cells with similar potency than the positive control CDDP. Other *Phoradendron* species such as *Phoradendron galeottii*, *Phoradendron reichenbachianum* and *Phoradendron vernicosum* have shown cytotoxic effects against cancer cells (Waizel-Bucay et al., 1994; Caamal-Fuentes et al., 2011). This indicates that American mistletoes might be good sources of cytotoxic compounds. Also, the results here presented corroborate the cytotoxic effects of PSE previously shown on human cancer cells (JacoboSalcedo et al., 2011).

To analyze whether PSE has the potential effect to induce apoptosis in cancer cells, TC-1 cells were treated with PSE and analyzed by TUNEL assay. PSE showed similar pro-apoptotic potency on TC-1 cells compared to CDDP. The results suggest that *Phoradendron serotinum* exerts cytotoxic and apoptotic effects against cancer cells.

It is necessary to perform toxicological studies with medicinal plants to corroborate their safety and use for primary health care. Previously, we showed that PSE lacked toxic effects on human peripheral blood mononuclear cells (JacoboSalcedo et al., 2011). In this study, we showed that PSE lacked toxic effects on murine macrophages and splenocytes. Thus, the results indicate that PSE lacks toxic effects *in vitro*. The LD_{50} calculated for PSE on C57BL/6 mice indicates, for the first time, that *Phoradendron serotinum* can be considered as a middle toxic plant. However, the chronic toxicity study should be carried out to validate the safety of PSE on long term use. Some reports have studied the toxicological effects of *Phoradendron serotinum* on animal models. Normal and streptozotocined-induced diabetic Sprague-Dawley rats treated with *Phoradendron serotinum* at 50 mg/ml during 2 months did not show toxic effects in pancreas, kidneys and liver (Calzado-Flores et al.,

2002). Furthermore, lymphocytes obtained from Sprague-Dawley rats treated with *Phoradendron serotinum* (100 mg/ml) for 7 days did not show genotoxic damage as evaluated by comet assay (Echáviri-Guzmán et al., 2005). The results regarding the toxicological effects of PSE evaluated *in vitro* and *in vivo*, in this study and by others, suggest that this plant might be considered as middle toxic.

We selected PSE doses used to evaluate antitumor effects based on their lack of toxic effects, as evaluated in acute toxicity test and on preliminary studies carried out in our laboratory. The capability of PSE 10 mg/kg to decrease tumor weight was comparable ($P \leq 0.05$) to that of CDDP 1 mg/kg, although this plant extract did not have any effect on the body weight of mice (results not shown). In contrast, CDDP decreased body weight in mice by 9% (results not shown). The results indicated that PSE showed a tumor growth inhibition by 69%, which indicates that *Phoradendron serotinum* might be a source of new antitumor agents with same or similar potency than drugs currently used in chemotherapy, but with lower toxic effects.

Finally, we analyzed whether PSE might induce the release of immunity-related cytokines IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 and IFN- γ *in vitro* and *in vivo*. The results indicated the PSE stimulated *in vitro* and *in vivo* the secretion of IL-2, IL-6 and IFN- γ , but not IL-12 or IL-23, which indicates that the *in vitro* results corroborated the *in vivo* results.

IL-2 and IL-6 induce, each, the stimulation of cytotoxic T cells and enhances cytolytic activity on NK cells (Mosmann and Coffman, 1989; Asano et al., 1997). IL-12 is involved in antitumoral and antiinfections immunity and also was associated to the antitumor effect of *Viscum album* on C57BL/6 mice bearing B16 melanoma (Duong Van Huyen et al., 2006). IL-2, IL-23 and IFN- γ are cytokines with cytotoxic, antitumor and immunomodulatory properties (Timoshenko et al., 2001; Blankenstein and Qin, 2003;

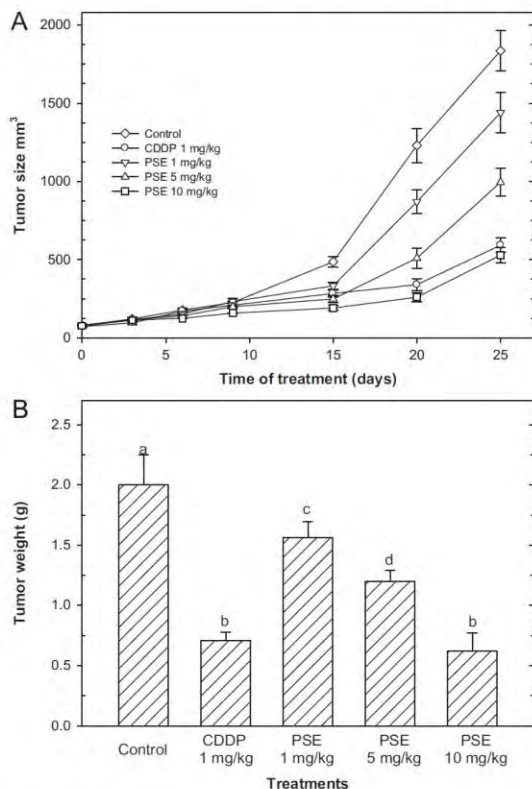


Fig. 4. PSE inhibits the growth and decrease tumor weight in C57BL/6 mice bearing TC-1 tumor. Mice were injected with TC-1 cells (6×10^4) and 7 days after tumor implantation, received intraperitoneally doses of PSE between 1 and 10 mg/kg or CDDP 1 mg/kg daily over a period of 25 days. Tumors were measured (A) and weighed (B) as described in Section 2. Data are representative of three independent experiments in quintuplicate. Results represent the mean \pm standard deviation (SD). Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey tests.

Lo et al., 2003; Overwijk et al., 2006). IL-23 also induces proliferation of memory T cells (Lo et al., 2003).

The *in vitro* results showed that PSE increased NK activity, which suggests that PSE might induce the antitumoral effects due to the release of IL-2 and IL-6 and induce a posterior cytolytic activity of NK cells against tumor cells. Previous clinical studies showed that a β -galactoside-specific lectin (ML-1) from *Viscum album* and *Viscum album* extract increased the release of IL-6 in serum from patients with cancer, which suggests that IL-6 might play an important role in host defense system (Hajto et al., 1990; Son et al., 2010). The findings suggest that the antitumour activity showed by PSE might be achieved by immunity stimulation found to be related to the up-regulated induction of IL-2, IL-6 and IFN- γ .

Experiments are currently being carried out in our laboratory to isolate and evaluate active compound(s) from PSE responsible of the cytotoxic and immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*.

In summary, the results indicate, for the first time, that the *in vitro* cytotoxic and immunomodulatory effects showed by PSE against TC-1 cells were translated to the *in vivo* activity. In addition, the *in vitro* immunomodulatory activities shown in murine macrophages and splenocytes were translated to the *in vivo* activity. This suggests

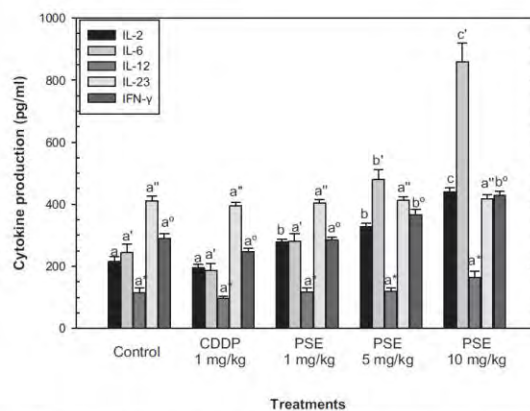


Fig. 5. Effect of PSE on levels of cytokines in C57BL/6 mice bearing tumor. After 25 days of treatment, serum from mice bearing tumor was obtained. The serum levels of IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 and IFN- γ were measured. Data are representative of three independent experiments in quintuplicate. Results represent the mean \pm standard deviation (SD). Lowercase letters indicate significant differences according to ANOVA test ($P \leq 0.05$), followed by *post hoc* Tukey tests.

that the compounds in PSE responsible of the cytotoxic effects were metabolized in the mice and thus exerted the antitumoral and immunomodulatory effect. The results also suggest that *Phoradendron serotinum* exerts its antitumoral effects due to the production of immunity-related cytokines.

Acknowledgments

A.J.A.C. (174493), G.L.T. (199976) and I.G.S. (226748) were endowed with graduate fellowships from CONACYT. We acknowledge generous grant support from Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal (ICYT-GDF; GI/PIFUTP08-142 to A.G.C.), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACYT-México grant 127822 to A.G.C.). We thank Miriam Guido-Jimenez and Rocío Mendez-Martinez for their technical assistance.

References

- Adame, J., Adame, H., 2000. Plantas curativas del Noreste Mexicano: Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y altiplano potosino. Monterrey, Nuevo León, México, Ediciones Castillo, p. 386.
- Asano, Y., Kaneda, K., Hiragushi, K., Tsuchida, T., Higashino, K., 1997. The tumor bearing state induces augmented responses of organ-associated lymphocytes to high dose interleukin-2 therapy in mice. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 45, 63–70.
- Blankenstein, T., Qin, Z., 2003. The role of IFN- γ in tumor transplantation immunity and inhibition of chemical carcinogenesis. *Current Opinion in Immunology* 15, 148–154.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S.R., Moo-Puc, R., 2011. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology* 135, 719–724.
- Calzado-Flores, C., Hurtado-Ramírez, M.B., Flores-Villamueva, Z., Verde-Star, M.J., Segura-Luna, J.J., Lozano-Garza, G., Aguilar-Cuevas, G., 2002. Preliminary chronic toxicological study of aqueous extract of *Phoradendron tomentosum*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 45, 162–163.
- Cheng, A.W., Wan, F.C., Wang, J.Q., Jin, Z.Y., Xu, X.M., 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *International Immunopharmacology* 8, 43–50.
- Dossaji, S.F., Becker, H., Exner, J., 1983. Flavone c-glycosides of *Phoradendron tomentosum* from different host trees. *Phytochemistry* 22, 311–312.
- Duong Van Huyen, J.P., Delignat, S., Bayry, J., Kazatchkine, M.D., Bruneval, P., Nicoletti, A., Kaveri, S.V., 2006. Interleukin-12 is associated with the *in vivo* anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Letters* 243, 32–37.

- Echavarrí-Guzmán, M.A., Cerda-Flores, R.M., Gutiérrez-Cortés, E.I., Verde-Star, M.J., Ibarra-Costilla, E., Aguilar-Cuevas, G., Villa-Treviño, S., Calzado-Flores, C., 2005. Evaluación genotóxica preliminar de *Phoradendron tomentosum* sobre un modelo *in vivo*. *Revista Salud Pública y Nutrición* 8, 39.
- Green, L.C., Luzuriaga, K.R., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7764–7768.
- González-Ferrara, M.M., 1998. Plantas Medicinales del Noreste de México. Grupo Vitro-Novaterra-IMSS, Monterrey, NL, Mexico, p. 25.
- González-Sánchez, I., Solano, J.D., Loza-Mejía, M.A., Olvera-Vázquez, S., Rodríguez-Sotres, R., Moran, J., Lira-Rocha, A., Cerbón, M.A., 2011. Antineoplastic activity of the thiazolo [5,4-b] quinoline derivative D3CLP in K562 cells is mediated through effector caspase activation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 2102–2108.
- Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H.J., 1990. Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Research* 50, 3322–3326.
- JacoboSalcedo, M.d.R., AlonsoCastro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Álvarez, C., GonzalezEspindola, L.A., Dominguez, F., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Lujan, GonzalezMartinez, M.d.R., Gomez-Sanchez, M., Estrada-Castillon, E., Zapata-Bustos, R., Medellin-Milan, P., GarciaCarranca, A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications* 6, 1925–1928.
- Kienle, G.S., Kiene, H., 2010. Review article: influence of *Viscum album* L. (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integrative Cancer Therapy* 9, 142–157.
- Lo, C.H., Lee, S.C., Wu, P.Y., Pan, W.Y., Su, J., Cheng, C.W., Roffler, S.R., Chiang, B.L., Lee, C.N., Wu, C.W., Tao, M.H., 2003. Antitumor and antimetastatic activity of IL-23. *Journal of Immunology* 171, 600–607.
- Looney, W.B., Mayo, A.A., Janners, M.Y., Mellon, J.G., Allen, P., Salak, D., Morris, H.P., 1971. Cell proliferation and tumor growth in hepatomas 3924A. *Cancer Research* 31, 821–825.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology* 46, 111–171.
- Overwijk, W.W., de Visser, K.E., Tirion, F.H., de Jong, L.A., Pols, T.W., van der Velden, Y.U., van den Boorn, J.G., Keller, A.M., Buurman, W.A., Theoret, M.R., Blom, B., Restifo, N.P., Kruisbeek, A.M., Kastelein, R.A., Haanen, J.B., 2006. Immunological and antitumor effects of IL-23 as a cancer vaccine adjuvant. *Journal of Immunology* 176, 5213–5222.
- Page, R.C., Davies, P., Allison, A.C., 1978. The macrophage as a secretory cell. *International Review of Cytology* 52, 119–123.
- Randy, R.B., Venkataraman, S., 2002. Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 41, 287–298.
- Sahreen, S., Khan, M.R., Khan, R.A., 2011. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl4-induced damage in rat. *Complementary and Alternative Medicine* 11, 48–56.
- Son, G.S., Ryu, W.S., Kim, H.Y., Woo, S.U., Park, K.H., Bae, J.W., 2010. Immunologic response to mistletoe extract (*Viscum album* L.) after conventional treatment in patients with operable breast cancer. *Journal of Breast Cancer* 13, 14–18.
- Sulizeanu, D., 1993. Immunosuppressive factors in human cancer. *Advances in Cancer Research* 60, 247–267.
- Suzuki, I., Tanaka, H., Adachi, Y., Yadamoe, T., 1988. Rapid measurement of phagocytosis by macrophages. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36, 4871–4875.
- Timoshenko, A.V., Lan, Y., Gabius, H.J., Lala, P.K., 2001. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination. effects on tumour growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. *European Journal of Cancer* 37, 1910–1920.
- Tu, J., Sun, H.X., Ye, Y.P., 2008. Immunomodulatory and antitumor activity of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 266–271.
- Waizel-Bucay, J., Herrera-Santoyo, J., Alonso-Cortés, D., Villarreal-Ortega, M.L., 1994. Estudios preliminares de la actividad citotóxica de muérdagos mexicanos *Cladocolea grahami*, *Phoradendron reichenbachianum* and *Phoradendron galeotii* (Loranthaceae). *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 40, 133–137.
- Zu, Y.C., Liu, X.L., Fu, Y.J., Wu, N., Kong, Y., Wink, M., 2010. Chemical composition of the SFE-CO extracts from *Cajanus cajan* (L.) Huth and their antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* 17, 1095–1101.

1.14. Bibliografía

Abad, M.J., Bermejo, P., Carretero, E., Martinez-Acitores, C., Noguera, B., Villar, A., (1996), Anti-inflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela, *Journal of Ethnopharmacology*, **55**:63-68

Abbas, A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., (2004), Inmunología celular y molecular, (5^a ed.) Madrid España: Mc-Graw Hill Interamericana, pp 577

Abbas, A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., (2002), Inmunología Celular y Molecular, (4th ed.) Madrid: Mc Graw Hill

Aderem, A., Underhill D.M., (1999), Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages, *Annual Review Immunology*, **17**:593–623

Alarcon-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Jimenez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Gonzalez-Paredes, B., Flores-Saenz, J.L., (1997), Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits, *Journal of Ethnopharmacology*, **55**:171-177

Alarcon-Aguilar, F.J., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T.R., Jasso-Villagomez, E.I., Almanza-Perez, J.C., Blancas-Flores, G., Zamilpa, A., Diaz-Flores, M., Roman-Ramos R., (2010), Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K) Cass, In estreptozotocin-induced diabetes mice, *Journal of Ethnopharmacology*, **132**:400-407

Alonso-Castro, A.J., Juárez-Vázquez, M. del C., Domínguez, F., González-Sánchez, I., Estrada-Castillón, E., López-Toledo, G., Chávez, M., Cerbón, M.A., García-Carranca, A., (2012), The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines, *Journal Ethnopharmacology*, **142**:857-64

Atal CK, Sharma ML, Kaul A, Khajuria A., (1986), Immunomodulating agents of plant origin I: Preliminary Screening, *Journal of Ethnopharmacology*, **18**:133-141

Becerra, J.X., Venable, D.L., Evans, P.H., Bowers, W., (2001), Interactions between chemical and mechanical defenses in the genus *Bursera* (*Burseraceae*), *American Zoologist*, **1**:865–986

Bogdan, C., (2001), Nitric oxide and the immune response, *Nature immunology*, **2**:907-916

Bogdan C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A., (2000), Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity, *Current Opinion in Immunology*, **12**:64–76

Bohlmann, F., Zdero, C., Grenz M., (1977), Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 78. Weitere Inhaltsstoffe aus südafrikanischen Senecio-Arten, *Chemische Berichte*, **110**:474-486

Bye, R., Linares E., Estrada, E., (1995), Biological diversity of medicinal plants in México. Chapter four. In: JT Arnason y colaboradores (Eds) *Phytochemistry of medicinal plants*, Plenum Press, New York. pp. 65

Carretero, M.E., Lopez-Perez, J.L., Abad, M.J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., Noguera-P, B., (2008), Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, **116**:11-15

Cerda-Lemus, M. E., (2011), La familia Burseraceae en el estado de Aguascalientes, México, *Acta Botánica Mexicana*, **94**:1-25

Chaplin, D. D., (2006), Overview of the human immune response, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **117**:S430-S435

Chaplin, D. D., (2010), Overview of the immune response, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**:S3-23

Chen, J.-R., Yang Z.-Q., Hu, T.-J., Yan Z.-T., Niu T.-X., Wang, L., Cui D.-A., Wang, M., (2010), Immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharide from *Potentilla anserina*, *Fitoterapia*, **81**:1117–1124

Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Hahm, K.S., Jeong, H.G., (2001) Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*, *Cancer Letters*, **166**:17-25

Correa, J., Romo, J., (1966), The constituents of *Cacalia decomposita*. A. Gray. Structure of matorin, matorinin, matoron, and matorinone. *Tetrahedron*, **22**: 685-691

Cutler, R.R., (2003), The immune system and some natural agents that may help it fight disease, *British Journal of Clinical Pharmacology*, **2**:6

Dossaji, S.F., Becker, H., Exner, J., (1983), Flavone c-glycosides of *Phoradendron tomentosum* from different host trees, *Phytochemistry*, **22**:311-312

Fernández, T., Wagner, M.L., Varela, B.G., Ricco, R.A., Hajos, S.E., Gurni, A.A., Alvarez, E., (1998), Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R.et P.) Tiegh. (Loranthaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, **62**:25-34

Franco-Molina, M., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Castillo-Leon, L. Rodríguez-Padilla, C., (2003), *In vitro* Immunopotentiating Properties and Tumour Cell Toxicity Induced by *Lophophora williamsii* (Peyote) Cactus Methanolic Extract, *Phytotherapy Research*, **17**:1076–1081

Garduño-Ramírez, M.L., Trejo, A., Navarro, V., Bye, R., Linares, E., Delgado, G., (2001), New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*, *Journal of Natural Products*, **64**:432-435

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J., (2004), *Inmunología* (5^a ed.) México: Mc-Graw Hill Interamericana. pp450

Gomez-Flores, R., Verástegui-Rodríguez, L., Quintanilla-Licea, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R. and Rodríguez-Padilla, C., (2008), *In vitro* rat lymphocyte proliferation induced by *Ocimum basilicum*, *Persea americana*, *Plantago virginica*, and *Rosa* spp. Extracts, *Journal of Medicinal Plants Research*, **2**:005-010

Greenberg, S., y Grinstein, S., (2002). Phagocytosis and innate, *Immunity Current Opinion in Immunology*, **14**:136–145

Green, L.C., Luzuriaga, K.R., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R.,(1981), Nitrate biosynthesis in man, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, DC)*, **78**:7764-7768

Hai-Shun, X., Yuan-Wen, W., Shi-Fang, X., Hong-Xiang, S., Feng-Yang, C., Li, Y., (2009), Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*, *Journal of Ethnopharmacology*, **125**:310–317

Hirotsu, T., Toshihiro, M., Makoto, I., Keisuke, T., (2001), Adoptive immunotherapy for malignant brain tumours using human peripheral blood mononuclear cells activated by the streptococcal preparation OK-432. *Neurologia Medico-Chirurgica*, **41**:387-92

Hostanska, K., Hajto, T., Spagnoli, G., Fiher, J., Lentzen, H., Herrman, R.A., (1995), Plant Lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood nononuclear cells, *Natural Immunity*, **14**: 295-304

Huacuja, R.L., Delgado, N.M., Carranco, L.A., Reyes, L.R., Rosado, G.A, (1990), Agglutination and immobilization activity of ethanolic extract from *Bursera fagaroides* upon human and other mammal spermatozoa, *Archivos de Investigación Médica (México)*, **21**:393-398

Inman, D.W., Luo, J., Jolad, S.D., King, S.R., Cooper, R., (1999), Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*, *Journal of Natural Products*, **62**:1088–1092

Jacobo-Salcedo, M.d.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Álvarez, C., Gonzalez-Espindola, L.A., Dominguez, F., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Lujan, C., Gonzalez-Martinez, M.d.R., Gomez-Sanchez, M., Estrada-Castillon, E., Zapata-Bustos, R., Medellin-Milan, P., Garcia-Carranca, (2011), Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants, *Natural Product Communications*, **6**:1925-1928

Jean-Paul D.V. H., Delignat, S., Bayry, J., Kazatchkine, M.D., Bruneval, P., Nicoletti, A., Kaveri, S.V., (2006), Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma, *Cancer Letters*, **243**:32–37

Jimenez, M., Lozano, C., Valdes, M.J., Leon, J.R., Alarcon, G., Sveshtarova, B., (1992), Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados, *Revista Latinoamericana de Química*, **22**:14-17

Jiong-Ran, C. Zhi-Qiang, Y., Ting-Jun ,H., Zuo-Ting ,Y., Ting-Xian, N., Wang L., Dong-An, C., Wang, M., (2010), Immunomodulatory activity in vitro and in vivo of polysaccharide from *Potentilla anserine*, *Fitoterapi*, **81**:1117–1124

Khwaja, T.A., Dias, C.B., (1986), Pentecost S: recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids, *Oncology*, **43**:42-50

Kim SH, Shin TY (2005), Amomum xanthiodes inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production, *Experimental Biology and Medicine*, **230**:681-687

Krasovskaya, N.P., Kulesh, N.I., Denisenko, V.A., (1989) Natural antioxidants. Furanoeremophilane from *Cacalia* roots; *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **5**:643–646

Kuklinski C., (2003), Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, España, Ediciones OMEGA

Licciardi, P. V., Underwood, J. R., (2011), Plant-derived medicines: A novel class of immunological adjuvants, *International Immunopharmacology*, **11**:390–398

Linares, D., Bye, R., Flores, B., (1999), Plantas Medicinales de México usos remedios y tradiciones, *Instituto de Biología*, UNAM, pp.155

Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A., Manosroi J., (2003) Immunomodulatory activities of *Clausena excavate* Burm. f. wood extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, **89**:155–160

Mocellin, S., (2005), Cancer vaccines: the challenge of developing an ideal tumour killing system, *Frontiers in Bioscience*, **10**:2285-2305

Otsuki, N., Dang, N.H., Kumagai, E., Kondo, A., Iwata, S., Morimoto C., (2010), Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects, *Journal of Ethnopharmacology*, **127**:760–767

Oviedo Chávez, I., Ramírez Apan, T., Martínez-Vázquez, M.,(2005), Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes, *Journal Pharmacy and Pharmacolog*, **57**:1–5

Parkin, J., Cohen B., (2001), An overview of the immune system, *Lancet*, **357**: 1777-1789

Patwardhan, B., Gautam, M., (2005), Botanical immunodrugs: scope and opportunities, *Drug Discovery Today*, **10**:495-502

Puebla-Pérez, A.M., Huacuja-Ruiz, L., Rodríguez-Orozco, G., Villaseñor-García, M.M., Miranda-Beltrán, M. L., Celis, A., Sandoval-Ramírez, L., (1998), Cytotoxic and Antitumour Activity from *Bursera fagaroides* Ethanol Extract in Mice with L5178Y Lymphoma, *Phytotherapy Research*, **12**:545–548

Ramirez-Emiliano, J., Flores-Villavicencio, L. L., Segovia, J., Arias-Negrete, S., (2007), Participación del oxido nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano, *Medicina*, **67**:167-176

Rios, M. Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco J. L., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vazquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S., (2012), Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *Ex vivo* and in silico studies, *Fitoterapia*, **83**:1023-1029

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., (2003), *Inmunología* (5^aed.) Madrid España: Hancourt, pp 423

Rojano-Vilchis, N., Hernández-Ortega, S., Jimenez-Estrada, M., Torres-Avilez, A., (2012), Crystal Structure of Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) (matarique). *X-ray Structure Analysis Online*, **28**: 75-77

Rojas-Sepulveda, A.M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M.Y., Salas-Vidal E., Marquina, S., Villarreal, M.L., Puebla, A.M., Delgado, J.I., Alvarez, L., (2012), Cytotoxic Podophyllotoxin Type-Lignans from the Steam Bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*, *Molecules*, **17**:9506-9519

Rojas-Espinosa, O., Arce-Paredes, P., (2003), Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte, Asociación Mexicana de *Bioquímica clínica*, **28**:19-28

Romo, J., Joseph-Nathan, P., (1964), The constituents of *Cacalia decomposita*. A. Gray, Structures of cacalol and cacalone, *Tetrahedron*, **20**:2331–2337

Rosas-Arreguín, P., Arteaga-Nieto, P., Reynoso-Orozco, R., Villagómez-Castro, J. C., Sabanero-López, M., Puebla-Pérez, A. M., Calvo-Méndez C., (2008), *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*, *Experimental Parasitology*, **119**:398-402

Rzedowski, J., (1978), Vegetación de México. México DF, Limusa

Rzedowski, J., y Calderón De Rzedowski G., (2011), Flora del bajío y de regiones adyacentes, *Instituto de Ecología, A.C.* Fascículo 170

Salim, A. A., Chin, Y.-W. and Kinghorn, A. D., (2008) Chapter 1 Drug Discovery from Plants, *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, **93**:1-24

Sánchez, C., Gupta, M., Santana, A.I., (2002), Actividad inmunomoduladora de las plantas (I), *Revista de Fitoterapia*, **2**:151-163

Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., Tubaro, A., (2002), Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants, *Journal of Ethnopharmacology*, **81**:211-215

Takeda M, Mori F, Yoshida A, Takamiya A, Nakagomi S, Sato E, Kiyama H. (2001), Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats, *Diabetology*, **44**:1043-1050

Twycross, J., Aickelin, U., (2010), Information fusion in the immune system, *Information Fusion*, **11**:35-44

Varela, B. G., Varela, Fernández, T., Ricco, R. A., Zolezzi, P. C., Hajos, S. E., Gurni, A. A., Alvarez E., Wagner, M. L., (2004), *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies, *Journal of Ethnopharmacology*, **94**:109-116

Weifa, Z., Gao, X., Chen, C., Tan, R., (2007), Total flavonoids of *Daphne genkwa* root significantly inhibit the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL6 mice, *International Immunopharmacology*, **7**:117–127

WHO (2004), WHO issues guidelines for herbal medicines, *Bulletin of the World Health Organization*, **82**:238

Yamada, H., (1991), Natural products of commercial potential as medicines, *Current Opinion in Biotechnology*, **2**:203-210

Internet:

Smith, D. G., Noviembre 2003, *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnston subsp. *Serotinum*, Bombay Hook National Wildlife Refuge, Copyright David G. Smith. Fuente: <http://www.delawarewildflowers.org/plant.php?id=1437>

Psacalium spp., SEINet Southwest Environmental Information Network, Fuente: <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=Psacalium+peltatum>