



Universidad Autónoma de Sinaloa  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas



*Doctorado en Ciencias Biomédicas*

**“Actividad inmunomoduladora y antioxidante *in vivo* de las melaninas solubles del fruto de *Randia echinocarpa* (papache)”**

**TESIS**

Que presenta

**M en C María del Rosario Gil Avilés**

Como requisito para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Directores

**Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho**

**Dr. Francisco Delgado Vargas**

Culiacán de Rosales, Sinaloa, México; Marzo de 2020.



## **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

### **CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Culiacán de Rosales el día 24 del mes Marzo del año 2020, el (la) que suscribe María del Rosario Gil Avilés alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con número de cuenta 0607597-5, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Francisco Delgado Vargas y Dra. Sylvia Páz Díaz Camacho y cede los derechos del trabajo titulado "Actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vivo* de las melaninas solubles del fruto de *Randia echinocarpa* (papache)", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

  
María del Rosario Gil Avilés

Nombre completo y firma

## **PRESENTACIÓN**

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms” y la Unidad de Servicios Farmacéuticos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en Culiacán, Sinaloa.

## *DEDICATORIAS*

A mi familia.

A mi madre y padre, mi esencia.

A mi hermana, mi amiga y compañera de vida.

A mi Yaya, mi ejemplo incuestionable de fortaleza.

A César Joel, my wonderwall.

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS); en especial al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, por permitirme ser parte de esta honorable institución y por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto (A1-S-32946) y por la beca de doctorado.

Al Programa de Fomento y Apoyo a Proyecto de Investigación de la UAS, por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto (PROFAPI-UAS).

Al Laboratorio Multidisciplinario de Caracterización de Nanoestructuras y Materiales del Instituto Politécnico Nacional por el análisis por Resonancia Magnética Nuclear.

A mis directores de tesis, la Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho, por brindarme su apoyo y la oportunidad de crecer profesional y personalmente; y el Dr. Francisco Delgado Vargas, por la dedicación que mostró en el proceso y por todos los conocimientos compartidos; mi total agradecimiento hacia ustedes.

A los integrantes del comité evaluador: Dr. Julio Montes Ávila, Dr. Ulises Osuna Martínez y Dr. Rodolfo Bernal Reynaga, por su disposición e interés, por el soporte técnico brindado y por las sugerencias que contribuyeron enormemente a la mejora del proyecto, muchas gracias.

A la Dra. Gabriela López Angulo por compartir su experiencia, así como por el apoyo técnico y moral.

Al Dr. Leopoldo Flores Romo por recibirme en su laboratorio y compartir su experiencia y conocimiento con gran generosidad.

A la Dra. Edith Marcial Juárez por el apoyo técnico en el procesamiento de muestras y datos obtenidos por citometría de flujo.

Al Dr. Elvic Noguera por su valioso apoyo para la realización de las histologías de tejido hepático.

A mis padres, Charito y Baltazar, gracias por confiar en mí y por todo ese inmenso amor... Gracias a mi hermana Célida, por ser la mejor compañera de vida.

A mi Yaya, siempre en mi corazón, por el amor y la fortaleza. Por tanto..., gracias.

A César Joel, por darme el ánimo y apoyo necesarios para seguir, por acompañarme en cada detalle, por la paciencia y por todo el amor.

A toda mi familia, Gil y Avilés, por su apoyo. Hago presente mi gran afecto hacia ustedes.

A mi Lucas por todos los abrazos y ronchas sanadoras.

A mis amigas y compañeras de café: Perla, Sofi, Alma Luz y Anayanci, gracias por hacer tan agradable la estancia en el laboratorio; a Belí y Gisela, por el gran apoyo que representan; y gracias a Sandra, por la disposición y el apoyo, pero sobre todo por la amistad y por permitirme ser tía de Natalia.

A todos mis compañeros del LQPN: Manuel, Pedro, Wendy, Alma, Maritza, Mariana, Sara, Alejandro, ... gracias a todos por su apoyo y por los momentos compartidos.

Gracias a todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo y a todos los que hacen que esto valga la pena, gracias a ti por leer esto.

# ÍNDICE GENERAL

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	IX
<b>I RESUMEN</b> .....	1
<b>II ABSTRACT</b> .....	2
<b>III INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>IV REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
4.1    Uso de productos naturales con propiedades terapéuticas.....	5
4.1.1    Actividad inmunomoduladora.....	7
4.1.2    Actividad antioxidante.....	16
4.2    Sinaloa, estado rico en biodiversidad florística.....	21
4.3    Papache ( <i>Randia echinocarpa</i> ).....	22
4.3.1    Generalidades botánicas.....	22
4.3.2    Aplicaciones.....	23
4.4    Melaninas.....	23
4.4.1    Características generales.....	24
4.4.2    Actividades biológicas de las melaninas.....	25
4.5    Antecedentes.....	29
4.5.1    Compuestos con actividad biológica en el fruto de papache.....	30
4.5.2    Actividades biológicas de melaninas.....	30
4.5.3    Melaninas solubles en el fruto papache.....	36
<b>V JUSTIFICACIÓN</b> .....	37
<b>VI HIPÓTESIS</b> .....	38
6.1    Hipótesis.....	38
<b>VII OBJETIVOS</b> .....	39
7.1    Objetivo general.....	39
7.2    Objetivos específicos.....	39
<b>VIII MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	40
8.1    Material vegetal.....	40
8.2    Preparación de melaninas solubles.....	40
8.2.1    Extracción de melaninas crudas.....	40
8.3    Purificación de melaninas solubles.....	41
8.4    Características estructurales de melaninas solubles.....	41
8.4.1    Resonancia magnética nuclear <sup>13</sup> C en estado sólido.....	41
8.4.2    Análisis elemental.....	42
8.5    Estudio del efecto inmunomodulador de melaninas solubles.....	42
8.5.1    Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i> .....	42
8.5.2    Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i> .....	43
8.6    Estudio de la actividad antioxidante de melaninas.....	46
8.6.1    Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	46
8.6.2    Actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	47
8.7    Estudio de toxicidad de las melaninas solubles papache.....	53
8.7.1    Evaluación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) por método de Lorke.....	53

8.7.2	Evaluación de toxicidad sub-aguda .....	56
8.8	Análisis estadístico .....	57
<b>IX</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
9.1	Rendimiento de las melaninas solubles .....	58
9.2	Características estructurales de melaninas solubles.....	58
9.2.1	Resonancia Magnética Nuclear (RMN) <sup>13</sup> C en estado sólido .....	58
9.2.2	Análisis elemental .....	60
9.3	Actividad inmunomoduladora de las melaninas solubles.....	60
9.3.1	Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i> .....	60
9.3.2	Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i> .....	60
9.4	Actividad antioxidante de las melaninas solubles .....	63
9.4.1	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	63
9.4.2	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	63
9.5	Estudio de toxicidad de las melaninas solubles de papache .....	74
9.5.1	Evaluación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) por el método de Lorke .....	74
9.5.2	Evaluación de toxicidad sub-aguda .....	74
<b>X</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>79</b>
10.1	Rendimiento de las melaninas solubles .....	79
10.2	Características estructurales de melaninas solubles.....	79
10.2.1	Resonancia Magnética Nuclear (RMN) <sup>13</sup> C en estado sólido .....	79
10.2.2	Análisis elemental .....	80
10.3	Actividad inmunomoduladora de las melaninas solubles.....	80
10.3.1	Actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i> .....	80
10.3.2	Actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i> .....	82
10.4	Actividad antioxidante de las melaninas solubles .....	85
10.4.1	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	85
10.4.2	Actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	86
10.5	Estudio de toxicidad de las melaninas solubles de papache .....	91
10.5.1	Evaluación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) por el método de Lorke .....	91
10.5.2	Evaluación de toxicidad sub-aguda .....	92
<b>XI</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>95</b>
11.1	Conclusión general .....	95
11.2	Conclusiones específicas .....	95
<b>XII</b>	<b>LIMITACIONES</b> .....	<b>96</b>
<b>XIII</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>97</b>
<b>XIV</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>119</b>
14.1	Perspectivas .....	119
14.2	Productos .....	119
<b>XV</b>	<b>SIGLAS Y ABREVIACIONES</b> .....	<b>122</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$ en estado sólido de las melaninas solubles de papache (MSP).....	59
<b>Figura 2.</b> Efecto <i>in vitro</i> de las melaninas solubles de papache (MSP) en la proliferación de esplenocitos.....	61
<b>Figura 3.</b> Efecto de la administración oral en ratones de las melaninas solubles de papache (MSP) en la proliferación de esplenocitos.....	62
<b>Figura 4.</b> Efecto de administración oral de melaninas solubles de papache (MSP) en el porcentaje celular de linfocitos T (LT), linfocitos T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ ) y linfocitos B (LB) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN) y Placas de Peyer (PP) de ratón BALB/c. ....	64
<b>Figura 5.</b> Efecto de administración oral de melaninas solubles de papache (MSP) en la activación de linfocitos B (LB), linfocitos T (LT) y linfocitos T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ ) en Placas de Peyer (PP) y Ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN) de ratón BALB/c. ....	65
<b>Figura 6.</b> Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) (33 mg/kg) en los niveles séricos de enzimas hepáticas de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). ....	67
<b>Figura 7.</b> Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) en los niveles de glutatión reducido (GSH) de tejido hepático de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA).....	68

**Figura 8.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) en niveles de malondialdehído (MDA) en tejido hepático de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). .....69

**Figura 9.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) sobre la morfología hepática de la estructura porta de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). .....71

**Figura 10.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) sobre la morfología hepática de la vena central de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). .....72

**Figura 11.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) sobre la morfología hepática de parénquima de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA)...73

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Sistema de puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre Esteatosis No Alcohólica (EHNA).....	55
<b>Cuadro 2.</b> Efecto tóxico sub-agudo en la ganancia de peso corporal y relación de peso órgano/peso corporal de ratones BALB/c tratados con melaninas solubles de papache (MSP) (500 mg/kg de peso corporal) por 30 días. ....	76
<b>Cuadro 3.</b> Efecto tóxico sub-agudo en parámetros hematológicos y bioquímicos de ratones BALB/c tratados con melaninas solubles de papache (MSP) (500 mg/kg) durante 30 días.....	78

## I RESUMEN

*Randia echinocarpa* forma parte de la biodiversidad florística de Sinaloa, donde comúnmente se le conoce como papache. El fruto de papache es utilizado tradicionalmente para el tratamiento/prevenición de diversas patologías, aunque la mayoría de dichas funciones no se han demostrado científicamente. La pulpa del fruto es oscura y contiene melaninas a las que se atribuyen actividades biológicas como la antioxidante e inmunomoduladora. Las melaninas han sido escasamente estudiadas debido a su baja solubilidad. Al respecto, recientemente se demostró que este fruto contiene melaninas solubles que presentan actividad antioxidante e inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*. Esta investigación busca proporcionar información que sustente el potencial nutracéutico del fruto de papache. En este contexto, el *objetivo* del presente trabajo fue determinar la actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vivo* y la inocuidad de las melaninas solubles del fruto de papache (MSP). En este estudio, las MSP se caracterizaron por análisis elemental (C  $48.260 \pm 0.011\%$ , N  $3.693 \pm 0.009\%$  y H  $6.093 \pm 0.076\%$ ) que fue consistente con la presencia de anillos aromáticos y eumelaninas; también se reportó el espectro de NMR  $^{13}\text{C}$  en estado sólido y las señales indican la interacción de melanina con carbohidratos y ácidos orgánicos. Las MSP (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ) incrementaron la proliferación de esplenocitos *in vitro* (24.1% - 57.25%), efecto similar al de los mitógenos fitohemaglutinina (PHA) y lipopolisacárido (LPS). Al ser ingeridas por ratones BALB/c, las MSP también aumentaron la proliferación de esplenocitos, el efecto a 100 mg/kg de peso fue significativamente superior al control negativo y similar al efecto del LPS; además, mediante citometría de flujo se determinó que las MSP (100 mg/kg) ingeridas por ratones activan a los linfocitos T  $\gamma\delta$  de los ganglios linfáticos del mesenterio. Por otro lado, los estudios hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de ratas alimentadas con MSP (33 mg / kg, i.p.) durante 5 días mostraron una reducción significativa de la toxicidad del  $\text{CCl}_4$ : hubo mejora en los marcadores séricos de daño hepático (ALT, MDA y GSH) y protección en las estructuras del tejido hepático. Finalmente, las MSP presentaron inocuidad en ratones BALB/c: toxicidad aguda,  $\text{LD}_{50} > 5 \text{ g / kg}$ ; y toxicidad sub-aguda, sin letalidad a dosis de 500 mg / kg por 30 días. En conclusión, las MSP presentan actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vivo* y son inocuas; por lo tanto, podrían usarse como ingredientes seguros en la formulación de alimentos, suplementos funcionales y agentes fitoterapéuticos.

**Palabras clave:** *R. echinocarpa*, inmunomodulador, antioxidante, inocuidad, actividades *in vivo*, melaninas solubles.

## II ABSTRACT

*Randia echinocarpa* is part of the floristic biodiversity of Sinaloa, where it is known as papache. Papache fruit is traditionally used for the treatment/prevention of various pathologies, although most of such activities have not been demonstrated scientifically. The fruit pulp is dark and contains melanins that showed biological activities such as antioxidant and immunomodulatory. Melanins have been scarcely studied due to their low solubility. In this regard, it was recently demonstrated papache fruit contains soluble melanins that exhibit antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities *in vitro*. This research seeks to provide information that supports the nutraceutical potential of the papache fruit. In this context, the present work *aimed* to determine the *in vivo* antioxidant and immunomodulatory activities and the innocuity of the soluble melanins of papache fruit (MSP). In this study, the MSP were characterized by their elemental composition (C  $48.260 \pm 0.011\%$ , N  $3.693 \pm 0.009\%$  and H  $6.093 \pm 0.076\%$ ) that was consistent with the presence of aromatic rings and eumelanins; the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum was also reported and the signals showed the melanin-bonding with carbohydrates and organic acids. The MSP (100-200  $\mu\text{g/mL}$ ) increased splenocyte proliferation *in vitro* (24.1% - 57.25%), as that registered with the phytohemagglutinin (PHA) and lipopolysaccharide (LPS) mitogens. The BALB/c mice fed with MSP (100 mg/kg of body weight) showed also an increased splenocyte proliferation that was significantly greater than that of the negative control and similar to that of the LPS; these mice also showed activation, by flow cytometry, of the lymphocytes T  $\gamma\delta$  in the lymph nodes of the mesentery. On the other hand, hematological, biochemical and histopathological studies of rats treated with MSP (33 mg/kg i.p.) for 5 days showed a significant reduction in the  $\text{CCl}_4$  toxicity: there was an improvement in serum markers of liver damage (ALT, MDA and GSH) and protection in liver tissue structures. Finally, MSP were innocuous in BALB/c mice: acute toxicity,  $\text{LD}_{50} > 5$  g/kg; and sub-acute toxicity, without lethality at doses of 500 mg/kg for 30 days. In conclusion, MSP show antioxidant and immunomodulatory activities *in vivo* and are innocuous; thus, MSP could be used as safe ingredients in the formulation of foods, functional supplements, and phytotherapeutic agents.

**Keywords:** *R. echinocarpa*, immunomodulatory, antioxidant, innocuity, *in vivo* activities, soluble melanins.

### III INTRODUCCIÓN

La variabilidad de clima y las condiciones geográficas de Sinaloa están acorde con su alta diversidad florística; el estado cuenta con aproximadamente 3800 especies de plantas entre las que se encuentra el papache (*Randia echinocarpa*). Esta planta ha sido utilizada de manera empírica por diferentes poblaciones como un remedio para enfermedades renales, pulmonares y circulatorias, así como también para el tratamiento de diabetes, cáncer, malaria y úlceras (Bye y col., 1991). Las características químico-biológicas de extractos del papache han mostrado que posee propiedades nutracéuticas. Santos-Cervantes y col. (2007) reportaron que el papache presenta actividad antimutagénica asociada a su contenido de  $\beta$ -sitosterol y de los ácidos palmítico y linoleico; asimismo, se ha registrado que el fruto posee propiedades antioxidantes y antitumorales (Cano-Campos y col., 2011); en conjunto, esta información sugiere el potencial del fruto como agente anticarcinogénico. Otro estudio estableció que melaninas del fruto de papache alteran la respuesta inmune al promover la proliferación de esplenocitos de ratón (Serrano-Silvas, 2013); en este contexto, Montes-Avila y col. (2018) demostraron que las melaninas de papache presentaron actividad inmunomoduladora *in vitro* y actividad antioxidante celular contra el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

Las melaninas de fuentes naturales poseen un amplio espectro de actividades biológicas que incluye la protección contra la radiación UV, lisis enzimática, daño por oxidantes, resistencia de patógenos a drogas y protección de insectos contra bacterias y virus (García-Borrón y Solano, 2002; Ortonne, 2002); además, confieren mayor rigidez a las semillas en

plantas y cutículas de los insectos; asimismo se ha demostrado que actúan como quelantes de iones metálicos y como agentes redox (Riley, 1997). Sin embargo, las melaninas han sido poco estudiadas debido a su baja solubilidad en solventes comúnmente utilizados en los laboratorios de experimentación. Recientemente, en frutos silvestres de Sinaloa, entre los que se incluye el papache, se identificaron melaninas solubles en agua y se demostró su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa y antioxidante *in vitro* (Cuevas-Juárez y col., 2014). En este orden de ideas, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vivo* de las melaninas solubles del papache (*Randia echinocarpa*) y su inocuidad. Los resultados de esta investigación servirán de base para establecer estrategias para su aprovechamiento sustentable y favorecerán el incremento en el aprecio de esta planta nativa de Sinaloa.

## IV REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Uso de productos naturales con propiedades terapéuticas

La medicina alternativa se ha descrito como un “diagnóstico, tratamiento y/o prevención que complementa la medicina convencional contribuyendo un todo común, satisfaciendo la demanda no conocida por la ortodoxia o diversificando el concepto del marco de la medicina” (Martínez-Sánchez y col., 2016). En la década de los 80’s, el 80% de la población mundial recurría principalmente al empleo de extractos o principios activos de las plantas para atender sus necesidades primarias de asistencia médica (OMS, 1993). En contraste, en épocas recientes, la medicina alternativa se ha asociado principalmente al aspecto preventivo de enfermedades y más del 50% de los usuarios de plantas medicinales no son enfermos (Engel y Straus, 2002).

En la antigüedad las tribus dependían completamente de las plantas debido a que eran fuente de alimento y usadas para el tratamiento de enfermedades, contribuyendo significativamente a mantener un estilo de vida saludable (Agyare y col., 2019). Los reportes etnobotánicos brindan información abundante sobre plantas medicinales (*e.g.*, *Phyllanthus amarus*, *Lauca aspera*) que han sido o son utilizadas desde tiempos remotos para el tratamiento de diferentes patologías humanas que van desde fiebres hasta el cáncer (Murugan y col., 2013). Por ejemplo, evidencia del año 5000 AC en la India muestra el uso de especies vegetales aromáticas (*e.g.*, *Thymus vulgaris*) para tratar infecciones respiratorias; papiros egipcios plasman el uso del ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) como antisépticos; los aztecas aplicaban el jugo de maguey (*Agave atrovirens*) para curar heridas; y el Códice Badiano registra



el uso del cacalosúchil (*Plumeria acutifolia*) y del chile (*Capsicum annum*) para tratar la disentería, heridas y bronquitis (Cabrera y col., 2005; Agyare y col., 2019).

Actualmente, el estilo de vida moderno está caracterizado por el aumento del estrés y el consumo desmedido de comida rápida, con alto contenido de grasa y deficiente en macro y micronutrientes; esto ha repercutido en altas prevalencias de enfermedades crónico degenerativas y en la necesidad de retomar conceptos como “que la medicina sea tu alimento y el alimento tu medicina”. Las enfermedades crónico degenerativas son un problema de salud pública y un reto muy importante para los humanos; incluso con el descubrimiento de nuevos fármacos, su asequibilidad es una de las principales limitantes en países en vías de desarrollo (Murugan y col., 2013; Yahfoufi y col., 2018). En este sentido, las plantas medicinales constituyen un reservorio inagotable para descubrir y aislar componentes químicos eficaces para mantener y restablecer la salud humana (Ayoub y Mehta, 2018), lo que conlleva a una creciente demanda de medicamentos herbarios, productos naturales y metabolitos secundarios de plantas medicinales (Chen y col., 2016).

Actualmente, se estima que existen 80,000 especies de plantas aún por descubrir y para protegerlas se requieren estrategias que demuestren su papel ecológico y sus beneficios a la salud humana. En este aspecto, el primer desafío es acelerar el descubrimiento de estas plantas y caracterizar sus componentes químicos y actividades biológicas (Krause y Tobin, 2013; Tan y col., 2019). Las plantas contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividades biológicas: *e.g.*, fenoles, flavonoides, glucósidos cianogénicos, saponinas, ácidos grasos y fibra dietaria (Liu y col., 2000; Pío-León y col., 2012; Ayoub y Mehta, 2018). Algunas de las actividades biológicas más estudiadas de componentes de plantas son la antioxidante, antiinflamatoria, antimutagénica, antitumoral, inmunoestimuladora, antimicrobiana,

antihipertensiva y antihiperглиcemiante (Liu y col., 2000). A continuación, se describe la importancia de las actividades inmunomoduladora y antioxidante en el abordaje terapéutico natural.

#### **4.1.1 Actividad inmunomoduladora**

##### 4.1.1.1 Sistema inmune

El sistema inmunológico protege y mantiene la integridad del organismo ante cualquier ataque de agentes patógenos; entre sus principales funciones se encuentran la capacidad de respuesta, el reconocimiento de lo propio y lo extraño, especificidad y memoria (Sethi y Singh, 2015). Para llevar a cabo todas sus funciones, el sistema inmunitario se compone de diversos órganos y tejidos que generan una enorme variedad de células y moléculas que actúan en conjunto en una red dinámica para reconocer y eliminar de manera específica a los invasores extraños (Owen y col., 2014).

La respuesta inmune se presenta de dos maneras, la inmunidad innata e inmunidad adaptativa o adquirida. La respuesta innata se refiere a la primera línea de defensa frente a la entrada de microorganismos, es poco específica, no genera memoria y está constituida por mecanismos de defensa que se encuentran instaurados incluso antes de que se genere la infección, como barreras anatómicas y fisiológicas; en este tipo de respuesta participan macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos, las células asesinas naturales (NK) y linfocitos  $\gamma\delta$ . En cambio, la respuesta adaptativa se estimula por la

exposición a los agentes extraños, es de gran especificidad y genera memoria inmunológica; asimismo, en la respuesta adaptativa participan principalmente los linfocitos (B y T) y sus productos de secreción, por ejemplo, la producción de anticuerpos por los linfocitos B (Abbas y col., 2015).

A su vez, existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar microbios y agentes dañinos de distintos tipos (Owen y col., 2014; Abbas y col., 2015). La inmunidad humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos cuyas funciones principales son neutralización, opsonización y activación de complemento; éste es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas. Por otro lado, la inmunidad celular queda a cargo principalmente de la defensa contra infecciones de patógenos intracelulares capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de fagocitos y de otras células, donde los anticuerpos circulantes no son capaces de actuar. La defensa contra estas infecciones corresponde a los linfocitos T, capaces de destruir los reservorios celulares de la infección. Además, la inmunidad celular contribuye de manera importante a la eliminación de células tumorales o transformadas (Abbas y col., 2015).

#### 4.1.1.2 Principales mediadores celulares y moleculares de la respuesta inmune

El sistema inmunológico innato es más activo al iniciar una respuesta inmune y la inmunidad adaptativa se vuelve progresivamente dominante con el tiempo. Los linfocitos son células que reconocen los antígenos extraños de manera específica y responden contra ellos. Existen distintas subpoblaciones que difieren en la forma de reconocer los antígenos y en sus funciones.

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos, reconocen los antígenos extracelulares (incluso sobre su propia superficie) y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, por lo que actúan como mediadores de la inmunidad humoral. Muchos antígenos polisacáridos y lipídicos poseen múltiples determinantes antigénicos que interactuarán con sus receptores y pondrán en marcha el proceso de activación de los linfocitos B (Abbas y col., 2015).

Los anticuerpos unidos a membrana confieren especificidad antigénica en las células B; la proliferación de clonas de células B específicas es inducida por la interacción de anticuerpo de membrana con su antígeno. Los anticuerpos secretados circulan en la sangre, donde actúan como efectores de la inmunidad humoral al buscar antígenos y marcarlos para su eliminación. Todos los anticuerpos comparten características estructurales, se unen a antígeno y tienen funciones efectoras (Owen y col., 2014).

Los linfocitos T, las células de la inmunidad celular, reconocen los antígenos de los microorganismos intracelulares y sirven para destruir estos microbios o las células infectadas. Los linfocitos T  $\alpha\beta$  convencionales producen moléculas que funcionan como receptores de antígenos. Estas células presentan una especificidad restringida hacia los antígenos; sólo reconocen los de tipo peptídico después de unirse a proteínas del hospedero codificadas por los genes pertenecientes al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan sobre las superficies de las células presentadoras de antígeno (CPA). Por consiguiente, reconocen y responden a los antígenos asociados a una superficie celular pero no a los solubles. Basados en sus funciones, los linfocitos T  $\alpha\beta$  constan de distintas poblaciones, las mejor caracterizadas son los linfocitos T cooperadores ( $CD4^+$ ) y los linfocitos T citotóxicos o citolíticos ( $CD8^+$ ) (Owen y col., 2014).

Los linfocitos CD8<sup>+</sup> activados proliferan y se diferencian en linfocitos T citotóxicos (LTC) encargados de destruir las células que lleven microbios refugiados en su citoplasma. Estos microorganismos pueden ser virus que hayan infectado numerosos tipos celulares, o bacterias ingeridas por los macrófagos pero que han escapado de las vesículas fagocíticas llegando al citoplasma. Mediante la desaparición de las células infectadas, los LTC eliminan los reservorios de infección (Abbas y col., 2015).

Los linfocitos T cooperadores, helper (LTh) o CD4<sup>+</sup>, proliferan al activarse y se diferencian en células efectoras capaces de secretar una gran variedad de citocinas y, por tanto, de cumplir funciones distintas. Estas células efectoras abandonan los órganos linfáticos donde surgieron y emigran hacia los focos de infección afectados por una inflamación concomitante (Abbas y col., 2015). Dependiendo de la CPA que actúe y las señales que liberen, los linfocitos cooperadores vírgenes (Th0) que posean el receptor en la célula T (TCR) adecuado para reconocer al antígeno se estimularán y diferenciarán a linfocitos Th1, Th2, Th17 o Treg (García Hernández y col., 2009; Owen y col., 2014) principalmente. Los Th1 secretan interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), células idóneas para mostrar respuesta contra infecciones virales y otros patógenos intracelulares; los Th2 liberan IL-4, IL-5 e IL-13 y ayudan a eliminar infecciones parasitarias extracelulares, incluso las causadas por helmintos (Hong y col., 2019); los Th17, las citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22 asociadas a la inflamación de tejido y se ha registrado que evitan infecciones micóticas y bacterianas extracelulares; mientras que los Treg liberan IL-10 y TGF- $\beta$  y desempeñan un papel crucial en la tolerancia periférica al limitar la actividad de células T autoinmunitarias.

Por otro lado, los linfocitos T  $\gamma\delta$  o no convencionales juegan un papel regulador en diversas situaciones y su influencia es evidente antes de las respuestas celular o humoral; incluso

responden más rápido que las células T  $\alpha\beta$  convencionales por no requerir de expansión clonal (Born y col., 2017). A pesar de las similitudes estructurales con los TCR  $\alpha\beta$ , los TCR  $\gamma\delta$  reconocen ligandos estructuralmente más diversos y la unión del antígeno no está restringida por el MHC y tampoco requiere de procedimiento alguno para la presentación de antígeno (Zhang y col., 2010). De hecho, estas células se activan de forma similar a las que participan en la inmunidad innata, es decir, mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), tejido dañado y objetivos asociados a receptores NK (Ghaedi y col., 2019).

A diferencia de las células T  $\alpha\beta$ , las células T  $\gamma\delta$  constituyen solo una pequeña proporción (1–5 %) de los linfocitos que circulan en la sangre y los órganos periféricos de la mayoría de los animales adultos. Sin embargo, los linfocitos T  $\gamma\delta$  están más extendidos dentro de los tejidos ricos en epitelios, como la piel, el intestino y el tracto reproductivo, donde pueden alcanzar hasta el 50% de las células T. Las funciones de los linfocitos T  $\gamma\delta$  difieren según su distribución tisular, la estructura de sus receptores de antígenos, el microambiente local y de la etapa de la respuesta inmune en que se activan (Carding y Egan, 2002; Nielsen y col., 2017). En este sentido, hay dos subconjuntos principales de LT  $\gamma\delta$  en especies de mamíferos: las células V $\delta$ 2-T que se encuentran principalmente en circulación y las células V $\delta$ 1-T que son específicas de las superficies mucosas que recubren las vías respiratorias, gastrointestinales, urinarias y reproductivas. Los LT  $\gamma\delta$  circulantes tienen funciones efectoras contra patógenos invasores y células malignas y podrían migrar a sitios de infección. En cambio, la población de la mucosa ayuda a mantener la integridad de la barrera epitelial a través de la disminución de la respuesta inflamatoria y reparación del tejido dañado. Los LT  $\gamma\delta$  están en primera línea para responder a los patógenos invasores y preparar el camino para que el resto de las células efectoras del sistema inmunológico participen en la eliminación de tales patógenos (Ghaedi y col., 2019).

Los LT  $\gamma\delta$  comparten características de las células que participan en la inmunidad innata y adaptativa. Estas células producen altas cantidades de citocinas (IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), quimiocinas, factores de crecimiento; reclutan macrófagos e inducen citotoxicidad en tumores malignos al producir una variedad de quimiocinas como la perforina-granzima que median la apoptosis celular, incrementan la expansión de las células T CD8<sup>+</sup>, los monocitos y los neutrófilos, promoviendo la destrucción tumoral. Además, los LT  $\gamma\delta$  interactúan con CPA profesionales que procesan antígenos importantes para la destrucción de las células diana y tienen la capacidad de moderar o terminar la inflamación mediante la inhibición de la activación de macrófagos (Ghaedi y col., 2019).

En general, los LT  $\gamma\delta$  cumplen funciones fisiológicas que incluyen inmunidad protectora contra patógenos extracelulares e intracelulares, vigilancia y destrucción tumoral, modulación de respuestas inmunes innatas y adaptativas, así como regulación de la función fisiológica de diversos órganos (Bonneville y col., 2010).

#### 4.1.1.3 Agentes inmunomoduladores

El sistema inmunológico puede ser manipulado con fines preventivos o terapéuticos, ya sea de manera específica por inmunización activa o inmunoterapia hiposensibilizante o de forma inespecífica mediante inmunomodulación. Las sustancias inmunomoduladoras estimulan o deprimen el sistema inmunitario e incluyen compuestos químicamente definidos que se han empleado principalmente para tratar enfermedades infecciosas asociadas a inmunodeficiencias

y cuando los tratamientos antineoplásicos atentan contra el equilibrio del sistema inmunológico (García Hernández y col., 2009).

Algunas drogas se utilizan para estimular el sistema inmunológico inespecíficamente (granulocitos, macrófagos, complemento, ciertos linfocitos T y diferentes sustancias efectoras); en cambio el empleo de la inmunosupresión reduce principalmente la resistencia contra infecciones, estrés y algunos factores ambientales o quimioterapéuticos (Makare y col., 2001). Los inmunoestimulantes son inherentemente inespecíficos y mejoran la resistencia del cuerpo a las infecciones graves, inmunodeficiencias y cáncer. Como es el caso del efecto inmunomodulador y antiinflamatorio de la talidomida que se explica mediante la inducción del incremento de la relación linfocitos T CD8/CD4 por disminución de los linfocitos T cooperadores circulantes; además, la talidomida inhibe la producción de IL-1, IL-12 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Además, se utilizan interferones (*e.g.*, Intron A y Actimmune) que se unen a receptores específicos de la superficie celular para iniciar una serie de eventos intracelulares: inducción de enzimas, inhibición de la proliferación celular y mejora de la actividad inmune (Goodman y col., 2011). Por otro lado, los inmunosupresores son un grupo de fármacos estructural y funcionalmente heterogéneo que generalmente se administran combinados para tratar diversas enfermedades autoinmunes y para prevenir el rechazo de trasplantes, los glucocorticoides (*e.g.*, Dexametasona, Prednisona y Cortisol) son de los más usados y regulan la liberación de citocinas pro-inflamatorias y causan apoptosis en células activadas (Besedovsky y Del Rey, 2006). Otros inmunosupresores son los inhibidores de calcineurina que bloquean la proliferación de LT (*e.g.*, Ciclosporina A) y algunos fármacos anti-proliferativos y anticuerpos monoclonales (*e.g.*, Anti-CD3) dirigidos al bloqueo de



reconocimiento, señalización y proliferación de estirpes celulares específicas (Goodman y col., 2011).

Los fármacos inmunomoduladores se utilizan para restaurar el funcionamiento inmunológico normal; sin embargo, algunos de ellos tienen graves efectos secundarios (Sethi y Singh, 2015). Por lo tanto, la búsqueda de agentes con actividad inmunomoduladora en remedios complementarios o tradicionales se ha convertido en un campo de gran interés en el mundo (Makare y col., 2001).

#### 4.1.1.4 Plantas con propiedades inmunomoduladoras

Las plantas y sus componentes son una fuente importante de moléculas con propiedades inmunomoduladoras interesantes, un elevado número de investigaciones han demostrado la actividad y mecanismo de acción inmunomoduladora de componentes químicos naturales.

Algunas de las pruebas *in vitro* e *in vivo* utilizadas para evaluar los efectos inmunomoduladores de extractos y compuestos de plantas incluyen las siguientes: (a) proliferación de esplenocitos, macrófagos y linfocitos; (b) fagocitosis; (c) pinocitosis; (d) producción de NO y/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (e) actividad de las células NK; (f) liberación de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 y otras interleucinas; y (g) actividad enzimática lisosómica (Alonso-Castro y col., 2016).

Entre los componentes de plantas que mejoran la función inmune están algunos polisacáridos extraídos de campanilla china (*Platycodon grandiflorum*) (Yoon y col., 2003) y pétalos de cártamo (*Carthamus tinctorius*) (Ando y col., 2002) que activan macrófagos *in vitro* a través de una vía dependiente de TLR4 (Toll-like Receptor 4). Otros estudios han atribuido a

los alcaloides de la sábila (*Aloe vera*) un efecto inmunoestimulador en las respuestas humoral y celular (Manvitha y Bidya, 2014). Además, ratones alimentados con extractos de cerezas (*Prunus cerasus*) muestran un incremento en la proliferación de LB y LT (Abid y col., 2012). También se han purificado proteínas con actividad inmunomoduladora, como las de amaranto espinoso (*Amaranthus spinosus*) que actúan como inmunoestimuladores que activan directamente los LB (Lin y col., 2005); y lectinas que son de gran relevancia en el campo de investigación entre las que destacan la Concavalina A (ConA) aislada de *Canavalia ensiformis*, un mitógeno de LT que modula la respuesta inmunitaria cuando se administra *in vivo* en ratones (Suvarna y Sharma, 2018). En ese aspecto, los mitógenos de hierba carmín (PWM) obtenidos de *Phytolacca americana* y fitohemaglutinina (PHA) de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) aumentan la mitosis en varias células mononucleares de mamíferos (Verma y Babu, 1995). La bioactividad inductora mitótica de este tipo de componentes tiene una gran variedad de aplicaciones, se utilizan con frecuencia como mitógenos en el cultivo de leucocitos para estudios cariológicos y en la estimulación de los linfocitos de sangre periférica (PBL) para evaluar los efectos *in vitro* de materiales biológicamente activos (Wang y col., 2001). Además, la especificidad de estas proteínas con carbohidratos presentes en la superficie celular, las convierte en una herramienta o marcador de diagnóstico potencial en la investigación biológica (*e.g.*, biomarcador en la detección y monitoreo de enfermedades, inhibición de la adhesión y crecimiento de células cancerígenas) (Hashim y col., 2017; Suvarna y Sharma, 2018). También se ha registrado que lectinas aisladas de plantas actúan como mitógenos cuando se administran a animales o seres humanos; en estos casos, las lectinas aumentan la proliferación de células diferenciadas al acoplarse a receptores exocelulares y activar cascadas de transducción de señales; además, algunas lectinas con múltiples sitios de unión a azúcar, cuando se administran

de manera sistémica, se unen a determinadas poblaciones celulares (*e.g.*, glóbulos rojos) y las aglutinan (Wimer y Mann, 2002). Ninguno de estos efectos es aceptable como aplicación terapéutica; es por ello que para prevenir los efectos secundarios desfavorables de algunas lectinas se emplean sistemas de suministro dirigidos, como el encapsulamiento en liposomas, donde las lectinas no están expuestas al medio exterior y solo se liberan de manera intracelular. Sin embargo, incluso en tales casos, las concentraciones sistémicas de lectina residual afectan negativamente mediante la inducción de aglutinación y/o mitogénesis celular (Gieseler y col., 2012).

Por otra parte, se han caracterizado dos clases de metabolitos de plantas con efectos sobre las LT  $\gamma\delta$ : los preniltirofosfatos no proteicos inducen la proliferación de las células V $\delta$ 2-T (Morita y col., 2007) y las procianidinas de las células V $\delta$ 1-T (Holderness y col., 2007). En este contexto, experimentos *in vitro* muestran que las proantocianidinas incrementan la proliferación y activan los LT  $\gamma\delta$  (Percival, 2011). En otro estudio, los extractos de muérdago blanco (50-500 mg/ L) aumentaron la proliferación de LT  $\gamma\delta$  *in vitro* de una manera dosis-dependiente y los niveles de IL-12 (Heinzerling y col., 2006), citocina que incrementa la citotoxicidad de los LT  $\gamma\delta$  (Ghaedi y col., 2019).

#### **4.1.2 Actividad antioxidante**

La importancia de la capacidad antioxidante de los productos naturales radica en que el estrés oxidativo es un proceso biológico considerado como un factor determinante en el desarrollo de las enfermedades crónicas; el estrés oxidativo se presenta cuando la velocidad de formación de radicales libres es superior a la actividad de los sistemas biológicos para

eliminarlos. En condiciones fisiológicas normales, la homeostasis redox del organismo es mantenida por un sistema enzimático y otro no enzimático; en este último participan sustancias que se obtienen a partir de alimentos de origen vegetal, como las vitaminas E y C y otros fitoquímicos (*e.g.*, fenólicos) (Araya y col., 2006).

“Un antioxidante con función biológica se define como aquella sustancia que presente en pequeñas concentraciones, comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del mismo. Dichas sustancias pueden tener acción directa, por medio de la neutralización de los radicales libres y especies reactivas no radicales, o indirecta, a través de sistemas enzimáticos con capacidad para su neutralización” (Barbosa y col., 2008).

#### 4.1.2.1 Radicales libres y efecto del estrés oxidativo

Los radicales libres presentan un electrón o electrones desapareados en su estructura y una alta inestabilidad, son muy reactivos, de vida efímera y se combinan inespecíficamente con diversas moléculas en la célula: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez Perón y col., 2001).

Los radicales libres se generan naturalmente durante el metabolismo oxidativo y en las reacciones de producción de energía celular. El oxígeno es un radical libre vital para el metabolismo normal de un organismo; los dos electrones no apareados del oxígeno giran de forma paralela y el oxígeno se considera un birradical pero no peligroso. Otros radicales derivados de oxígeno (*e.g.*, superóxido o hidroxilos) se forman durante el metabolismo o bien por exposición a radiación ionizante y son muy dañinos (Phaniendra y col., 2015). Estos

radicales producto del estrés oxidativo generan destrucción de lípidos, proteínas y ADN de células lo que se relaciona con la aparición de patologías como cáncer, cirrosis hepática, Parkinson, arterioesclerosis, Alzheimer y diabetes, entre otras (Cichoż-Lach y Michalak, 2014).

#### 4.1.2.2 Defensa antioxidante

La oxidación de biomoléculas se favorece cuando la producción de radicales libres y/o especies reactivas de oxígeno supera la capacidad de acción de los antioxidantes; esta condición genera marcadores de estrés oxidativo que pueden ser identificados y cuantificados basándose en el análisis de la oxidación de lípidos y proteínas, principalmente (Barbosa y col., 2008).

Los sistemas biológicos están equipados con diferentes enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) que juegan un rol esencial en la eliminación de radicales libres y protección de las membranas celulares. Las SOD son metaloenzimas antioxidantes que catalizan la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. Por su parte, la CAT es una oxidoreductasa que convierte el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua. El glutatión (GSH) es un tripéptido que participa en la inactivación del  $H_2O_2$  y de hidroperóxidos orgánicos (R-O-O-H) mediante la intervención de la GPx (Gershwin y col., 2004).

Otro sistema de defensa contra los radicales libres son los antioxidantes de origen dietético, entre los cuales destacan vitaminas, minerales y polifenoles. Así, el  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno (precursores de las vitaminas E y A, respectivamente), así como el ácido ascórbico (vitamina C) son sustancias con gran potencial antioxidante. Otros carotenoides dietarios

también muestran actividad antioxidante (*e.g.*, licopeno y luteína). Entre los minerales destacan el zinc, cobre, selenio y manganeso por su participación como cofactores de enzimas antioxidantes importantes en mantener la homeostasis redox (Barbosa y col., 2008).

El consumo adecuado de antioxidantes dietarios protege las células contra el estrés oxidativo y previene el daño de las células inmunes; por el contrario, el consumo insuficiente puede conducir a una inmunosupresión profunda e incrementar la predisposición a infecciones y el riesgo de sepsis (Puertollano y col., 2011).

#### 4.1.2.3 Plantas con propiedades antioxidantes

Las plantas poseen metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas benéficas para los humanos; algunos de estos fitoquímicos actúan como potentes antioxidantes que pueden prevenir o contrarrestar los efectos dañinos ocasionados por los radicales libres producidos en el organismo (Murugan y col., 2013). Los fitoquímicos pueden ser extraídos y concentrados como extractos, aceites esenciales o resinas. Como ejemplo, algunas plantas de la familia Labiatae (*Lamiaceae*) como el orégano, romero, tomillo y albahaca contienen altas concentraciones de fenólicos antioxidantes (Chen y col., 2007). Además, se ha encontrado que algunas hierbas como la manzanilla, espino y cedrón mejoran la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y CAT, de manera dependiente de la dosis, mejoran la viabilidad celular y generan efectos protectores ante el estrés oxidativo (Brewer, 2011).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante. Una de las estrategias más aplicadas es el empleo de sustancias cromógenas de naturaleza radical, los antioxidantes

inactivan el radical y el cambio de color registrado es proporcional al efecto antioxidante (Kuskoski y col., 2005). Algunos de los métodos más aplicados son el del radical ácido 2,2'-azino-*bis*-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS) y el ensayo del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). El ABTS es un radical libre generado tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica y se ha utilizado para detectar la capacidad de flavonoides y fenólicos para eliminar radicales (Shalaby y Shanab, 2013). El método de FRAP mide la capacidad de reducción de la 2,4,6-tripiridiltriazina férrica (TPTZ) a un producto coloreado (Benzie y Szeto, 1999).

La actividad antioxidante de una mezcla de compuestos no se determina solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, depende de las condiciones en que se encuentran los compuestos y de si existe interacción entre ellos para producir efectos sinérgicos o inhibitorios.

Los ensayos *in vitro* antes mencionados tienen el inconveniente de realizarse en condiciones muy diferentes a las fisiológicas y es pertinente la realización de ensayos *in vivo* (Kuskoski y col., 2005). Uno de los métodos de actividad antioxidante *in vivo* se basa en determinar el efecto hepatoprotector de una sustancia ante el estrés oxidativo ocasionado por el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), compuesto que al metabolizarse produce el radical libre triclorometilo (CCl<sub>3</sub><sup>·</sup>) que ataca directamente los fosfolípidos de membrana; por lo tanto, los productos de degradación de lípidos membranales (*e.g.*, MDA) y los niveles de enzimas antioxidantes (*e.g.*, SOD, GPx y CAT) se usan como marcadores del efecto protector de alguna sustancia contra el daño oxidativo (Favari y col., 2013). Al respecto, se han realizado innumerables trabajos utilizando dicha metodología: *e.g.*, Quan y col. (2009) evaluaron el efecto protector de glucósidos obtenidos de *Boschniaka rossica* (BRI), la pre-administración de

extractos de BRI redujeron el estrés oxidativo y los efectos negativos del CCl<sub>4</sub>, suprimieron la respuesta inflamatoria y restauraron la función de la proteína CYP2E1; el extracto acuoso de flores de *Taraxacum officinale* disminuyó el daño hepático, el nivel de las enzimas hepáticas séricas y elevó los niveles de CAT y GPx (Favari y col., 2013).

## **4.2 Sinaloa, estado rico en biodiversidad florística**

México es un país con una riqueza natural extraordinaria; la zona de máxima concentración de flora vascular se extiende de Chiapas a Oaxaca y de ahí se bifurca en dos franjas, una se dirige hacia el centro de Veracruz y la otra rumbo a Sinaloa y Durango. Lamentablemente, mucha de la diversidad de la franja occidental aún se desconoce.

Sinaloa cuenta con una pronunciada variación fisiográfica y climática ocasionada por la presencia de la zona costera al oeste, la serranía al noreste, el desierto al norte y la zona húmeda al sur, así como la variación altitudinal que va de 0 a 2710 m s.n.m.; por lo tanto, Sinaloa cuenta con hábitats muy variados (Vega-Aviña y col., 2000). Estas características favorecen la presencia una riqueza vegetal que Vega Aviña y col. (1989) estiman en alrededor de 3500 a 3800 especies de plantas vasculares. Sinaloa aún no cuenta con un inventario representativo de la flora y los estudios químico-biológicos de la mayoría de las plantas registradas son escasos o inexistentes. En la Universidad Autónoma de Sinaloa, el Dr. Rito Vega Aviña (Facultad de Agronomía) y el Laboratorio de Química de Productos Naturales (Facultad de Ciencias Químico Biológicas) trabajan en conjunto para mejorar el conocimiento de la flora regional y contribuir al establecimiento de estrategias para su uso sustentable; avanzando en la caracterización



químico-biológica de plantas silvestres, entre ellos el papache (*Randia echinocarpa* Sessé et Mociño) (Cabrera, 2000; Cano-Campos y col., 2011).

### **4.3 Papache (*Randia echinocarpa*)**

Los frutos de *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño son un elemento conspicuo de la herbolaria mexicana. El fruto es comúnmente empleado como remedio tradicional para padecimientos pulmonares, circulatorios, gastrointestinales y renales (Bye y col., 1991).

#### **4.3.1 Generalidades botánicas**

*Randia echinocarpa* es conocido comúnmente en Sinaloa como papache o papachi, miembro de la familia Rubiaceae y de la “tribu” Gardenieae. La planta es un arbusto o árbol pequeño de 2-6 metros de altura con ramas rígidas y brotes cortos que terminan en 4 espinas. La planta es dioica, pero en ocasiones se presenta como poligamodioica. Las flores solitarias son terminales y usualmente unisexuales (ocasionalmente bisexuales). Las flores pistiladas, de 3 cm de largo, son más largas que las flores estaminadas. Las corolas son blancas y cambian a naranja-amarillo con la edad. Los frutos son bayas globosas de 4.5-10 cm de diámetro cubiertos con protuberancias irregulares de 0.5 a 3 cm de largo; el fruto maduro contiene una pulpa muy oscura con numerosas semillas. La floración ocurre de Marzo a Julio y los frutos maduros se presentan de Julio a Marzo (Bye y col., 1991).

*Randia echinocarpa* está restringida a las costas del Pacífico en México, desde el sur de Sonora y suroeste de Chihuahua hasta la zona central de Guerrero y suroeste de Puebla; teniendo

como límites, el desierto de Sonora al norte y la cuenca del Río Balsas en el sur. La mayoría de las poblaciones de *R. echinocarpa* se localizan entre los 255 y 1200 m s.n.m., aunque se pueden encontrar hasta los 1700 m s.n.m. Esta planta espinosa es común encontrarla en vegetación secundaria caducifolia asociada a estribaciones, laderas y llanuras de inundación. Los estudios químicos de *Randia* son limitados, aunque para algunas especies se han detectado, aislado y elucidado estructuralmente varias clases de compuestos (Bye y col., 1991).

#### **4.3.2 Aplicaciones**

*Randia echinocarpa* ha sido empleada como remedio tradicional mexicano para diversos padecimientos: cáncer, malaria y diabetes; así como para padecimientos renales, pulmonares, circulatorios e incluso gastrointestinales (Bye y col., 1991). Estas propiedades etnofarmacológicas no han sido científicamente comprobadas. Sin embargo, se demostró experimentalmente que el extracto acuoso del fruto acelera la velocidad de cicatrización en ratas lesionadas; también se ha registrado que la administración oral de estos extractos en ratas incrementa la actividad diurética y la formación de urolitiasis (Perez y col., 1993; Vargas y Gutierrez, 2002).

El fruto de papache contiene manitol,  $\beta$ -sitosterol y ácidos quinóvico, oxoquinóvico, ursólico y oleanólico. De éstos, el manitol se ha señalado como un osmodiurético, sin embargo, su presencia no explica las propiedades diuréticas atribuidas al papache (Bye y col., 1991).

#### **4.4 Melaninas**

Las melaninas son probablemente los pigmentos más ubicuos, resistentes, heterogéneos y antiguos encontrados en la naturaleza (Solano, 2014). Estos pigmentos de colores oscuros se han encontrado en todos los animales, microorganismos y plantas; y son muy importantes para la salud humana debido a sus propiedades funcionales. Los estudios de melaninas son escasos comparados con otros pigmentos o metabolitos secundarios debido principalmente a su baja solubilidad en los solventes más comunes; por lo tanto los métodos de extracción son severos (Hung y col., 2002; Pugh y col., 2005) y pueden cambiar el estado natural de los polímeros en sus diversas fuentes (Yao y Qi, 2016).

#### **4.4.1 Características generales**

Las melaninas son moléculas con alto peso molecular, muy estables, amorfas, cargadas negativamente, resistentes a la degradación con ácidos pero susceptibles a la degradación con bases fuertes e insolubles en agua o solventes orgánicos; estas moléculas son formadas por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos (Urán y Cano, 2008). La complejidad y heterogeneidad de su estructura se debe principalmente a la combinación de las unidades monoméricas y las condiciones ambientales durante la polimerización (Yao y Qi, 2016).

Existen tres tipos de melaninas que se diferencian según sus precursores químicos, coloración y origen: las eumelaninas y feomelaninas se encuentran principalmente en animales y las alomelaninas son producidas por plantas superiores y hongos. Las melaninas derivadas de levodopa (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) (L-DOPA) son llamadas eumelaninas y característicamente son negras o café; las melaninas amarillas a rojizas son llamadas

feomelaninas e incorporan cisteína con L-DOPA y grupos sulfhidrilos en su estructura (Montefiori y Zhou, 1991); y las melaninas de dihidroxinaftaleno (alomelanina) son pigmentos derivados a partir de acetatos por la vía de la policétido sintasa y, generalmente, son de color negro o café (Urán y Cano, 2008). Las alomelaninas contienen pequeñas o nulas cantidades de nitrógeno a comparación de las melaninas animales que siempre contienen nitrógeno y que estructuralmente son polímeros de fenoles combinados con proteínas (Kamei, Koide, Kojima, y col., 1997). En contraste con los pigmentos animales, las melaninas derivadas de plantas son café oscuro a negro totalmente, dependiendo de la naturaleza de la principal unidad oxidada y los precursores más comunes son catecol, 1-8-dihidroxinaphthaleno (DHN) y algunos ácidos como el cafeico, gálico, clorogénico y protocatecuico; sin embargo, la estructura de la melanina no está bien elucidada (d'Ischia y col., 2015).

#### **4.4.2 Actividades biológicas de las melaninas**

Las melaninas de fuentes naturales poseen un amplio espectro de actividades biológicas: protección contra la radiación UV, lisis enzimática, daño por oxidantes, resistencia de patógenos a drogas, protección de insectos contra bacterias y virus (García-Borrón y Solano, 2002; Ortonne, 2002). Asimismo, las melaninas confieren mayor rigidez a las semillas en plantas y cutículas de los insectos. Además, se ha demostrado que las melaninas actúan como quelantes de iones metálicos y como un agente redox (Riley, 1997).

##### **4.4.2.1 Efecto radioprotector**

El uso de melanina en cosméticos y protectores solares ha sido adoptado por muchos fabricantes en un intento de imitar el papel natural de estas moléculas en la piel. Huang y col. (2011) demostraron que el Factor de Protección Solar (SPF) de formulaciones estándar aumenta con la adición de extractos de melanina de las bayas de *Cinnamomum burmannii* y *Osmanthus fragrans*. Revskaya y col. (2012) investigaron la posibilidad de crear un radioprotector eficiente basado en el uso de melanina de hongos negros consumidos antes de una exposición a 9 Gy de irradiación en ratones; donde la ingestión de los hongos protegió al 80% de los ratones de la dosis letal, mientras que los ratones del control murieron de un síndrome gastrointestinal, por lo tanto, los hongos con melanina pueden proporcionar una protección significativa contra la radiación. Del mismo modo, se estudió el posible mecanismo de la acción radioprotectora de la melanina del hongo *Gliocephalotrichum simplex* en ratones después de la exposición a 7 Gy de irradiación; encontraron que la administración de melanina (50 mg/kg) aumenta la supervivencia de los ratones en un 100%; los resultados indicaron que los mecanismos probables de radioprotección por la melanina utilizada son la modulación de las vías pro-supervivencia, la prevención del estrés oxidativo y la inmunomodulación favorable (Kunwar y col., 2012).

#### 4.4.2.2 Interacciones de melaninas y la relación con sus propiedades farmacológicas

En 1993, Larsson demostró que varias drogas y otros químicos (*e.g.*, aminas orgánicas, metales e hidrocarburos aromáticos policíclicos) se unen fácilmente a la melanina y son retenidos en tejidos pigmentados por largos períodos; se sugiere que la melanina protege las células pigmentadas y los tejidos adyacentes mediante la adsorción de sustancias potencialmente

dañinas, que luego se liberan lentamente en concentraciones no tóxicas. Sin embargo, Larsson también mencionó que la exposición química a largo plazo puede conducir a la acumulación de altos niveles de sustancias químicas nocivas en la melanina, que en última instancia puede causar la degeneración celular y lesiones secundarias en el tejido circundante (Larsson, 1993). Las melaninas pueden secuestrar material tóxico presente en los alimentos y regular la disponibilidad de algunos metales (*e.g.*, hierro, cobre) que son importantes en los procesos metabólicos y fisiológicos. Más recientemente, se ha sugerido que la retención específica de drogas y metales en la melanina protege las células inicialmente, pero también sirve como un depósito donde los compuestos acumulados se liberan lentamente y pueden causar toxicidad en la sobreexposición (Karlsson y Lindquist, 2013; Karlsson y Lindquist, 2016). Los compuestos con alta afinidad a la neuromelanina se han implicado en el desarrollo de reacciones adversas a medicamentos en el sistema nervioso central (SNC) así como en la etiología de la enfermedad de Parkinson (EP). Además, la melanina también podría utilizarse como un vehículo para la administración de medicamentos e interactuar con los mismos. Por ejemplo, Lei y col. (2008) emplearon un complejo de melanina-hierro para inducir la remisión de la anemia por deficiencia de hierro; el tratamiento con el complejo incrementó la biodisponibilidad del hierro e indujo menos efectos secundarios que el tratamiento estándar. En ese sentido, Senyuk y col. (2011) han mostrado actividad antimicrobiana de complejos de diferentes agentes con melaninas en cultivos puros de *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Herpes vulgaris* y VIH-1, lo que sugiere su potencial para la creación de nuevos tratamientos anti-infecciosos.

#### 4.4.2.3 Efecto anticarcinogénico

Las alomelaninas libres de proteínas extraídas de soja negra y semillas de ajonjolí suprimieron el crecimiento de células HCT-15 (línea celular de carcinoma intestinal humano) y células Meth/A (generadas a partir de un linfoma de ratón BALB/c). El grupo demostró que altas concentraciones de alomelaninas (400 mg/mL) en el medio de cultivo bloqueaba la fase S del ciclo celular (Kamei, Koide, Hashimoto, y col., 1997). Un estudio posterior sobre el efecto *in vivo* de estas alomelaninas en ratones BALB/c inoculados por vía intraperitoneal con células Meth/A mostró un aumento significativo en la supervivencia del grupo experimental en relación con los controles (Kamei, Koide, Kojima, y col., 1997).

De manera similar, Offen y col. (1997) demostraron que la DOPA-melanina sintética causaba un 50% de muerte celular en la línea celular PC-12; con base a esto, sugirieron un posible papel de la melanina en la inducción de apoptosis en células PC-12. Blinova y col. (2003) estudiaron el efecto de 19 preparaciones de melanina aisladas de hongos de levadura negra sobre la proliferación de queratinocitos y fibroblastos, concluyendo que la melanina modula la proliferación de ambos tipos de células con un efecto más pronunciado sobre los queratinocitos.

#### 4.4.2.4 Efecto antiinflamatorio

Un notable efecto antiinflamatorio de la melanina se reportó por Mimura y col. (1982); ratas con edema inducido por carragenina fueron tratadas por vía intravenosa o intraperitoneal

con melanina del calamar volador rojo (*Ommastrephes bartramii* L.), demostrando que suprimía eficazmente la inflamación aguda y subaguda. Del mismo modo, Avramidis y col. (1998) utilizaron el mismo modelo y demostraron que la melanina aislada de uva evita la liberación de prostaglandina, el leucotrieno y de componentes del complemento que median la inflamación; además de presentar un fuerte efecto supresor en la inflamación primaria en la enfermedad inducida por adyuvantes en ratas.

Otro estudio demostró que la melanina de comino negro (*Nigella sativa*) ejerce un efecto antiinflamatorio contra el edema de pata de rata inducido por formalina; los resultados comprobaron que la aplicación tópica de melanina tiene una mejor actividad antiinflamatoria que la hidrocortisona (El-Obeid, Adila y col., 2015).

#### 4.4.2.5 Modulación de la salud gastrointestinal

Estudios previos mostraron que la melanina extraída de *Ommastrephes bartramii* inhibía la úlcera en la mucosa gástrica inducida por fenilbutazona y la secreción de jugo gástrico en ratas; la melanina de semillas de *Nigella sativa* presentó un efecto similar (Mimura y col., 1982). Además, la melanina pudo prevenir la formación de úlceras gástricas inducidas por agentes necrosantes como la indometacina y favoreció el reabastecimiento de los niveles de moco en las paredes de las células gástricas dañadas por etanol (Al Mofleh y col., 2008).

## 4.5 Antecedentes



#### **4.5.1 Compuestos con actividad biológica en el fruto de papache**

Algunas características fisicoquímicas, nutricionales y de actividad biológica del fruto de papache han sido descritas: Cabrera (2000) registró un bajo contenido de vitamina C y un contenido relativamente alto de compuestos antinutricionales, sin embargo, se sugiere que su inclusión en la dieta podría contribuir a la salud del organismo. Extractos del papache presentan actividad antimutagénica asociada a su contenido de  $\beta$ -sitosterol y de los ácidos palmítico y linoleico, sugiriendo un efecto positivo en la terapéutica del cáncer; además, se ha indicado que posee propiedades antioxidantes y antitumorales (Santos-Cervantes y col., 2007; Cano-Campos y col., 2011).

Otro estudio demostró que el extracto acuoso del fruto del papache altera la respuesta inmune al promover la proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratones (Serrano-Silvas, 2013). Posteriormente se encontró que pigmentos tipo melaninas insolubles del fruto de papache presentan actividad inmunomoduladora *in vitro* y actividad antioxidante celular contra el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno sobre *Saccharomyces cerevisiae* (Montes-Avila y col., 2018). Estos estudios sugieren que el consumo de componentes del fruto papache podría proporcionar beneficios a la salud, contribuyendo a disminuir el estrés oxidativo y a activar el sistema inmunológico. Un aspecto importante a considerar es que existen pocos estudios *in vivo* que evalúen los efectos de extractos del fruto de papache y la posible asociación con las actividades demostradas *in vitro*.

#### **4.5.2 Actividades biológicas de melaninas**

#### 4.5.2.1 Modulación del sistema inmunológico

Diversos estudios han demostrado que tanto las melaninas de plantas como las sintéticas pueden modular la producción de citocinas y mejorar diversos parámetros inmunológicos (El-Obeid y col., 2017). Al respecto, Sava y col. (2001b) mostraron que la administración oral de melaninas de té negro (MLP) a ratones estimuló significativamente el tejido linfoide esplénico. Asimismo, las melaninas extraídas de diferentes especies de té indujeron la producción de citocinas, siendo la melanina del té verde al menos 100 veces más activa que la del té negro (Hung y col., 2008). También se demostró que las células plasmáticas produjeron significativamente más anticuerpos en animales tratados con melanina de té (32-34%) que los controles. Del mismo modo, Al-Mufarrej y col. (2006) evidenciaron que la melanina de semilla de *Nigella sativa* induce una respuesta alta y prolongada de anticuerpos en el sistema inmunológico de ratas Wistar. Los efectos inmunoestimuladores de las preparaciones de melanina aisladas de 30 hierbas medicinales tradicionales fueron patentadas por Pasco y col. (2005), registrando la mayor actividad para las obtenidas de *Allium sativum*, *Tabebuia* spp., *Serenoa repens* y *Echinacea* spp. Al respecto, Pugh y col. (2005) demostraron que las células dendríticas en las placas de Peyer de ratones alimentados con melaninas de *Echinacea* spp. secretan altos niveles de IgA e interleucina-1 (IL-1). En este estudio, los esplenocitos de los ratones que recibieron melanina presentaron una mayor producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) como resultado de un cambio en el balance de las células Th1 y Th2 a favor de Th1. Avramidis y col. (1998) encontraron que la melanina de la uva modula la producción de IL-1, IL-6 y del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Asimismo, la melanina de uva inhibe significativamente

la enfermedad inducida por adyuvantes en ratas y sugieren que la supresión del desarrollo de dicha enfermedad se debe a que el pigmento inhibe la diferenciación hacia linfocitos Th1.

Las melaninas aisladas de plantas son polímeros reconocidos por la familia de receptores tipo Toll (TLR). Las melaninas aisladas de las semillas de *Echinacea* y *Nigella sativa* activan los monocitos al unirse a TLR-2 y TLR-4, respectivamente (El-Obeid y col., 2006). La unión del ligando a los TLR induce la dimerización y el reclutamiento de diversas moléculas adaptadoras, la producción de diversas citocinas y la activación de vías de señalización corriente abajo, tales como las vías del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88). Estas cascadas incluyen principalmente las vías de señalización del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), MAP-quinasa, interferón regulador factor-3 (IRF-3) e interferón regulador factor-7 (IRF-7). Específicamente, se demostró que la melanina extraída de *Nigella sativa* activa directamente la vía de señalización mediada por TLR en monocitos, células mononucleares de sangre periférica y en la línea celular monocítica humana THP-1 (Öberg y col., 2009). Müller y Elsässer (2013) demostraron que la melanina extraída de las células B16F1 del melanoma murino aumentó la secreción de quimiocinas MIP-1b (CCL4) en células dendríticas derivadas de monocitos primarios (MoDC) y líneas celulares monocíticas humanas (THP-1). Además, Kunwar y col. (2012) informaron que la melanina aislada del hongo *Gliocephalotrichum simplex* redujo el estrés oxidativo en el tejido hepático y disminuyó el desequilibrio inmunitario al reducir la producción de citocinas (IL6 y TNF- $\alpha$ ) en ratones BALB/c.

La mayoría de los productos botánicos con propiedades inmunoestimulantes contienen lipoproteínas de alto peso molecular. En consecuencia, muchas de sus propiedades de activación de macrófagos *in vitro* pueden ser el resultado de la contaminación con estos agentes (Kumar y col., 2011). Al respecto, al someter extractos botánicos a una alta alcalinidad o alta acidez se

destruyen las lipoproteínas y se produce una pérdida posterior de sus actividades biológicas, incluida la modulación de la producción de citocinas (El-Obeid y col., 2015). En ese sentido, varios estudios han demostrado que la melanina tratada extensamente con ácidos (pH 2) y soluciones alcalinas (pH 14) aún mantiene sus propiedades inmunogénicas (Riley, 1997). Sin embargo es importante resaltar que la melanina tiene una gran afinidad y puede unir diversas moléculas (Larsson, 1993), se han detectado polisacáridos covalentemente unidos a la melanina que sobreviven a los tratamientos enzimáticos y con ácidos.

#### 4.5.2.2 Efecto antioxidante

Las melaninas de diversas fuentes exhiben una actividad antioxidante significativa, característica que podría asociarse a su poder quelante, considerando que los metales participan en la formación de radicales libres (Burkhart y Burkhart, 2005; Solano, 2014). El papel de la melanina en la eliminación de los aniones superóxido y especies de oxígeno singulete ha sido discutido por Tada y col. (2010), quienes emplearon métodos espectrofotométricos para mostrar que la melanina interactúa de manera potente con especies reactivas de oxígeno que se generan en ciertas reacciones fisiológicas. Las melaninas antioxidantes de bayas de *Cinnamomum burmannii* y *Osmanthus fragrans* tienen actividades de quelación de metales dependientes de la concentración. En trufa negra (*Tuber melanosporum*) (Harki y col., 1997), uva (*Vitis vinifera*) y huitlacoche (*Ustilago maydis*) también se han encontrado melaninas con propiedades antioxidantes (Kereste y Venger, 2003). Hoogduijn y col. (2003) observaron que la melanina protege los melanocitos y los queratinocitos del daño al ADN causado por el peróxido de

hidrógeno, lo que indica que el pigmento tiene un importante papel antioxidante en la piel. Además, se ha reportado que la melanina extraída de las hojas de té inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, lo que indica un efecto inhibitorio contra radicales peroxilo (Sava, VM y col., 2001); principalmente la forma reducida de la melanina se comporta como un antioxidante que rompe la reacción en cadena inducida por los radicales libres y compite con el  $\beta$ -caroteno como sustrato de los radicales peroxilo que se propagan en cadena.

Al analizar la caracterización fisicoquímica y la actividad antioxidante de la melanina de una cepa de *Aspergillus bridgeri*, Kumar y col. (2011) demostraron que presenta alta actividad de eliminación de radicales libres, sugiriendo aplicaciones potenciales como un antioxidante natural en las industrias cosmética y farmacéutica. Además, se ha señalado que melaninas complejas, mezclas de eumelaninas y fracciones de feomelanina, exhiben un efecto antioxidante debido a la acción de las eumelaninas, mientras que las feomelaninas tienden a causar un efecto prooxidante (Carding y Egan, 2002). De acuerdo con esto, el comportamiento antioxidante de la melanina es resultado de una combinación de dos efectos opuestos, pero como la eumelanina es la fracción predominante en la mayoría de los órganos biológicos, lo que se observa es principalmente un efecto antioxidante relacionado con la eumelanina.

#### 4.5.2.3 Efecto hepatoprotector

Las melaninas extraídas de diferentes especies de té mostraron efectos protectores contra el daño hepático inducido por hidrazina. Sava y col. (2003) trataron ratas Wistar con melanina derivada del té negro fermentado (MLP), posteriormente les administraron hidrazina y

demonstraron que la melanina inhibió el aumento de la actividad de alanina aminotransferasa (ALT) del suero y el desarrollo de intoxicación hepática severa. Además, el tratamiento con melaninas se asoció con concentraciones más bajas de malondialdehído (MDA) e incrementos de glutatión en el hígado. En otro estudio, se reportó que las melaninas del té previenen la producción de radicales libres y la formación del aducto de ADN 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG) (Hung y col., 2003). Más tarde, el mismo grupo estudió los efectos de las melaninas reducidas y no reducidas del té contra la toxicidad inducida por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) en ratones (Hung y col., 2006). Los autores concluyeron que ambas melaninas suprimen la activación del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), el cual es un factor de transcripción activado por ligando que provoca la activación del gen CYP1A1, este gen pertenece a la superfamilia de las isoenzimas del citocromo P450 y es responsable de la toxicidad atribuida a la interacción con TCDD. Resultados similares se obtuvieron con la melanina del té de *Camellia sinensis* (Sava y col., 2001b) que inhibió la transformación de AhR inducida por TCDD. Avramidis y col. (1998) demostraron que la melanina de la uva inhibe fuertemente la peroxidación lipídica *in vitro* en las membranas microsómicas del hígado de rata y protege de la peroxidación hepática *in vivo* que ocurre en las ratas con enfermedades inducidas por adyuvantes.

De manera más reciente, El-Obeid y col. (2015) demostraron que la melanina de *Nigella sativa* evita el daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> en ratas Wistar. El pretratamiento de las ratas con melanina dio como resultado una reducción significativa en los niveles de AST, ALT y MDA que se incrementan por la administración de CCl<sub>4</sub>. Los autores proponen que el efecto observado se debió a que la melanina interactúa con TLR4 y activa la producción de IL-6, citocina que actúa como factor protector debido a su rol en la regeneración hepática.

### 4.5.3 Melaninas solubles en el fruto papache

La existencia de melaninas solubles sólo se había reportado en bacterias, hongos y animales; sin embargo, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma de Sinaloa se analizaron diferentes frutos que presentan pulpas comestibles de color oscuro, entre ellos el papache, y se aislaron melaninas solubles en agua que presentan actividades biológicas *in vitro*: antioxidante (ABTS,  $719.51 \pm 2.21$   $\mu\text{mol ET/g}$ ; FRAP,  $351.77 \pm 6.16$   $\mu\text{mol ET/g}$ ) e inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa (Cuevas-Juárez y col., 2014). Por lo tanto, las melaninas solubles del fruto de papache tienen potenciales actividades biológicas *in vivo* de importancia para el hombre y que deben ser demostradas.

## V JUSTIFICACIÓN

*Randia echinocarpa*, papache, es una planta nativa de Sinaloa que tradicionalmente se ha utilizado para el tratamiento de diferentes padecimientos (*e.g.* malaria, cáncer). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la composición nutrimental, actividad antimutagénica y antitumoral del fruto; en particular se registró que contiene melaninas que presentan actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vitro*. Sin embargo, las melaninas son insolubles en la mayoría de los solventes comunes y el efecto *in vivo* de las melaninas se ha asociado a formas solubles de estos compuestos. Las actividades biológicas de las melaninas solubles han sido escasamente estudiadas a la fecha y esto incluye a las de papache. Al demostrar que las actividades *in vitro*, antioxidante e inmunomoduladora de melaninas solubles de papache, se mantienen *in vivo* se dará un gran paso hacia el desarrollo de productos que se utilicen en prevención y/o tratamiento de enfermedades (*e.g.*, crónico-degenerativas, infecciosas): la mayoría de los padecimientos implica el desarrollo de estrés oxidativo y el sistema inmunológico es indispensable para mantener la homeostasis del organismo. Finalmente, es importante resaltar que la demostración de las actividades biológicas del fruto de papache contribuirá al desarrollo de estrategias sustentables para su aprovechamiento, lo que permitiría que esta planta se convierta en un recurso para la población de las regiones de menores ingresos de Sinaloa.



## VI HIPÓTESIS

### 6.1 Hipótesis

Las melaninas solubles del fruto *Randia echinocarpa* presentan actividades inmunomoduladora y antioxidante *in vivo* sin causar toxicidad aguda ni sub-aguda.

## VII OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Evaluar las actividades inmunomoduladora y antioxidante *in vivo* de las melaninas solubles del fruto de papache (*Randia echinocarpa*).

### 7.2 Objetivos específicos

1. Analizar el efecto inmunomodulador *in vivo* de las melaninas solubles del fruto de papache (*Randia echinocarpa*).
2. Analizar el efecto antioxidante *in vivo* de las melaninas solubles del fruto de papache (*Randia echinocarpa*).
3. Determinar la toxicidad aguda y sub-aguda de las melaninas solubles del fruto de papache (*Randia echinocarpa*).

## VIII MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Material vegetal

Los frutos de *Randia echinocarpa* se colectaron en las localidades de Salvador Alvarado (25°08'09"N 107°51'45"O) y Badiraguato (25°21'47"N 107°33'06"O), Sinaloa, México en el periodo de noviembre - diciembre 2015; y se transportaron al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Las plantas fueron identificadas y autenticadas con el espécimen 8040 depositado en el herbario de la Facultad de Agronomía de la UAS por el Dr. Rito Vega Aviña.

A los frutos se les removió la cáscara leñosa y se separaron las semillas de la pulpa mediante un equipo de extracción centrífuga de jugos; en caso de ser necesario se le añadió agua a la mezcla para facilitar la remoción de la pulpa. La pulpa de papache se almacenó a -40 °C y se secó en una liofilizadora modelo 5L (Virtis Company Gardiner, EE. UU.). La muestra liofilizada se molió y la harina se pasó por una malla número 30 para su homogenización. La harina se almacenó a -20 °C protegida de la luz hasta su uso (Cuevas-Juárez y col., 2014).

### 8.2 Preparación de melaninas solubles

#### 8.2.1 Extracción de melaninas crudas

Las melaninas crudas se obtuvieron por maceración acuosa a temperatura de ebullición. En un frasco ámbar, 5 g de la harina del fruto de papache se mezclaron con 100 mL de agua

desionizada, la mezcla se llevó a ebullición y se agitó por 30 min. La suspensión se centrifugó (20000 g/15 min/20-25 °C), se recuperó el sobrenadante y se liofilizó para obtener la melanina cruda.

### **8.3 Purificación de melaninas solubles**

La melanina cruda se suspendió en 10 mL de agua desionizada y se dializó usando una membrana de celulosa prehidratada de 12 kDa (Sigma – Aldrich, Alemania); la diálisis fue por 4 días en agitación y el agua se cambió dos veces al día. El material retenido de la diálisis se recuperó, liofilizó, calculó el rendimiento y almacenó a -20 °C hasta su uso. Este material corresponde a las melaninas parcialmente purificadas por diálisis de extractos acuosos a temperatura de ebullición (MSP).

### **8.4 Características estructurales de melaninas solubles**

#### **8.4.1 Resonancia magnética nuclear $^{13}\text{C}$ en estado sólido**

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN  $^{13}\text{C}$ ) de las MSP se obtuvieron en un espectrómetro de RMN DirectDrive1 de Varian (VNMR) (Agilent Technologies, EE. UU.) del Laboratorio de RMN del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional (Ciudad de México, México) usando 5000 escaneos y un tiempo de análisis de 3 h. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) fueron expresados en partes por millón (ppm).

#### **8.4.2 Análisis elemental**

El análisis elemental de las MSP se realizó en el Laboratorio de Análisis Elemental de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria, Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México (Ciudad de México, México). La determinación analítica se llevó a cabo por triplicado en un Analizador PE 2400 (Perkin Elmer, España) que da información del contenido porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. El análisis se realizó con 2 mg de muestra y empleando los siguientes parámetros analíticos: helio como gas acarreador/gas de referencia, temperatura de la columna cromatográfica 82.2 °C, detector de conductividad térmica, presión 116.2 mm Hg, temperatura del reactor de combustión 975 °C, temperatura de reducción 501 °C, cronograma analítico CHNS (% de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno y Azufre) y tiempo de análisis 420 s; para la calibración se utilizó cistina, reactivo analítico marca Perkin Elmer.

#### **8.5 Estudio del efecto inmunomodulador de melaninas solubles**

##### **8.5.1 Actividad inmunomoduladora *in vitro***

La proliferación de esplenocitos se evaluó de acuerdo a la metodología establecida por Lin y Tang (2007) con algunas modificaciones. Los ratones BALB/c se sacrificaron por dislocación, desinfectaron con una disolución de benzal al 10% (v/v) y se les extrajo el bazo en condiciones asépticas. El bazo se colocó en una caja Petri con medio para cultivo de tejidos DMEM y se homogenizó en el medio usando el émbolo estéril de una jeringa; la suspensión

celular se centrifugó a 200 g por 5 min (EBA 20 Hettich Zentrifugen, Alemania) y se eliminó el sobrenadante. Las células recuperadas se trataron con amortiguador de lisis para eliminar los eritrocitos, la suspensión se centrifugó a 200 g por 5 min y en la pastilla se recuperaron los esplenocitos. Estas células se suspendieron en medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 10% v/v mezclado con antibiótico y antimicótico (Sigma- Aldrich, EE. UU.) al 1% v/v y se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL; se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión y se depositaron en placas de ELISA fondo plano de 96 pocillos; las placas se incubaron sin o con 50  $\mu$ L de agentes mitogénicos (20  $\mu$ g de PHA /mL y 10  $\mu$ g de LPS/mL) o las diferentes concentraciones de las MSP (1, 10, 50, 100 y 200  $\mu$ g/mL). Las soluciones de los mitógenos y de MSP se prepararon en medio DMEM. La placa se incubó durante 24 h a 37 °C en una incubadora en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y con 95% de humedad (Walter Jacket Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, NUAIRE, EE. UU.). Los mitógenos usados estimulan la proliferación de linfocitos T (PHA) o de linfocitos B (LPS). La proliferación celular se determinó usando el colorante vital bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2.5-difeniltetrazolio (MTT), las células viables inducen la formación de sales de tetrazolio. A cada pozo se añadieron 10  $\mu$ L de una disolución de PBS. Las sales de tetrazolio formadas se disolvieron por agitación en 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas ELISA (Mulltiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de proliferación celular.

### **8.5.2 Actividad inmunomoduladora *in vivo***

#### 8.5.2.1 Efecto de la administración oral de MSP en la proliferación de esplenocitos

El efecto inmunomodulador de la administración oral de las MSP se evaluó en 18 ratones machos (n=6) distribuidos en 3 jaulas de policarbonato con tapas de acero inoxidable y fueron observados bajo un ciclo de luz natural en un cuarto ventilado a  $24 \pm 1$  °C. El alimento y agua fueron proporcionados *ad libitum*. Los ratones se dividieron en 3 grupos experimentales diferentes y fueron tratados durante 14 días: el grupo MSP fue tratado con las melaninas solubles (100 mg/kg de peso/ratón); al grupo control se le administró agua inyectable solamente; y al grupo control positivo se le administraron 10 µg/kg de peso/ratón de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, Lt. L4391), un conocido inmunoestimulador de la respuesta de linfocitos B.

Al final del periodo de tratamiento, los ratones se sacrificaron y diseccionaron para extraer el bazo, que fue inmediatamente colocado en PBS (adicionado con 1% SFB, 0.01% Azida de Sodio y 1 mM EDTA) y disgregado mecánicamente con dos portaobjetos esmerilados; la suspensión se filtró con una malla de 70 µm, mezcló con 300 µL de PBS y centrifugó a 1200 rpm/10 min/4 °C. La determinación de la proliferación celular se determinó mediante la utilización de azul de tripano (4%) y el conteo celular mediante una cámara de Neubauer.

#### 8.5.2.2 Efecto de administración oral de MSP en poblaciones Linfocíticas de Ganglios Mesentéricos (MLN) y Placas de Peyer (PP)

El efecto inmunomodulador de la administración oral de las MSP se evaluó en ratones machos midiendo por citometría de flujo la inmunotipificación, cuantificación y el estado de

activación de Linfocitos en Ganglios Mesentéricos (MLN) y Placas de Peyer (PP), órganos distales al tracto gastrointestinal.

Un total de 18 ratones BALB/c (20-25 g/ratón) se distribuyeron en dos jaulas de policarbonato con tapas de acero inoxidable y fueron observadas bajo un ciclo de luz natural en un cuarto ventilado a  $24 \pm 1$  °C. El alimento y agua fueron proporcionados *ad libitum*. A un grupo de ratones se le administraron las MSP, suspendidas en agua destilada, a una dosis de 100 mg/kg de peso/ratón por 4 días consecutivos y el grupo control recibió agua destilada solamente.

Posteriormente, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, desinfectaron con etanol al 70% y disecaron para extraer los MLN y las PP. Estos órganos fueron inmediatamente colocados en PBS (adicionado con 1% SFB, 0.01% Azida de Sodio y 1 mM EDTA) y disgregados mecánicamente con dos portaobjetos esmerilados; la suspensión se filtró con una malla de 70  $\mu$ m, mezcló con 300  $\mu$ L de PBS y centrifugó a 1200 rpm/10 min/4 °C. El botón celular se recuperó y se le agregaron 2 mL de bloqueador universal (1x) en suspensión de caseína para evitar la unión inespecífica de anticuerpos; la mezcla se incubó durante 15 min a 4 °C en oscuridad. La suspensión celular se ajustó a  $1 \times 10^6$  células por tubo y fue lavada con 300  $\mu$ L de PBS.

Las suspensiones celulares se tiñeron con anticuerpos primarios anti-ratón (BD Pharmingen, EE. UU). Para la inmunotipificación y cuantificación celular se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD45R (linfocitos B), anti-CD3 (linfocitos T  $\alpha\beta$ ), anti- $\gamma\delta$  (linfocitos T  $\gamma\delta$ ); y anti-CD69-PerCp5.5 (estado de activación de linfocitos B y T). Dichos anticuerpos se eligieron con base a que los linfocitos B se caracterizan por expresar el marcador celular CD45R (CD45R<sup>+</sup>); los linfocitos T  $\alpha\beta$ , CD3 pero no  $\gamma\delta$  (CD3<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ <sup>-</sup>); y los linfocitos  $\gamma\delta$  expresan tanto



CD3 como  $\gamma\delta$  ( $CD3^+$ ,  $\Upsilon\delta^+$ ). Finalmente, el estado de activación se determinó de acuerdo a la capacidad de las tres estirpes celulares de mostrar positividad para CD69 o CD86, serán  $CD69^+$  cuando están activas y  $CD69^-$  al ser inactivas. De acuerdo a estos criterios, la inmunotipificación por citometría se realizó con las siguientes mezclas de anticuerpos: linfocitos B, CD45R-FITC y CD69-PerCp5.5; y Linfocitos T, CD3-FITC,  $\Upsilon\delta$ -PE y CD69-PerCp5.5.

La suspensión celular adicionada con la mezcla de anticuerpos para cada estirpe celular se incubó durante 25 min a 4 °C en oscuridad, lavó con 300  $\mu$ L de PBS y centrifugó a 1200 rpm/5 min. Finalmente, las muestras se fijaron con 400  $\mu$ L de *p*-formaldehído (PFA) al 1% para la adquisición de muestras en el citómetro CytoFLEX S (Beckman Coulter, EE. UU.) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CDMX, México. Los datos fueron analizados en el software FlowJo v10 (BD Biosciences, EE.UU.) para la obtención de los porcentajes celulares.

## **8.6 Estudio de la actividad antioxidante de melaninas**

### **8.6.1 Actividad antioxidante *in vitro***

#### **8.6.1.1 Ensayo ABTS**

El radical  $ABTS^{\bullet+}$  (ácido 2,2'-azino-*bis* (3-ethylbenzotiazolin)-6-sulfónico) se generó mediante la reacción de 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato de potasio (5 mL de ABTS 14 mM con 5 mL de persulfato 4.9 mM). La mezcla se incubó por 16 h en oscuridad y a temperatura ambiente; el radical se almacenó en alícuotas de 1 mL a -70 °C hasta su uso. Para

el ensayo, una de las alícuotas se diluyó con amortiguador de fosfatos (pH 7.4) hasta alcanzar una absorbancia entre 1.0 y 1.2 a 734 nm (ABTS<sup>•+</sup> diluido). Para la evaluación de la actividad antioxidante, 50 µL de disolución de melanina (0.5 mg/mL), o 50 µL de disolvente como control, se mezclaron con 1.95 mL de ABTS<sup>•+</sup> diluido y la mezcla se incubó en oscuridad durante 10 min a 37 °C (Liu y col., 2009). Para la cuantificación se preparó una curva de calibración con Trolox (0, 50, 100, 200, 400 µmol/L) y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox (ET) por gramo de melanina (µmol ET/ g).

#### 8.6.1.2 Ensayo FRAP

La MSP (1 mg) se resuspendió en 1 mL de agua alcalinizada con NH<sub>4</sub>OH y el pH se ajustó a 7 por evaporación; posteriormente se prepararon diluciones con una disolución de etanol al 12% en agua para su análisis. A 100 µL de muestra se le añadieron 3 mL del reactivo de FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 6 min y se midió la absorbancia a 595 nm; como blanco se utilizó la mezcla de reacción sin la muestra (Benzie y Strain, 1996). Los resultados se expresaron como µmol ET/ g.

### 8.6.2 Actividad antioxidante *in vivo*

A partir de los resultados de la actividad antioxidante *in vitro* de las MSP se determinó la dosis a utilizar en el ensayo *in vivo*. Esto tomando en cuenta la concentración de MSP que presentó la mejor actividad antioxidante (métodos de FRAP y ABTS), sometiéndola a una

conversión y extrapolación mediante un algoritmo que relaciona las siguientes variables: concentración de la mejor actividad antioxidante ( $\mu\text{g/mL}$ ), factor de conversión de  $\mu\text{g}$  a  $\text{g}$  y  $\text{kg}$ , factor de conversión de  $\text{mL}$  a  $\text{L}$ , el volumen total de agua en un humano promedio ( $V_T$ ), el porcentaje de  $V_T$ , el volumen de agua intracelular en un humano promedio ( $V_i$ ), el porcentaje de  $V_i$ , el volumen de agua extracelular en un humano promedio ( $V_e$ ), el porcentaje de  $V_e$ , el volumen plasmático ( $V_p$ ), el volumen transcelular ( $V_t$ ), el volumen intersticial ( $V_{in}$ ) la masa total de un humano promedio ( $M_{Th}$ ) y la masa total de un ratón promedio de experimentación utilizado ( $M_{Tr}$ ). Se determinó como volumen de dilución en el organismo el volumen extracelular de tipo plasmático y el volumen extracelular de tipo trans-celular, la  $M_{Th}$  se fijó a  $70\text{ kg}$  y el  $V_T$  a  $42.5\text{ L}$ . De manera breve el algoritmo trabajó con 7 ecuaciones principales:

$$1) M_{Th} = V_T$$

$$2) V_T = V_i + V_e$$

$$3) V_e = V_p + V_t + V_{in}$$

$$4) V_e = (V_T \times \% V_e) / 100$$

$$5) \mu\text{g (mejor actividad antioxidante)} = \text{concentración (mejor actividad antioxidante)} \times (V_p + V_t)$$

$$6) \text{gr} = (M_{Tr} \times \text{gr (mejor actividad antioxidante)}) / M_{Th}$$

$$7) \text{gr} = (1\text{ kg} \times \text{gr}) / M_{Th}$$

Aplicando el factor de conversión se obtuvo la dosis calculada de MSP en  $\text{mg/kg}$  de peso (Porth, 2011; Krishna, 2012).

#### 8.6.2.1 Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 50 ratas Wistar macho con un peso inicial de  $130 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$  (6 semanas de edad). Las ratas Wistar macho fueron donadas por las instalaciones de investigación animal ubicada en CINVESTAV Unidad-Coapa, Ciudad de México. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico en un cuarto con temperatura controlada ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), períodos de luz oscuridad 12/12 h y el alimento (Rab Diet 5012) y agua purificada se administraron *ad libitum*.

Todos los animales, procedimientos y el protocolo de investigación fueron realizados siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Uso y el Bienestar de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y en la Guía para el cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de Estados Unidos.

#### 8.6.2.2 Modelo de daño hepático toxico agudo por $\text{CCl}_4$

Las ratas se asignaron a los siguientes 6 grupos (n=6): grupo control sin tratamiento; grupo tratado con el vehículo, solución salina (0.09% p/v); grupo tratado con MSP (MSP) (33 mg/kg de peso); grupo con daño hepático tóxico agudo (DHTA) inducido por  $\text{CCl}_4$  (1.25 mL/kg de peso vía i.p.); grupo de ratas con DHTA pre-tratadas por vía oral con 50 mg/kg de silimarina disuelta en solución salina (0.09% p/v); y grupo de ratas con DHTA pre-tratadas por vía intraperitoneal con 33 mg/kg de peso de MSP.

Los tratamientos se administraron los días 1, 3 y 5 del periodo de experimentación. Durante este periodo se midió el alimento consumido por cada rata de los diferentes grupos experimentales; esta medición se realizó restando el alimento no consumido al alimento servido

por jaula y se dividió entre el número de ratas por jaula para obtener el consumo de alimento promedio por rata al final del periodo. Además, se realizó pesaje individual de las ratas al inicio, cada dos días y al final del periodo de alimentación; la ganancia de peso se obtuvo como la diferencia entre el peso de cada medición y el inicio del periodo.

Al sexto día, después de 16 h de la aplicación del CCl<sub>4</sub> (50% en aceite de cocina, 1.25 mL/kg de peso), las ratas fueron anestesiadas por inhalación de cloroformo y se les extrajo sangre por punción cardíaca. La sangre se centrifugó a 2000 rpm/ 10 min para la obtención de suero y el hígado se extrajo, pesó y almacenó a -70 °C hasta ser utilizado.

#### 8.6.2.3 Determinación de enzimas séricas

La actividad de las enzimas séricas fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) fueron determinadas usando kits comerciales Weiner Lab y se siguieron las indicaciones del fabricante.

La actividad de la ALP (Tietz y col., 1983) fue determinada tomando 3 µL de suero que fueron mezclados con 300 µL de solución de trabajo, mezcla de 4 volúmenes de reactivo A con un volumen de reactivo B; la mezcla se incubó por 3 min a 37 °C y se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas ELIREAD (KontroLab, Italia). Los valores de ALP son expresados como unidades internacionales por litro (U/L).

Las actividades de AST y ALT fueron determinadas de la siguiente manera: 40 µL de suero fueron mezclados con 400 µL de solución de trabajo, mezcla de 4 volúmenes de reactivo A con un volumen de reactivo B; la mezcla se incubó por 3 min a 37 °C y la absorbancia se

determinó a 340 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Spectronic Instruments, EE. UU.). Los valores de ALT y AST son expresados como unidades internacionales por litro (U/L).

#### 8.6.2.4 Determinación de marcadores de estrés oxidativo: GSH y MDA

El glutatión (GSH) se cuantificó con el kit “Glutathione Colorimetric Detection” de BioVision [No. catálogo K261-100]: en un microtubo Eppendorf se colocaron 100 mg de hígado y se homogenizaron en frío con 400  $\mu$ L de buffer; a la mezcla se añadieron 100  $\mu$ L de ácido sulfosalicílico al 5% y se sonicó por 1 min; las muestras se centrifugaron a 8000 g/10 min y se recuperó el sobrenadante. A alícuotas (20  $\mu$ L) de cada homogenizado o de las soluciones estándar se les agregó la mezcla de reacción con NADPH y se incubaron por 7.5 min a temperatura ambiente y en obscuridad; posteriormente, se les agregaron 20  $\mu$ L de la solución sustrato de glutatión y fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplaca ELIREAD (KontroLab, Italia) y la concentración de GSH de las muestras se determinó usando una curva de calibración estandarizada y fue reportado como  $\mu$ M de GSH/ mg de tejido de hígado.

La concentración de malondialdehído (MDA) se midió con el kit “Lipid Peroxidation Colorimetric/Fluorometric Assay” de Biovision (No. Catalogo: K739-100). El suero (10  $\mu$ L) se mezcló con 250  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  (42 mM) y 62.5  $\mu$ L de ácido fosfotúngstico. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente, centrifugó (13000 g/ 3 min/ temperatura ambiente), la pastilla se recuperó, resuspendió en 49  $\mu$ L de  $H_2O$  y 1  $\mu$ L de BHT y la mezcla se llevó a un volumen final de 100  $\mu$ L con agua desionizada. Para la curva estándar de cuantificación, se empleó MDA

2 mM (1, 2, 3, 4 y 5  $\mu$ L) en microtubos separados. A continuación, a los microtubos con muestras o estándares se les añadieron 300  $\mu$ L de TBA y se incubaron a 95 °C/ 60 min; posteriormente, se mezclaron con 150  $\mu$ L de n-butanol y 100  $\mu$ L de NaCl 5 M, se centrifugaron 16000 g/ 3 min/ temperatura ambiente, se recuperó la capa superior (n-butanol), se eliminó el n-butanol por evaporación a 55 °C, el residuo se resuspendió en 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O y se mezcló. De estas soluciones se tomaron 75  $\mu$ L y colocaron en una placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 532 nm en condiciones de obscuridad utilizando un lector de microplaca ELIREAD (KontroLab, Italia). Los resultados se reportaron como nanomoles de MDA por mL de suero.

#### 8.6.2.5 Evaluación histopatológica de tejido hepático

Los fragmentos de hígado fueron fijados en solución amortiguadora de formalina: formaldehído al 10%, 100 mL/L (J.T. Baker); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g/L (Vetec); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.5 g/L (Fermont); y pH= 7.4. Las muestras incluidas del tejido fueron cortadas en piezas de 0.5 cm x 2.0 cm, deshidratadas y embebidas en parafina (Leica Paraplast). Posteriormente, muestras con un grosor de 5-7  $\mu$ m fueron obtenidas usando un micrótopo (Leica RM2125 RTS). Los cortes fueron colocados en dos portaobjetos.

Para la realización de la tinción del núcleo con H&E (hematoxilina y eosina), las muestras de tejido hepático fueron deshidratadas dos veces (2 min/vez) en alcohol al 96% y rehidratadas en agua destilada (2 min/vez). Posteriormente, los cortes fueron teñidos por 3 a 5 min en solución de hematoxilina (50 g alumbre de potasio, 1 g cristales de hematoxilina, 0.2 g yodato

de sodio, 1 g ácido cítrico, 50 g hidrato de cloral y 100 mL agua destilada) y lavados con agua destilada (1 min) y dos veces por inmersión en alcohol ácido (1% de ácido clorhídrico en etanol) (2-3 min). Las muestras se incubaron con bicarbonato de sodio al 0.1% por 3 min, lavaron con agua destilada, se realizaron de 10 a 15 inmersiones en alcohol al 96% y de 5 a 10 inmersiones en solución de contraste eosina-floxina (100 mL de solución de eosina, 1 g eosina Y hidrosoluble en 100 mL agua destilada; 10 mL de solución floxina, 1 g floxina B en 100 mL agua destilada; 780 mL etanol al 95%; 4 mL ácido acético glacial). Finalmente, las muestras fueron deshidratadas con inmersiones secuenciales en alcohol al 96% (10 a 15 inmersiones), alcohol al 96% (4 a 5 inmersiones), alcohol al 100% (5 a 10 inmersiones) y xilol (5 a 10 inmersiones; por 2 ocasiones). Al finalizar la tinción, las muestras fueron selladas con medio de montaje (Entellan New Merk Millipore) para la preservación y análisis histológico en un microscopio óptico Primo Star (Carl Zeiss, Alemania) y el programa Zen2 Blue Edition (Zeiss, Alemania).

El grado de esteatosis en las biopsias hepáticas se analizó con base a un sistema de puntuación histológica (**Cuadro 1**) (LaBrecque y col., 2012). La biopsia hepática es considerada el patrón de oro para identificar hígado graso, al considerarse como el método de diagnóstico más preciso.

## **8.7 Estudio de toxicidad de las melaninas solubles papache**

### **8.7.1 Evaluación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) por método de Lorke**



La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se determinó en ratones BALB/c machos de 50 días de nacidos y peso promedio entre 24-26 g; el alimento y agua se administraron *ad libitum* y fueron puestos en ayuno por 20 h previo al experimento.

El método de Lorke consta de dos etapas: la primera requiere de 9 ratones divididos en 3 grupos, a cada grupo se le administró por vía oral una de tres diferentes dosis (10, 100 y 1000 mg/kg de peso) de MSP; en caso de no registrarse mortalidad, la siguiente etapa implica el uso de otros 9 animales divididos en tres grupos, las dosis suministradas de MSP fueron de 1600, 2900 y 5000 mg/kg de peso. En ambas etapas, los animales fueron observados de manera continua durante las primeras horas posteriores a la administración de las MSP para registrar la respuesta a los extractos, su comportamiento y la mortalidad a las 24 h. Los animales que no presentaron mortalidad se mantuvieron en observación durante un periodo de 30 días para determinar algún efecto tardío de las dosis; finalmente los ratones fueron sacrificados siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el Uso y el Bienestar de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y la Guía para el cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de Estados Unidos y se obtuvieron órganos vitales (hígado, riñones, corazón, pulmones, bazo y testículos) que fueron pesados y observados macroscópicamente para determinar posibles daños.

**Cuadro 1.** Sistema de puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre Esteatosis No Alcohólica (EHNA)

<b>Esteatosis</b>	<b>Puntuación S</b>	<b>Inflamación lobular</b>	<b>Puntuación L</b>	<b>Balonamiento hepatocítico</b>	<b>Puntuación B</b>
<5%	0	No hay	0	No hay	0
5- 33%	1	<2	1	Pocas células balonadas	1
34- 66%	2	2- 4	2	Muchas células balonadas	2
>66%	3	>4	3	Muchas células balonadas	2

\*Grado de actividad de EHNA: Grado = puntuación total = S + L + B (rango 0-8) (LaBrecque y col., 2012).

La dosis letal media fue calculada por la siguiente fórmula:

$$DL_{50} = \sqrt{D_0 \times D_{100}}$$

$D_0$  = Dosis más elevada sin mortalidad

$D_{100}$  = Dosis más baja que produjo mortalidad (Chinedu y col., 2013)

### **8.7.2 Evaluación de toxicidad sub-aguda**

La toxicidad sub-aguda determina los posibles efectos adversos ocasionados por la administración de dosis habituales de MSP por periodos relativamente prolongados. Los ratones BALB/c se dividieron en dos grupos experimentales de 10 animales cada uno (5 machos y 5 hembras). Las normas de cuidado y los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos. El grupo 1 recibió 100  $\mu$ L de agua destilada y sirvió como control. El grupo 2 se trató con 500 mg/kg de MSP. Los tratamientos se administraron una vez al día durante 30 días por vía oral. Durante el período de tratamiento, se registraron signos generales de toxicidad, comportamiento y mortalidad. Los pesos corporales se midieron los días 1, 7, 17, 24 y 30 (Atsafack y col., 2015). Al final del experimento (día 30), los animales fueron anestesiados con ketamina/xilasa (100 mg/20 mg / kg i.p.); la sangre se extrajo mediante punción cardíaca y se usó para evaluaciones bioquímicas y hematológicas; y el corazón, los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones y los testículos se recuperaron (Araújo y col., 2017) para calcular el peso relativo de los órganos [(g peso del órgano / g peso corporal) \* 100].

La evaluación hematológica y bioquímica se realizó en todos los animales sobrevivientes al final del experimento. Sangre (100  $\mu$ L) se transfirió a tubos que contenían 20  $\mu$ L de EDTA.

Las evaluaciones hematológicas incluyeron la concentración de hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT), utilizando un analizador de autohematología veterinario BC-2800 (Mindray; China).

Para el análisis bioquímico, la sangre recolectada restante se transfirió a tubos sin anticoagulante y se centrifugó a 3500 rpm/ 10 min. El suero se recuperó y almacenó a -80 °C hasta el análisis. La glucosa (GLU), creatinina (CRE), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y las proteínas totales se evaluaron utilizando kits comerciales (Wiener Lab; Argentina).

## **8.8 Análisis estadístico**

Para determinar el efecto del tratamiento con MSP en las actividades inmunomoduladora y antioxidante, así como la toxicidad aguda y subaguda, los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico en que se determinó la media  $\pm$  desviación estándar.

Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, EE. UU.). Las siguientes variables de respuesta fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA) de una vía: proliferación de esplenocitos, porcentajes de poblaciones celulares y activación, enzimas hepáticas, marcadores de estrés oxidativo, valores hematológicos y bioquímicos. En las comparaciones de medias se utilizó la prueba de Fisher (LSD). Los experimentos se realizaron por triplicado y se consideró un nivel de significancia estadística para  $p < 0.05$ .

## IX RESULTADOS

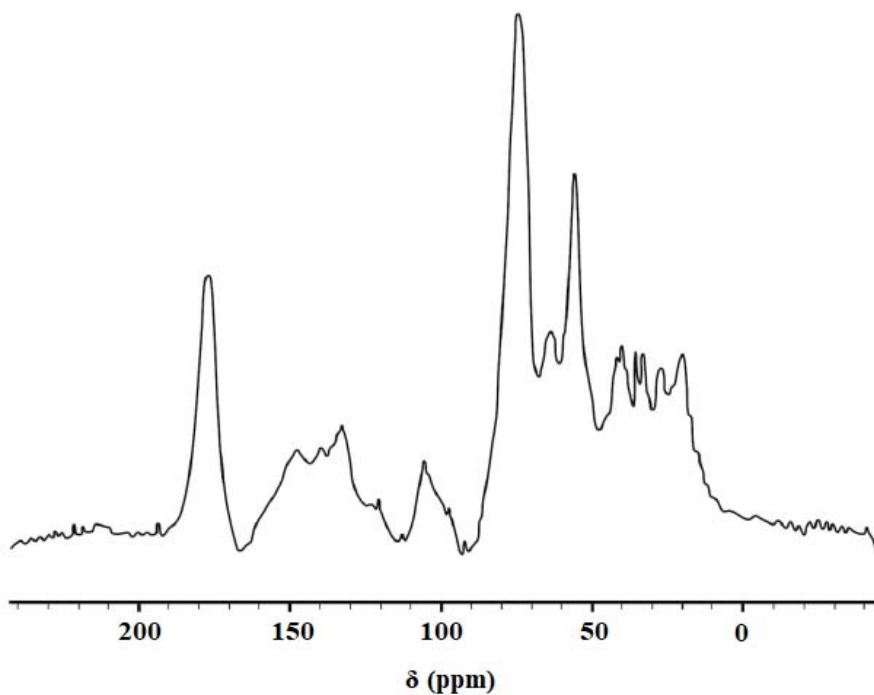
### 9.1 Rendimiento de las melaninas solubles

La harina de la pulpa de papache presentó una humedad de  $20.1 \pm 2.77\%$  y un rendimiento de 4.5% con respecto al peso total de la pulpa fresca. El rendimiento de la extracción de las melaninas solubles de papache (MSP) por diálisis fue de  $4.5 \pm 0.09\%$ . Las MSP fueron sólidas y presentaron un color café oscuro-negro.

### 9.2 Características estructurales de melaninas solubles

#### 9.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) $^{13}\text{C}$ en estado sólido

Debido a la heterogeneidad y carácter amorfo de las MSP, la caracterización estructural de estos pigmentos requiere de técnicas especializadas como la RMN  $^{13}\text{C}$  en estado sólido. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de las MSP muestra señales para diferentes tipos de carbonos: carbonilos de ácidos carboxílicos o amidas (170-173), aromáticos/ olefínicos correspondientes a la estructura indólica (110-160 ppm), metilenos con una cadena adicional (20-40 ppm) y alifáticos oxigenados (50-105 ppm) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  en estado sólido de las melaninas solubles de papache (MSP). Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm).

### 9.2.2 Análisis elemental

Las MSP presentaron la composición elemental siguiente: C  $48.260\pm 0.011\%$ , N  $3.693\pm 0.009\%$  e H  $6.093\pm 0.076\%$ , sin contenido significativo de S. Estos valores corresponden a una relación C:H:N de 18:18:1.

## 9.3 Actividad inmunomoduladora de las melaninas solubles

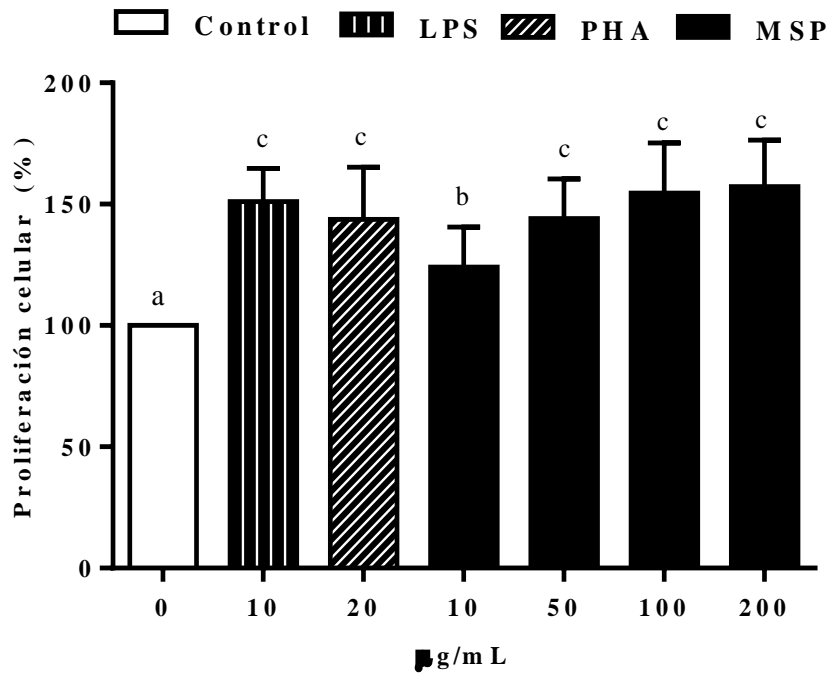
### 9.3.1 Actividad inmunomoduladora *in vitro*

Las MSP presentaron buena actividad inmunomoduladora, incrementaron la proliferación de esplenocitos de ratón en 24.1% - 57.25%. El efecto de las MSP fue dependiente de la concentración (10-200  $\mu\text{g/mL}$ ) y significativamente diferente al control negativo. A partir de 50  $\mu\text{g/mL}$  de MSP, el incremento en la proliferación fue similar o mayor al registrado con los mitógenos LPS (51%) y PHA (43.8%) (**Figura 2**).

### 9.3.2 Actividad inmunomoduladora *in vivo*

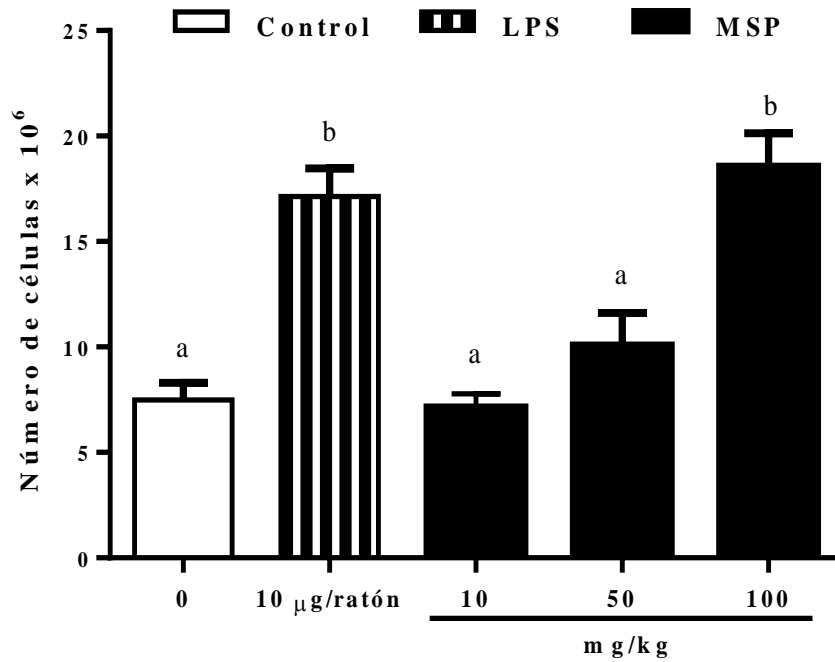
#### 9.3.2.1 Efecto de la administración de MSP en la proliferación de esplenocitos

En la evaluación de la actividad inmunomoduladora en esplenocitos, las MSP mostraron un efecto dosis respuesta (10-100 mg/kg de peso), el efecto a 100 mg/kg fue significativamente superior al control y similar al efecto del LPS (**Figura 3**).



**Figura 2.** Efecto *in vitro* de las melaninas solubles de papache (MSP) en la proliferación de esplenocitos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE (n=3) de tres experimentos independientes. PHA: Fitohemaglutininina, LPS: Lipopolisacárido. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).





**Figura 3.** Efecto de la administración oral en ratones de las melaninas solubles de papache (MSP) en la proliferación de esplenocitos. Los resultados se expresan en media  $\pm$  DE (n=3). LPS: Lipopolisacárido. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### 9.3.2.2 Efecto de la administración oral de MSP en poblaciones linfocíticas del MLN y PP

En ratones tratados con MSP (100 mg/kg/8 d), el porcentaje de las poblaciones celulares LT  $\alpha\beta$ , LT  $\gamma\delta$  y LB en PP y MLN se mantuvo sin cambio (**Figura 4**); asimismo, las MSP no indujeron la activación de las estirpes celulares de LB (CD19<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>) y LT  $\alpha\beta$  (CD3<sup>+</sup>/ $\gamma\delta$ <sup>-</sup>/CD69<sup>+</sup>) (**Figura 5A-B**). Por el contrario, las MSP indujeron la supresión de LT  $\gamma\delta$  (CD3<sup>+</sup>/ $\gamma\delta$ <sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>) provenientes de PP y la activación de las mismas células presentes en las MLN (**Figura 5c**).

## 9.4 Actividad antioxidante de las melaninas solubles

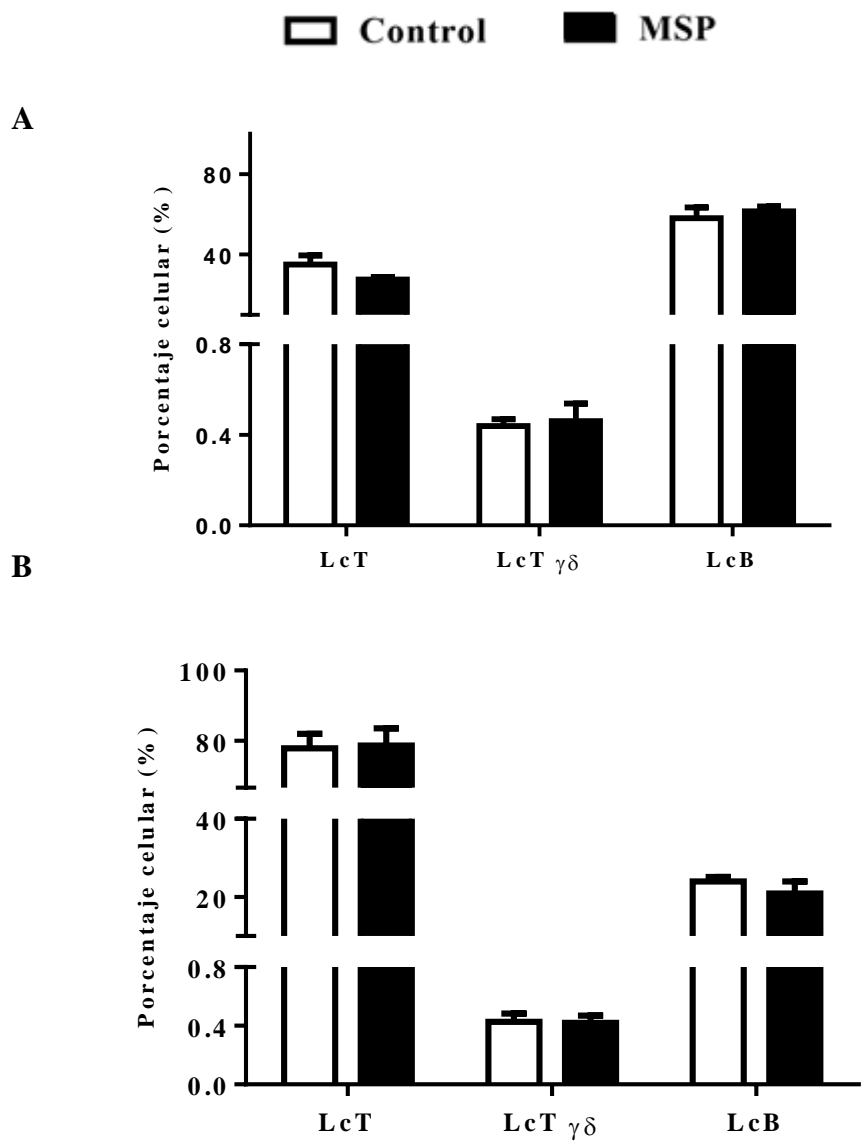
### 9.4.1 Actividad antioxidante *in vitro*

La actividad antioxidante *in vitro* de las MSP fue de  $904.78 \pm 1.58$   $\mu\text{mol ET/ g}$  para el método de ABTS y  $368.79 \pm 0.31$   $\mu\text{mol ET/ g}$  para el método de FRAP.

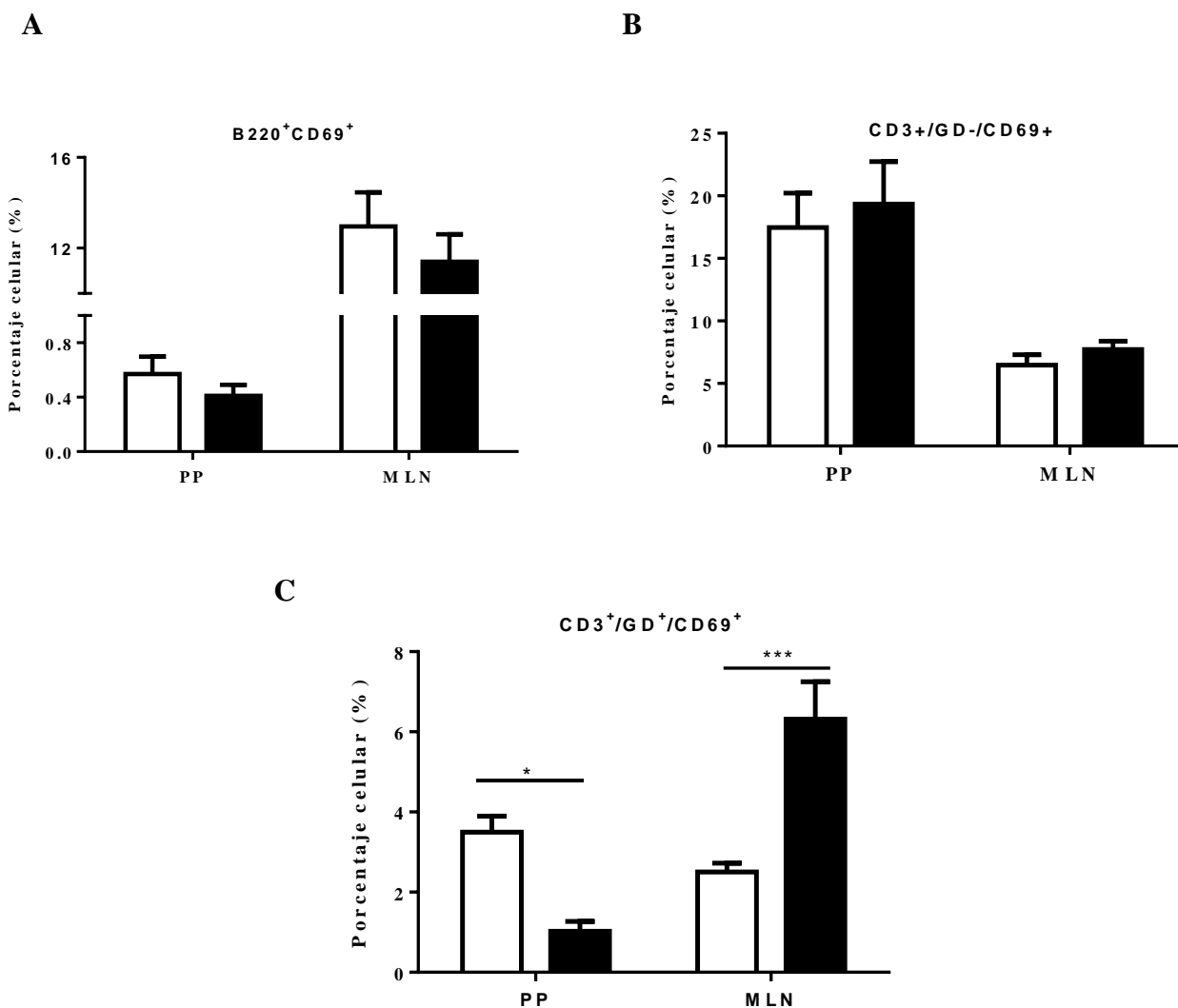
### 9.4.2 Actividad antioxidante *in vivo*

#### 9.4.2.1 Determinación de enzimas séricas de ratas tratadas

Al analizar los niveles de enzimas séricas (ALT, AST y ALP), las ratas de los tratamientos control negativo, vehículo y MSP sin daño hepático mostraron valores similares ( $p \geq 0.05$ );



**Figura 4.** Efecto de administración oral de melaninas solubles de papache (MSP) en el porcentaje celular de linfocitos T (LT), linfocitos T  $\gamma\delta$  (LT  $\gamma\delta$ ) y linfocitos B (LB) en Ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN) y Placas de Peyer (PP) de ratón BALB/c. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE (n=5). A) Porcentaje celular en Placas de Peyer. B) Porcentaje celular en Ganglio Linfático Mesentérico. No se presentaron diferencias significativas. ( $p \geq 0.05$ ).



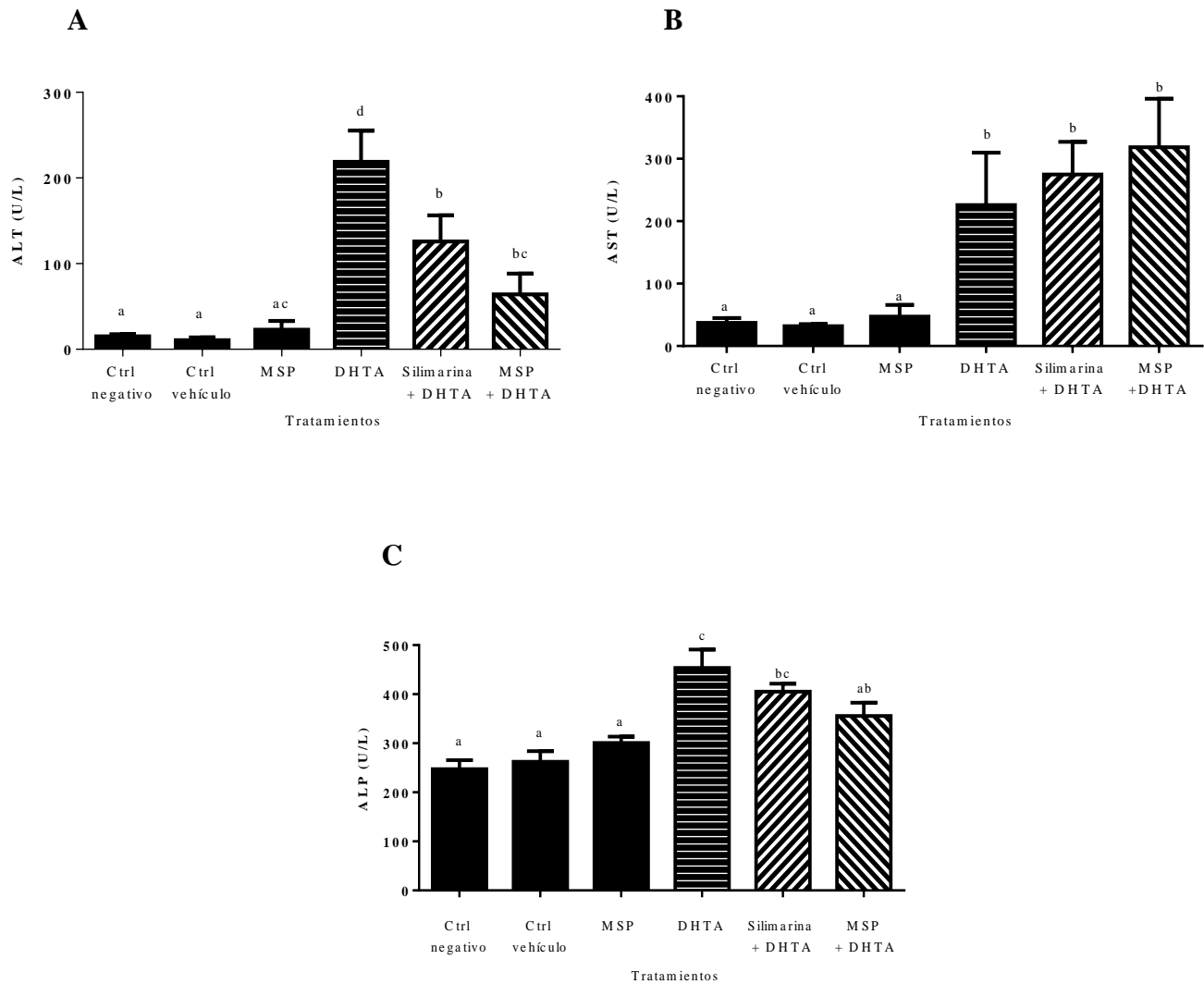
**Figura 5.** Efecto de administración oral de melaninas solubles de papache (MSP) en la activación de linfocitos B (LB), linfocitos T (LT) y linfocitos T  $\gamma\delta$  (LT  $\gamma\delta$ ) en Placas de Peyer (PP) y Ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN) de ratón BALB/c. Los resultados se expresan en media  $\pm$  DE (n=5). A) Porcentaje celular de linfocitos B (B220+CD69+). B) Porcentaje celular de linfocitos T convencionales  $\alpha\beta$  (CD3+/ $\gamma\delta$ -/CD69+) C) Porcentaje celular de Linfocitos T  $\gamma\delta$  (CD3+/ $\gamma\delta$ + /CD69+). \*(p < 0.01) \*\*\*(p < 0.001), GD: gamma-delta.

mientras que en las ratas con daño hepático inducido por  $\text{CCl}_4$  (DHTA) se registraron incrementos significativos ( $p < 0.05$ ) (**Figura 6**). El tratamiento de ratas con silimarina y MSP tuvo un efecto hepatoprotector contra el daño generado por el  $\text{CCl}_4$ , las ratas tratadas mostraron una menor concentración de la enzima ALT que las ratas del control hepatotóxico (**Figura 6A**). En contraste, los niveles de la enzima AST en las ratas tratadas con silimarina y MSP fueron similares a los animales del control hepatotóxico (**Figura 6B**). Por otro lado, el efecto hepatoprotector de las MSP también se reflejó en los niveles de ALP, las ratas tratadas mostraron valores menores que las ratas control DHTA (**Figura 6C**).

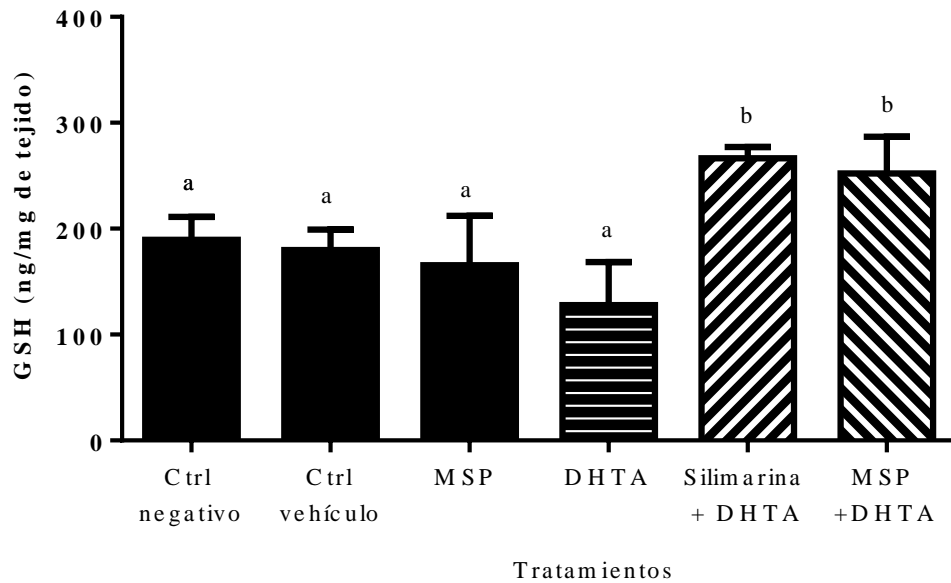
#### 9.4.2.2 Efecto del tratamiento con MSP en la concentración de GSH en tejido hepático y MDA en suero

El pretratamiento de ratas con silimarina o MSP disminuyeron el estrés oxidativo inducido por la administración de  $\text{CCl}_4$ , estas ratas presentaron mayores niveles de GSH que el grupo de ratas que sólo fue tratado con  $\text{CCl}_4$  (grupo DHTA). En contraste, los niveles de GSH en las ratas del grupo DHTA presentaron una disminución no significativa ( $p \geq 0.05$ ) en relación con los animales de los grupos control negativo, vehículo y MSP sin daño (**Figura 7**).

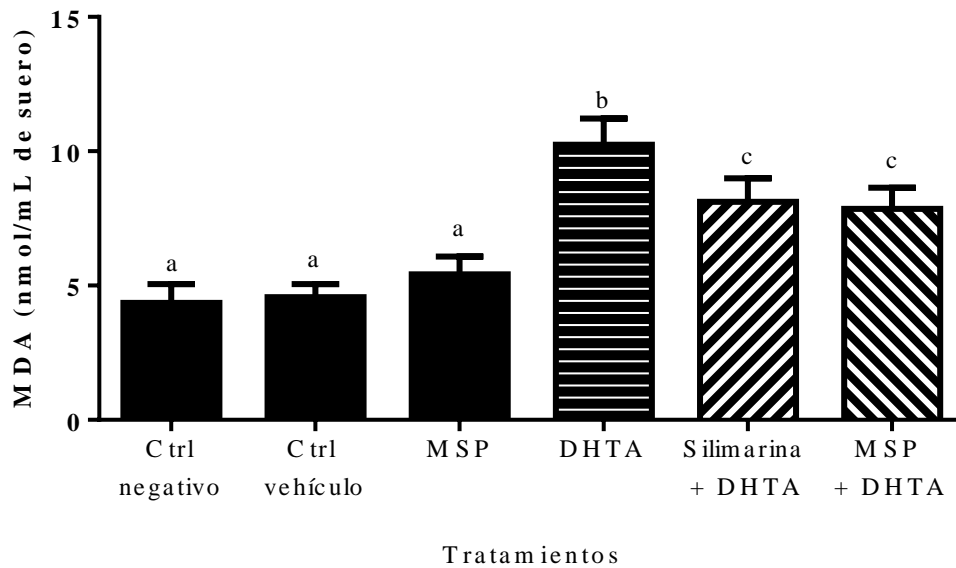
Al analizar los niveles de MDA, marcador de peroxidación lipídica, las ratas tratadas con silimarina y MSP presentaron menores valores que las ratas del grupo DHTA ( $p = 0.0001$ ). A su vez, los niveles de MDA del grupo de DHTA indican el incremento del estrés oxidante y fueron significativamente mayores que los registrados para las ratas de los grupos control (negativo, vehículo y MSP sin DHTA) (**Figura 8**).



**Figura 6.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) (33 mg/kg) en los niveles séricos de enzimas hepáticas de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). Los resultados se expresan en media  $\pm$  DE (n=6). ALT: Alanino aminotransferasa. AST: Aspartato aminotransferasa. ALP: Fosfatasa alcalina. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) en los niveles de glutatión reducido (GSH) de tejido hepático de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).



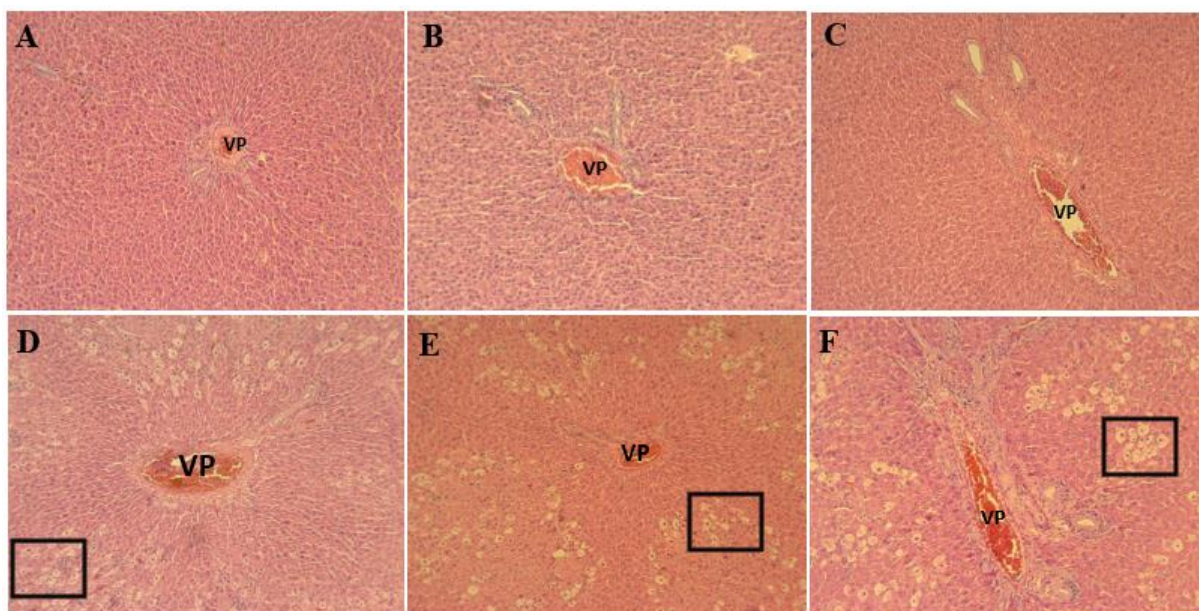
**Figura 8.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) en niveles de malondialdehido (MDA) en tejido hepático de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE (n=6). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).



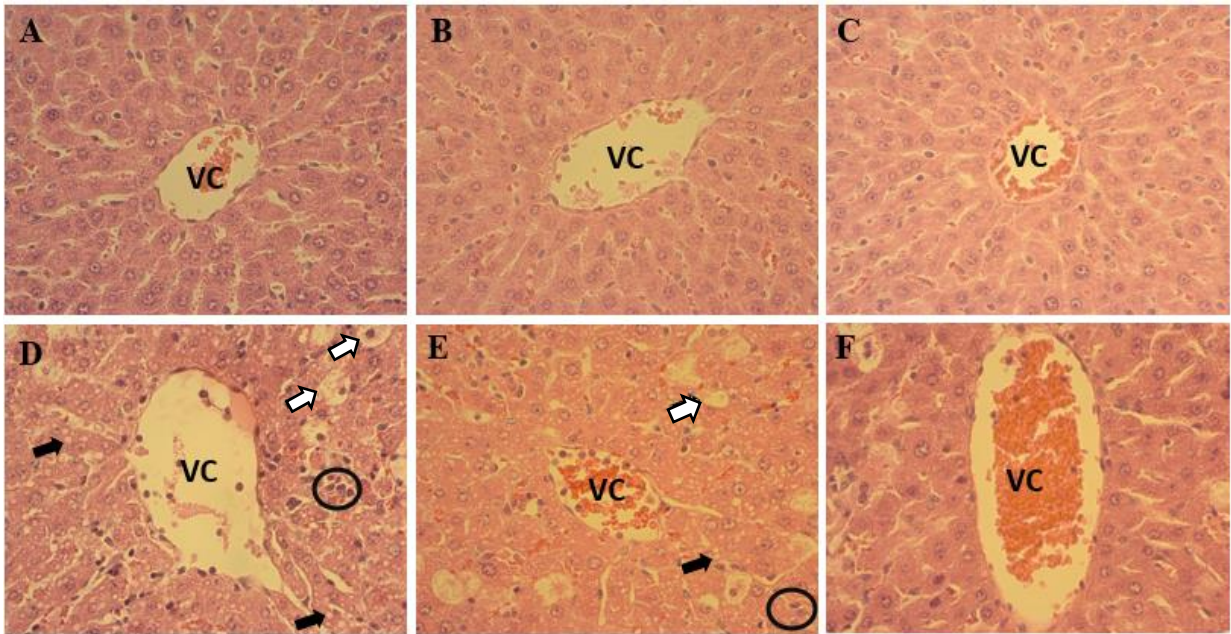
#### 9.4.2.3 Evaluación histopatológica de tejido hepático

El análisis histopatológico de las ratas de los grupos control negativo, vehículo y MSP sin daño mostró un parénquima hepático con arquitectura normal caracterizada por la presencia de cordones de hepatocitos, poca presencia de células inmunes, presencia de hepatocitos viables caracterizadas por su forma poliédrica y núcleo en el centro de la célula, pocas células apoptóticas, nula presencia de células necróticas y esteatosis grado 0 en la puntuación S del sistema de puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre Esteatosis No alcohólica (EHNA) (LaBrecque y col., 2012) (**Figura 9 - 11**).

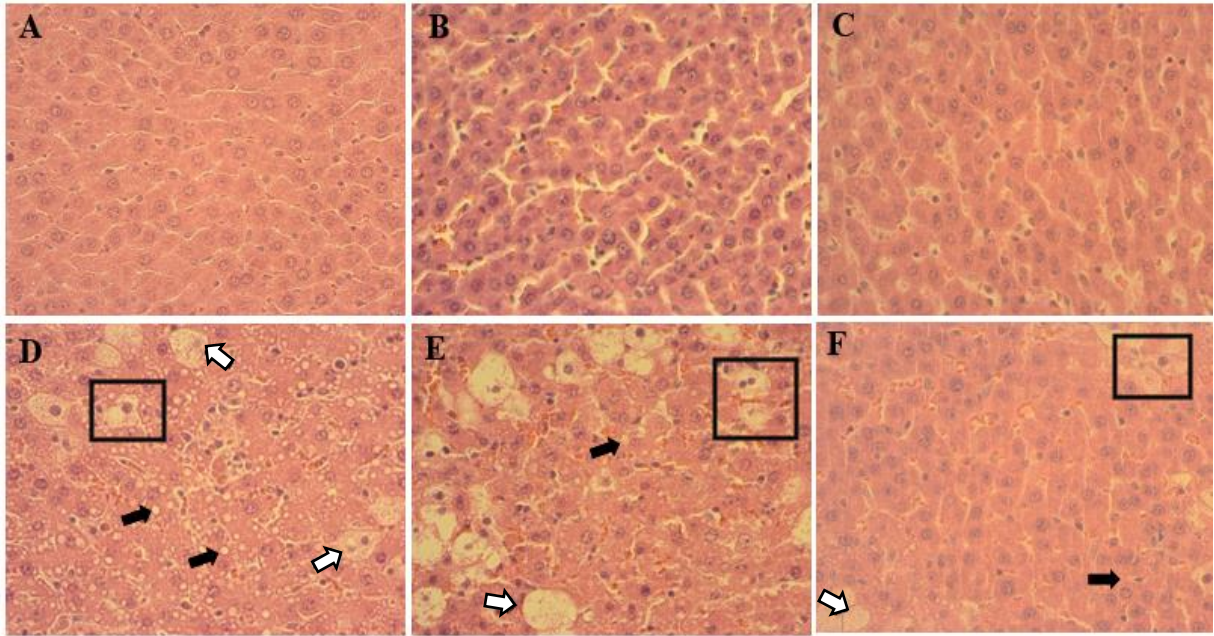
Por otro lado, los cortes hepáticos de ratas del grupo DHTA presentaron alteraciones degenerativas caracterizadas por necrosis, inflamación moderada, esteatosis micro y macrovesicular severa grado 2 (56.03%) dispersa homogéneamente en parénquima hepático, zona perivenular (zona 3 de lobulillo hepático) y zona periportal (zona 1 de lobulillo hepático). El pretratamiento con silimarina disminuyó el daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>: este grupo presentó un 33.25% de esteatosis grado 1; moderado número de células balonadas y de infiltrado inflamatorio; así como nula presencia de células necróticas y apoptóticas. En este sentido, las MSP tuvieron un mejor efecto que la silimarina, los cortes hepáticos de las ratas tratadas con MSP mostraron menos daño inducido por el CCl<sub>4</sub>: se registró esteatosis grado 1 (23.33%),



**Figura 9.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) sobre la morfología hepática de la estructura porta de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). A) Grupo control negativo: agua pura ad libitum. B) Grupo control vehículo: solución salina (0.09% p/v), vía p.o. C) Grupo MSP: MSP (33 mg/kg, vía i.p.). D) Grupo CCl<sub>4</sub> (control hepatotóxico): daño hepático tóxico agudo (DHTA) inducido por CCl<sub>4</sub> (1.25 mL/kg, vía i.p.). E) Grupo silimarina + CCl<sub>4</sub>: pretratamiento con silimarina vía p.o. (50 mg/kg de peso disuelta en solución salina 0.09% p/v), posterior tratamiento con CCl<sub>4</sub>. F) Grupo MSP + CCl<sub>4</sub>: pretratamiento con MSP (33 mg/kg, vía i.p.) y posteriormente tratadas con CCl<sub>4</sub>. Los cuadrados enmarcan algunos hepatocitos con esteatosis macrovesicular. VP: Vena Porta. Tejidos teñidos con H&E, aumento de 10X.



**Figura 10.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) sobre la morfología hepática de la vena central de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). A) Grupo control negativo: agua pura ad libitum. B) Grupo control vehículo: solución salina (0.09% p/v), vía p.o. C) Grupo MSP: MSP (33 mg/kg, vía i.p.). D) Grupo CCl<sub>4</sub> (control hepatotóxico): daño hepático tóxico agudo (DHTA) inducido por CCl<sub>4</sub> (1.25 mL/kg, vía i.p.). E) Grupo silimarina + CCl<sub>4</sub>: pretratamiento con silimarina vía p.o. (50 mg/kg de peso disuelta en solución salina 0.09% p/v), posterior tratamiento con CCl<sub>4</sub>. F) Grupo MSP + CCl<sub>4</sub>: pretratamiento con MSP (33 mg/kg, vía i.p.) y posteriormente tratadas con CCl<sub>4</sub>. Las elipses enmarcan algunos hepatocitos con esteatosis macrovesicular. VP: Vena Porta. Tejidos teñidos con H&E, aumento de 40X.



**Figura 11.** Efecto de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) sobre la morfología hepática de parénquima de ratas Wistar con daño hepatotóxico agudo (DHTA). A) Grupo control negativo: agua pura ad libitum. B) Grupo control vehículo: solución salina (0.09% p/v) vía p.o. C) Grupo MSP: MSP (33 mg/kg, vía i.p.). D) Grupo CCl<sub>4</sub> (control hepatotóxico): daño hepático tóxico agudo (DHTA) inducido por CCl<sub>4</sub> (1.25 mL/kg, vía i.p.). E) Grupo silimarina + CCl<sub>4</sub>: pretratamiento con silimarina vía p.o. (50 mg/kg de peso disuelta en solución salina 0.09% p/v), posterior tratamiento con CCl<sub>4</sub>. F) Grupo MSP + CCl<sub>4</sub>: pretratamiento con MSP (33 mg/kg, por vía i.p.) y posteriormente tratadas con CCl<sub>4</sub>. Los cuadrados enmarcan algunos hepatocitos con esteatosis macrovesicular. VP: Vena Porta. Tejidos teñidos con H&E, aumento de 40X.

principalmente en estructuras porta y parénquima (**Figura 9 y 11**); pocas células balonadas o infiltrado inflamatorio y nula presencia de células necróticas y apoptóticas. Adicionalmente, el tratamiento con MSP disminuyó la presencia de daño celular en la zona 3 evitando que el daño por intoxicación de radicales libres avanzara hacia la zona de la vena central.

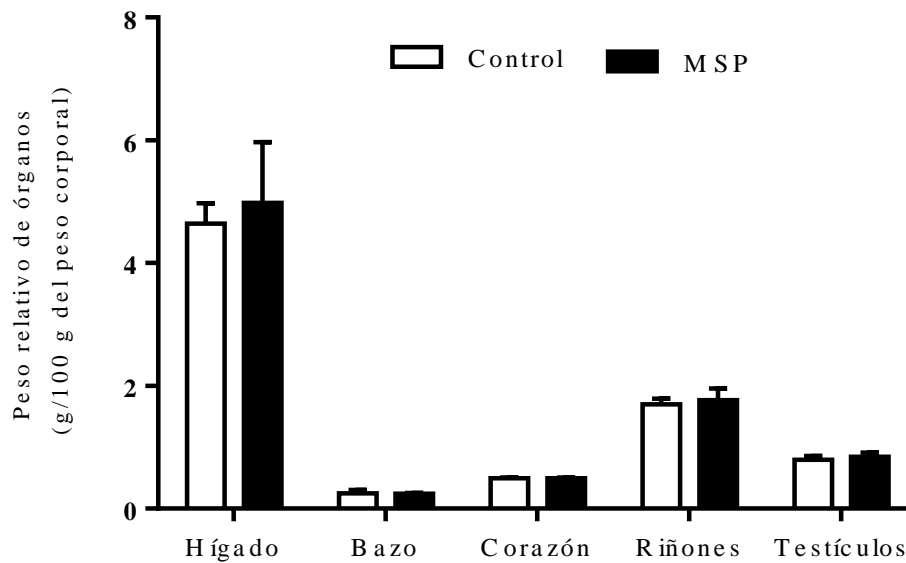
## **9.5 Estudio de toxicidad de las melaninas solubles de papache**

### **9.5.1 Evaluación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) por el método de Lorke**

Las MSP evaluadas hasta 5 g/kg de peso fueron inocuas en ratones, todos sobrevivieron al tratamiento las primeras 24 h. Los ratones mostraron un comportamiento normal en relación al control no tratado y estuvieron libres de síntomas de ataxia, hiperactividad o hipoactividad. Además, los ratones no presentaron efectos dañinos tardíos en comportamiento ni mortalidad durante los 30 días posteriores a la administración de la dosis de MSP. Al comparar ratones tratados con MSP y no tratados, la ganancia de peso y la relación “peso de órgano/peso de ratón” mostraron valores similares entre los grupos ( $p > 0.05$ ) (**Figura 12**).

### **9.5.2 Evaluación de toxicidad sub-aguda**

Los animales tratados con MSP (500 mg / kg de peso/ día / 30 días) mostraron un comportamiento normal y ausencia de signos de toxicidad. El peso corporal de los ratones y el peso relativo de sus órganos no se vieron afectados por el tratamiento con MSP (**Cuadro 2**).



**Figura 12.** Efecto tóxico agudo de la administración de melaninas solubles de papache (MSP) (5 g/kg: única dosis) en el peso relativo de órganos de ratón BALB/c. Los resultados se expresan en media  $\pm$  DE (n=3). Para un mismo tejido no se registró diferencia significativa entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 2.** Efecto tóxico sub-agudo en la ganancia de peso corporal y relación de peso órgano/peso corporal de ratones BALB/c tratados con melaninas solubles de papache (MSP) (500 mg/kg de peso corporal) por 30 días.

Género	Grupos	Ganancia de peso (g)	Peso relativo de órganos (g)/100 g del peso corporal					
			Hígado	Riñones	Corazón	Pulmones	Bazo	Testículos
Machos	Control	3.54 ± 0.702	5.36 ± 0.589	1.88 ± 0.064	0.75 ± 0.109	1.15 ± 0.114	0.37 ± 0.160	0.99 ± 0.085
	MSP	3.68 ± 0.640	6.13 ± 0.549	2.06 ± 0.174	0.67 ± 0.108	1.18 ± 0.140	0.51 ± 0.062	0.99 ± 0.074
Hembras	Control	2.42 ± 0.507	5.06 ± 0.395	1.55 ± 0.092	0.65 ± 0.053	1.32 ± 0.233	0.57 ± 0.057	-
	MSP	2.24 ± 0.208	5.53 ± 0.330	1.57 ± 0.130	0.67 ± 0.180	1.16 ± 0.150	0.57 ± 0.050	-

\* Los valores son la media ± desviación estándar; n = 5 machos y 5 hembras. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía (MSP vs. control). Al comparar el mismo sexo / órgano / parámetro, no hubo diferencias significativas.

Por otro lado, los parámetros hematológicos de los ratones no se vieron afectados por el tratamiento MSP (**Cuadro 3**), los animales tratados y control mostraron niveles normales de hemoglobina y hematocrito, descartando la presencia de anemia por deficiencia de hierro.

Los ratones tratados con MSP mostraron valores de glucosa en suero más altos que los de los animales de control, solo significativos para los machos. Por otro lado, los niveles de creatinina fueron significativamente más bajos en los animales tratados con MSP (**Cuadro 3**). Los niveles de transaminasas, AST y ALT, en los animales tratados con MSP estaban en el rango de valores de ratones sanos y fueron significativamente más altos que en los ratones no tratados. Además, los ratones tratados con MSP y sin tratar mostraron valores de proteínas totales similares (**Cuadro 3**).



**Cuadro 3.** Efecto tóxico sub-agudo en parámetros hematológicos y bioquímicos de ratones BALB/c tratados con melaninas solubles de papache (MSP) (500 mg/kg) durante 30 días.

Parámetros /Grupos	Machos			Hembras		
	Control	MSP (500 mg/kg)	Rango de referencia <sup>a</sup>	Control	MSP (500 mg/kg)	Rango de referencia <sup>a</sup>
HGB (g/dl)	14.38 ± 0.878	14.60 ± 1.969	11.6-15.8	14.86 ± 0.770	14.99 ± 0.872	11.6-15.8
HCT(%)	44.64 ± 2.732*	45.35 ± 6.137	37.4-51.7	46.64 ± 2.420	46.64 ± 2.675	37.4-51.7
GLU (mg/dL)	126.40 ±15.026	148.60 ±7.26*	65-163	103.00 ±15.033	115.25 ±5.620	79-145
CREA (mg/dl)	0.63 ± 0.141	0.45 ± 0.071*	0.2-0.8	0.80 ± 0.255	0.22 ± 0.034*	0.4-0.8
AST (U/L)	22.70 ± 5.014	55.4 ± 6.804*	24-472	32.34 ± 7.608	69.00 ± 12.040*	87-187
ALT (U/L)	33.82 ± 6.438	60.60 ± 14.415*	28-190	34.70 ± 7.669	58.00 ± 8.689*	56-159
Proteína total (g/dl)	4.68 ± 0.719	5.34 ± 0.391	4.9-5.8	4.96 ± 0.508	5.72 ± 0.176	5.1-6.3

Los valores son la media ± desviación estándar, n = 5 hembras y 5 machos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Fisher para el mismo sexo, MSP vs control, \*  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> Rangos de referencia: (Barrios y col., 2009; Santos y col., 2016; Kurtz y Travloz, 2018b)

## X DISCUSIÓN

### 10.1 Rendimiento de las melaninas solubles

El rendimiento de extracción (% en base seca, b.s.) para las MSP fue (4.05) similar a lo reportado en trabajos previos para MS de *R. echinocarpa* (MS = 5.01%) (Cuevas-Juárez y col., 2014) y superiores a los obtenidos para melaninas insolubles de diferentes materiales (%): *Camellia sinensis* (2), *Cinnamomum burmannii* (0.34), *Osmanthus fragrans* (0.34), *Vitex mollis* (0.16) y *Randia echinocarpa* (0.25) (Sava, Vasyl y col., 2001; Huang y col., 2011; Montes-Avila y col., 2018). La extracción de las melaninas insolubles implica el uso de ácidos y bases fuertes que rompen las interacciones de las melaninas con otras biomoléculas que les imparten solubilidad (*e.g.*, carbohidratos, lípidos, proteínas) y que explican los menores rendimientos para este tipo de melaninas. Asimismo, estudios previos han resaltado que el método de extracción de las MS es simple y amigable con el ambiente (Pío-León y col., 2018).

### 10.2 Características estructurales de melaninas solubles

#### 10.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) $^{13}\text{C}$ en estado sólido

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de las melaninas solubles de papache revela señales relacionadas a carbonos aromáticos/ olefínicos, metilenos con una cadena alifática adicional, carbonos oxigenados y los carbonilos de ácidos carboxílicos o amidas. Las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  en solución para melaninas insolubles de *V. mollis* y *R. echinocarpa* (Montes-Avila y col., 2018)

fueron similares a las obtenidas para las MS de *R. echinocarpa*: carbonilos, aromáticos, metilenos alifáticos de asociación de lípidos (-CH<sub>2</sub>), incluso en la presencia de estructuras derivadas de carbohidratos (hexosas, C-2 / C-6) y metilos de carbohidratos (CH-O- y C-); información que indica que los procesos drásticos de extracción de las melaninas insolubles son insuficientes para eliminar todas las moléculas de carbohidratos que tienen unidas (Montes-Avila y col., 2018). Además, las señales de RMN <sup>13</sup>C en estado sólido de la MSP fueron similares a las de carbonos aromáticos y carboxilos reportadas en algunas melaninas de origen natural y sintético (Park y col., 2008; Prados-Rosales y col., 2015).

### **10.2.2 Análisis elemental**

Los valores de la composición elemental de las MSP corresponden a una relación C:H:N 18:18:1. La baja proporción de H/C (1) sugiere la presencia de estructuras aromáticas y la relación de C/N (13.07) indica que las melaninas de *R. echinocarpa* son similares a las eumelaninas DHI/DHICA de *Cryptococcus neoformans* (C/N de 10.6 y sin S) (Prados-Rosales y col., 2015). Además, los valores registrados fueron similares a los de las melaninas extraídas de hojas de té negro (C 54.23±6.34%; N 3.17±0.52%; H 4.23±0.54%) (Sava, Vasyl y col., 2001).

## **10.3 Actividad inmunomoduladora de las melaninas solubles**

### **10.3.1 Actividad inmunomoduladora *in vitro***

Las MSP presentaron buena actividad inmunomoduladora al incrementar la proliferación de esplenocitos de ratón en porcentajes superiores a los presentados por los mitógenos utilizados, lo que sugiere que las MSP provocan una expansión policlonal inespecífica similar a la registrada para el LPS y la PHA, estos últimos son utilizados en varias aplicaciones biotecnológicas / biomédicas debido a su capacidad de inducir la proliferación celular (Hashim y col., 2017), lo que sugiere que las MSP pueden utilizarse para tales fines.

El aumento en la proliferación de esplenocitos inducido por las MSP es comparable al registrado para los extractos hidroalcohólicos de tres especies de *Echeveria* (20-34% de proliferación), que se ha asociado a la presencia de compuestos fenólicos presentes también en las moléculas de las melaninas. Además, el efecto es similar al obtenido para polisacáridos aislados del polen de *Crataegus pinnatifida* (33 % a 50 µg/mL) (Li y col., 2009) y de fresa (36% a 250 µg/mL) (Liu y Lin, 2014).

La proliferación de esplenocitos inducida por las MSP fue menor que la registrada para las melaninas insolubles de *R. echinocarpa* (25 µg/mL) (Montes-Avila y col., 2018), información que sugiere que los grupos fenólicos de las melaninas insolubles tienen una mayor contribución a la actividad inmunomoduladora; en este sentido, las melaninas insolubles tienen una mayor proporción de fenólicos por unidad de masa que las MSP. De manera similar, Lin y Tang (2007) establecieron una correlación positiva entre la proliferación de esplenocitos de ratón y el contenido de compuestos fenólicos de mora, fresa y cebolla. Sin embargo, la información generada no descarta que las moléculas que dan solubilidad a las MSP contribuyan a la actividad inmunomoduladora. En melaninas insolubles se han detectado polisacáridos, unidos covalentemente a melaninas, que sobreviven a los tratamientos enzimáticos y con ácidos

(Riley, 1997; El-Obeid y col., 2017). Asimismo, se ha sugerido que la solubilidad de las MSP se debe a la presencia de polisacáridos unidos a la estructura indólica de las melaninas; al respecto, un gran número de reportes han mostrado que polisacáridos inducen la proliferación de esplenocitos; *e.g.*, los aislados del polen de *Crataegus pinnatifida* (33% a 50 µg/mL) (Li y col., 2009), de fresa (36% a 250 µg/mL) (Liu y Lin, 2014) y de hojas de mora (Chen y col., 2019).

La actividad inmunomoduladora de melaninas de origen vegetal ya ha sido descrita. Ratones tratados con melaninas extraídas de té negro mostraron estimulación del tejido esplénico a dosis de 50-200 mg/kg, con una respuesta máxima de anticuerpos a la dosis de 75 mg/kg (Sava y col., 2001b). Por otro lado, ratones tratados con melaninas de *Echinacea* (10 mg/día) presentaron activación de monocitos por vía TLR2, así como incremento en los niveles de IFN- $\gamma$  en bazo y de IgA e IL-6 en placas de Peyer (Pugh y col., 2005). Además, líneas de monocitos y macrófagos THP-1 tratadas con melaninas de *Nigella sativa* incrementaron la expresión de mRNA de tres citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6 y VEGF) mediante la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (El-Obeid y col., 2006; Öberg y col., 2009), este incremento se asoció a la capacidad que tienen algunos antioxidantes de incrementar la expresión de este tipo de citocinas y la posibilidad de utilizar la melanina de *N. sativa* L. en el tratamiento de enfermedades asociadas con la producción desequilibrada de citocinas y otras inmunoterapias. De esta manera, el contenido de melaninas de diferentes plantas usadas en medicina tradicional puede explicar el uso de estas plantas contra diferentes enfermedades (Pugh y col., 2005)

### **10.3.2 Actividad inmunomoduladora *in vivo***

#### 10.3.2.1 Efecto de la administración de MSP en la proliferación de esplenocitos

En la evaluación inmunomoduladora *in vivo* en bazo, las melaninas solubles mostraron un efecto dosis respuesta. El aumento en la proliferación de esplenocitos puede explicarse con base en mecanismos reportados para la administración de melaninas de otras fuentes: el efecto en ratones tratados con melaninas de *Echinacea* fue asociado a la activación *in vitro* del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en monocitos por vía TLR2, al incremento de IFN- $\gamma$  en bazo y de IgA e IL-6 en placas de Peyer (Pugh y col., 2005; Pugh, N. D. y col., 2005); por otro lado, melaninas extraídas del hongo *Gliocephalotrichum simplex* mostraron un efecto radioprotector en ratones BALB/c irradiados, que fue atribuido a la capacidad de estas moléculas para proteger las células hematopoyéticas, evidenciado en la mejora de los parámetros del bazo como el número de células. Además, las melaninas revirtieron la disminución de la fosforilación de ERK inducida por radiación en el tejido esplénico, lo cual puede ser la característica clave en su acción radioprotectora (Kunwar y col., 2012).

#### 10.3.2.2 Efecto de administración oral de MSP en poblaciones linfocíticas del MLN y PP

La administración de MSP en ratones activa a los LT  $\gamma\delta$  (CD69<sup>+</sup>) provenientes de MLN pero los suprime en las PP. Al respecto se ha reportado que el microambiente de las PP favorece a la baja reactividad de células T a varios estímulos fisiológicos que son clave para el inicio de una respuesta inmune; esta condición puede deberse a la mayor expresión de citocinas como IL-

4 e IL-10 en PP que contrasta con la composición de los MLN (Kellermann y McEvoy, 2001; Jung y col., 2010).

Por otro lado, a diferencia de los LT  $\alpha\beta$ , los LT  $\gamma\delta$  reconocen ligandos que varían mucho en tamaño, composición y estructura molecular, que incluyen moléculas de superficie celular MHC y no MHC, proteínas solubles, péptidos más pequeños, fosfolípidos, pirofosfatos de prenilo y sulfátido. Algunas moléculas pueden ser reconocidas en complejos con otras moléculas (Born y col., 2017), lo que puede estar ocurriendo con las MSP: la caracterización química de las MSP por espectroscopia IR y RMN indica que tienen unidas a carbohidratos y/o lípidos, probables responsables de la activación de LT  $\gamma\delta$ . Los LT  $\gamma\delta$  cumplen diversas actividades biológicas: secreción de citocinas; inducción de muerte de células infectadas; además se ha propuesto que este subgrupo de linfocitos T puede iniciar respuestas inmunitarias contra microbios en los epitelios, antes del reclutamiento y activación de los LT  $\alpha\beta$  específicos frente a determinado antígeno (Abbas, 2015).

La activación de LT  $\gamma\delta$  por componentes dietarios ha sido poco estudiado. Sin embargo, esta reportado que el muérdago blanco aumenta los niveles de IL-12 (Heinzerling y col., 2006), una citocina implicada en la proliferación y la citotoxicidad de las células T  $\gamma\delta$ . Además, los extractos de muérdago (50-500 mg / L) aumentaron la proliferación de LT  $\gamma\delta$  *in vitro* de una manera dosis dependiente (Ghaedi y col., 2019). Por otro lado, en ratones con alergia alimentaria sensibilizados con ovoalbúmina se registró que el consumo de taninos condensados de manzanas disminuye la severidad de la anafilaxia; actividad que se asoció a un aumento significativo de los LT  $\gamma\delta$  en el epitelio intestinal de los ratones alimentados con los taninos (Akiyama y col., 2005). Con base en estos resultado, las MSP presentan potencial que deberá

ser más estudiado, en el campo de la inmunoterapia frente a infecciones y cáncer al activar los LT  $\gamma\delta$  los cuales tienen capacidad citotóxica no dependiente de MHC.

## **10.4 Actividad antioxidante de las melaninas solubles**

### **10.4.1 Actividad antioxidante *in vitro***

La actividad antioxidante *in vitro* de las MSP fue superior a la reportada en estudios previos de estas melaninas: 719.51  $\mu\text{mol ET/g}$  para ABTS y 351.77  $\mu\text{mol ET/g}$  para FRAP (Cuevas-Juárez y col., 2014). Esta diferencia puede asociarse al estado de madurez de los frutos y a la obtención de frutos recolectados en diferente tiempo y lugar, que implica diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico. Este efecto de “localidad” implica la generación de variabilidad en relación con el tipo y contenido de metabolitos secundarios, así como las variaciones en la estructura química de estructuras básicas por efecto de diferentes reacciones, *e.g.*, hidroxilación, metilación y epoxidación (Wink 1999).

En cuanto a la comparación de los valores de poder antioxidante de las MSP con los de extractos de otros frutos comunes, éstos fueron similares a los de extractos metanol/agua 50:50 v/v, posteriormente extraídos con acetona/agua 70:30 v/v, de cuatro variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.); los valores registrados fueron para variedad pera (ABTS  $846 \pm 50.9 \mu\text{mol Trolox/g}$ ; FRAP  $492 \pm 53.0 \mu\text{mol Trolox/g}$ ), manzana (ABTS  $166 \pm 10.0 \mu\text{mol Trolox/g}$ ; FRAP  $252 \pm 42.0 \mu\text{mol Trolox/g}$ ), regional roja (ABTS  $755 \pm 171.0 \mu\text{mol Trolox/g}$ ; FRAP  $541 \pm 73.0 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) y blanca (ABTS  $682 \pm 69.0 \mu\text{mol Trolox/g}$ ; FRAP  $450 \pm 57 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) (Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca 2009). Además, los resultados por ABTS fueron superiores



a lo registrado por Gutiérrez Zavala y col. (2007) para extractos acetónicos de frutas y vegetales: guayaba 28.5  $\mu\text{mol ET/g}$ , manzana 27.1  $\mu\text{mol ET/g}$ , papaya 25.1  $\mu\text{mol ET/g}$  y naranja 20.1  $\mu\text{mol ET/g}$ ; e incluso superiores para el rango reportado para extractos acuosos de granos de café de 450–630  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra (Liu y Kitts, 2011) por ABTS. Por otro lado, la actividad antioxidante *in vitro* de las MSP fue similar a la reportada para melanoidinas aisladas de café (ABTS 877 y FRAP 479  $\mu\text{mol ET/g}$ ) (Rufián-Henares y Morales, 2007), las cuales presentan características estructurales y fisicoquímicas similares a las melaninas.

#### **10.4.2 Actividad antioxidante *in vivo***

##### 10.4.2.1 Determinación de enzimas séricas de ratas tratadas

El  $\text{CCl}_4$  aumenta su toxicidad al ser metabolizado por las enzimas CYP2E1, CYP2B y CYP3; su metabolismo produce radicales libres como triclorometilo ( $\text{CCl}_3^{\bullet}$ ), el cual es altamente inestable y posee la habilidad de reaccionar con diversas biomoléculas de gran importancia: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, afectando la integridad celular (Mochizuki y col., 2009). Un fenómeno similar se presenta cuando el organismo incrementa sin control los niveles de ERO, éstas pueden afectar membranas, DNA y otras moléculas y generar estados patológicos (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999).

Diversos estudios han demostrado el efecto hepatoprotector de extractos de fuentes vegetales: *e.g.*, acuoso de *Ginkgo biloba* y de *Hygrophila auriculata*, etanólico de *Vitis vinifera* y metanólico de *Trichsanthes cucumerina*. Los extractos disminuyeron los niveles de las

enzimas séricas ALT, ALP y AST en modelos de daño hepático por CCl<sub>4</sub> (Shenoy y col., 2001; Murugan y col., 2013)

Considerando los parámetros ALT y ALP, las MSP (33 mg/kg/día/3 d) presentaron un efecto hepatoprotector, ante el daño ocasionado por CCl<sub>4</sub>, que fue superior al registrado con el fármaco utilizado como referencia silimarina. En comparación con los valores de ALT y ALP para el control hepatotóxico, el uso profiláctico de silimarina y MSP disminuyó la concentración de la enzima ALT, el efecto fue similar al reportado para melaninas de té negro, cuyo efecto protector fue asociado a su capacidad de neutralizar los radicales libres producidos por el tratamiento de los animales con hidrazina (Sava, 2003); de igual manera, la concentración de ALP disminuyó en ratas tratadas con MSP, lo que sugiere que pueden usarse como agente protector contra enfermedades hepatobiliares, en situaciones de colestasis donde se acumulan ácidos biliares y otras sustancias que producen liberación de radicales libres.

En el caso de los niveles de la enzima AST, los tratamientos con silimarina y MSP mostraron valores similares a los del control hepatotóxico lo que indicaría poca o nula protección ante el daño. Sin embargo, la enzima AST se encuentra en mayor cantidad en órganos como corazón y músculos que en hígado (Gao y col., 2017), por lo que existe la posibilidad que la administración del tóxico y/o tratamientos genere complicaciones en otros órganos y se encuentre elevada en suero como consecuencia del daño celular. Al respecto, nuestro estudio se enfoca principalmente en demostrar la actividad antioxidante *in vivo* mediante la disminución de la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub>; en este modelo, los antioxidantes eliminan o reducen la concentración de los radicales libres (*e.g.*, CCl<sub>3</sub><sup>•</sup>) generados por el metabolismo hepático del CCl<sub>4</sub>, proceso mediado por enzimas de la familia citocromo P450 (CYP2E1, CYP2B y CYP3) (Fung y Pysopoulos, 2017). De no controlarse, los radicales libres dañan a diversas

biomoléculas y la progresión del ciclo celular (Mochizuki y col., 2009); en este sentido, la ALT se expresa más en el hígado y su disminución considerable en ratas con daño hepático agudo tratadas con MSP indica que las melaninas tienen un mayor efecto protector en el hígado; actividad que puede deberse a la actividad antioxidante directa de las MSP y específicamente a los grupos funcionales presentes en su estructura (*e.g.*, hidroxilos, fenólicos y/o carboxilos) que pueden aceptar electrones desapareados o transferir átomos de hidrógeno (Cuevas-Juárez y col., 2014); en otra posibilidad, la actividad protectora de las MSP podría asociarse a la inhibición de la actividad de las enzimas del citocromo P450 encargadas de metabolizar el CCl<sub>4</sub> y de esta manera evitar que aumente su toxicidad (Orhan y col., 2007; Mochizuki y col., 2009).

#### 10.4.2.2 Efecto de MSP en la concentración de GSH en tejido hepático y MDA en suero

El GSH es una importante defensa antioxidante de las células del cuerpo, el GSH inactiva las ERO e impide que dañen biomoléculas de membranas y organelos. El incremento significativo en GSH generado por el pretratamiento con silimarina y MSP en ratas con DHTA en comparación al grupo de ratas con DHTA sin tratamiento previo, sugiere que ambos tratamientos mejoran la defensa celular contra los radicales libres producidos por CCl<sub>4</sub>. Estos resultados son comparables a lo presentado por el extracto seco de *Ginkgo biloba* (0.24 mg de ginkgo flavonglucósidos/ g de extracto seco) (50 mg/kg) y silimarina como droga de referencia (200 mg/kg de peso) en el mismo modelo utilizado en este trabajo; estos tratamientos incrementaron los niveles de GSH en condiciones de estrés oxidativo provocada por el DHTA, a pesar que el grupo hepatotóxico no disminuyó su concentración en comparación con el grupo

control sin daño (Shenoy y col., 2001). Además, Sava y col. (2003) demostraron que ratas pretratadas con melanina derivada de té negro fermentado (MLP) e hidrazina mostraron mayores niveles de glutatión en hígado que las tratadas solamente con hidrazina.

Por otro lado, el MDA es indicador del grado de lipoperoxidación, que a su vez está asociado al estrés oxidativo de procesos fisiopatológicos. La lipoperoxidación forma MDA y 4-hidroxinonal (4-HNE) como productos de reacción, por lo que la medición de éstos permite cuantificar el daño por estrés oxidante. Los tratamientos con silimarina y MSP disminuyeron la concentración de MDA en suero de ratas sometidas a DHTA, indicando su efecto hepatoprotector. De manera similar a nuestros resultados, el tratamiento de ratones envejecidos con D-galactosa tratados con melanina de *Lachnum singerianum* YM296 (LIM) elevó los niveles de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y disminuyó el nivel de MDA, sugiriendo un efecto anti-envejecedor de las LIM (Lu y col., 2014); considerando que la deficiencia de antioxidantes, como el glutatión, contribuye al estrés oxidativo, que desempeña un papel clave en el envejecimiento y la patogénesis de muchas enfermedades.

#### 10.4.2.3 Evaluación histopatológica de tejido hepático

El CCl<sub>4</sub> incrementa la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos a partir de acetato y también la esterificación de lípidos. El incremento de la esterificación de ácidos grasos es una respuesta secundaria a partir de otros efectos inducidos por el metabolismo del CCl<sub>4</sub>; por ejemplo, la inhibición de la  $\beta$ -oxidación y/o disminución de la secreción lipídica celular probablemente debido a que el CCl<sub>4</sub> podría aumentar el transporte de acetato hacia las células hepáticas,

resultando en una mayor disponibilidad de sustrato (Lien y col., 2017). Este tipo de eventos sumados a la inhibición de la  $\beta$ -oxidación y la inhibición de la movilización de VLDL promueven la disponibilidad de ácidos grasos y su mayor esterificación favoreciendo, por lo tanto, la acumulación de lípidos (vacuolas lipídicas) en citoplasma en hepatocitos, como se observó en el presente estudio (Weber y col., 2003).

Al respecto, nuestros resultados indican que la silimarina disminuyó la esteatosis macro y microvesicular en ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$ ; la protección puede deberse a que los flavonoides que componen a la silimarina (silibina, silidianina y silicristina) protegen la membrana celular externa de los hepatocitos, evitando la entrada de sustancias tóxicas y aumentando la síntesis de proteínas y con ello la capacidad de regeneración hepática (Upadhyay y col., 2007).

Por su parte, el tratamiento con MSP disminuyó la esteatosis de mejor manera que la silimarina, indicando que las MSP son mejores hepatoprotectores contra el daño oxidativo y/o inactivadores de los radicales libres generados por el tratamiento con  $\text{CCl}_4$ . Considerando estudios previos sobre el papel de diferentes melaninas como antioxidantes (Shcherba y col., 2000; Rita y col., 2005; Kumar y col., 2011), el efecto hepatoprotector de las MSP puede deberse a su actividad antioxidante. De manera similar, El-Obeid y col. (2015) estudiaron el efecto de la melanina de semillas de *Nigella sativa* en ratas Wistar con daño hepático por  $\text{CCl}_4$ , evidenciando un potente efecto hepatoprotector asociado a la actividad antioxidante de la melanina y su actividad inmunomoduladora a través de la activación del receptor tipo Toll 4 y la posterior liberación de IL-6, ya que diversos estudios han sugerido que las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  actúan como reguladores clave en la regeneración y protección hepática (Fukumura y col., 2007; Gewiese-Rabsch y col., 2010).

En términos funcionales, el hígado está organizado en acinos que reciben sangre de la arteria hepática y de la vena porta procedente de las áreas portales o porta (zona 1), que luego fluye por los sinusoides hasta las venas hepáticas terminales (zona 3); los hepatocitos que están en el área intermedia constituyen la zona 2 (Longo y col., 2012). Al respecto, la disminución de daño celular en la zona tres del acino hepático en ratas con DHTA tratadas con MSP indica que las melaninas evitaron que el daño por intoxicación de radicales libres avanzara hacia la zona de la vena central. Estos resultados sugieren que el efecto hepatoprotector de las MSP en el daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> en ratas podría deberse a diversos mecanismos como: inhibición de la actividad del citocromo P450; prevención de la peroxidación lipídica y estabilización de la membrana del hepatocito; y liberación de citocinas clave en la protección celular.

## **10.5 Estudio de toxicidad de las melaninas solubles de papache**

### **10.5.1 Evaluación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) por el método de Lorke**

La inocuidad de las melaninas solubles de papache presentada en ratones administrados con dosis elevada cumplieron lo esperado, ya que es común que los organismos productores de melanina usen el polímero como mecanismo de protección contra diferentes agentes como la radiación o los metales tóxicos, y las melaninas se han usado comúnmente para evitar la toxicidad de diferentes compuestos, incluidos los medicamentos, pero los estudios sobre la toxicidad de la melanina son escasos (Solano, 2014; El-Obeid y col., 2017). La citotoxicidad de las melaninas de *Aspergillus nidulans* se ha evaluado en células de ratón; donde la toxicidad a

100 µg/ mL fue baja en los macrófagos, así como en las células de fibroblastos McCoy ( $IC_{50} = 373.5 \mu\text{g/ mL}$ ) (Gonçalves y col., 2013).

### **10.5.2 Evaluación de toxicidad sub-aguda**

El comportamiento y la mortalidad de los animales tratados con 500 mg / kg de peso corporal de MSP sugiere su inocuidad (Asare y col., 2012; Araújo y col., 2017). La variación en el aumento de peso corporal es un parámetro de toxicidad simple después de la exposición a agentes tóxicos, este parámetro brinda información sobre cambios fisiológicos como los trastornos hormonales y hepáticos y la disminución de la absorción de nutrientes (Lee y col., 2012). Además, la variación del peso corporal puede afectar el peso de los órganos internos (Teo y col., 2002). Los resultados de este estudio sugirieron que los parámetros fisiológicos/metabólicos de los ratones no se vieron afectados por la ingesta prolongada de MSP.

Los parámetros hematológicos de ratones BALB/c tratados con MSP reflejaron oxigenación normal sin riesgo de anemia. Por lo tanto, estos resultados sugieren el buen estado fisiológico de los animales tratados al considerar que el sistema hematopoyético es un objetivo común y sensible de compuestos tóxicos (Mukinda y Syce, 2007; Jatsa y col., 2018).

Por otro lado, los ratones tratados y no tratados con MSP mostraron parámetros bioquímicos en el rango de valores de los ratones sanos (Santos y col., 2016; Kurtz y Travloz, 2018a), sin embargo, se registraron algunas diferencias entre los grupos.

La creatinina es un marcador de toxicidad renal, sus niveles aumentan en el suero cuando la corteza y/o el tejido glomerular están dañados (Atsafack y col., 2015). En este caso, la disminución de los niveles de creatinina sérica en ratones tratados con MSP sugiere que el

tratamiento probablemente esté mejorando la fisiología renal. En contraste con hallazgos anteriores de Vargas-Solis y Pérez-Gutiérrez (2002) que mostraron que el extracto acuoso de *Randia echinocarpa* (10-60 mg/kg/dosis única) causó un aumento significativo en la actividad diurética pero también la formación de cálculos renales. Los resultados en esta investigación mostraron que las MSP aisladas de un extracto acuoso (rendimiento de extracción <5%) no indujeron daño renal en ratones tratados con MSP en el ensayo subagudo (500 mg / kg por 30 días).

Por otro lado, el aumento de concentración de glucosa en animales con tratamiento de MSP probablemente está asociado con el contenido de carbohidratos de las MSP o bien a la mejora de su biodisponibilidad en el intestino.

Los niveles de transaminasas AST y ALT fueron significativamente mayores en los ratones tratados con MSP que en los ratones no tratados. Estas enzimas son marcadores de la función hepática y los valores elevados sugieren daño hepático (Rhiouani y col., 2008). Sin embargo, los valores en los animales tratados con MSP estaban en el rango encontrado en ratones sanos y la elevación pudo ser causada por la liberación celular asociada con el daño reversible de las células hepáticas (Kifayatullah y col., 2015); los valores totales de proteína de los ratones machos y hembras tratados con MSP fueron similares a los de los ratones de control correspondientes, lo que sugiere que el funcionamiento hepático es adecuado (Araújo y col., 2017). Con base en estos resultados, se necesitan estudios adicionales sobre la toxicidad crónica y los efectos histológicos de las MSP.

Esta investigación sustenta la utilización del papache como remedio tradicional contra enfermedades asociadas al estrés oxidativo y el estado inmunológico de acuerdo a las actividades registradas para las MSP: activación mitogénica *in vitro*; al ser ingeridas por ratones



tienen efecto mitogénico en baso y pueden activar células del sistema inmunológico (linfocitos T  $\gamma\delta$ ); efecto antioxidante hepatoprotector al disminuir la progresión del DHTA inducido por CCl<sub>4</sub> en modelo de rata; e inocuidad en modelos de toxicidad aguda y sub-crónica. Adicionalmente, estos resultados sugieren que las MSP son ingredientes seguros en el desarrollo de productos funcionales dirigidos a la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónico degenerativas o infecciosas.

## XI CONCLUSIONES

### 11.1 Conclusión general

Las melaninas solubles del fruto *Randia echinocarpa* presentan actividades inmunomoduladora y antioxidante *in vivo* sin causar toxicidad aguda o sub-aguda en ratones BALB/c.

### 11.2 Conclusiones específicas

1. Las MSP presentan actividad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo*: en esplenocitos de ratón BALB/c incrementaron la proliferación celular de manera similar a los mitógenos utilizados (LPS y PHA), lo que sugiere que las MSP provocan una expansión policlonal inespecífica; y en ratones BALB/c tratados con MSP se incrementó la proliferación de esplenocitos y la activación de Linfocitos T  $\gamma\delta$  de Ganglios Linfocíticos Mesentéricos, considerando la importancia de estas células se sugiere que la actividad inmunomoduladora de las MSP puede presentar potencial que deberá ser más estudiado en el campo de la inmunoterapia frente a infecciones y cáncer.

2. Las MSP presentaron un efecto antioxidante hepatoprotector en ratas Wistar macho: las MSP disminuyeron la progresión del DHTA inducido por CCl<sub>4</sub> asociado a la capacidad antioxidante de las MSP y/o a su capacidad de inhibir la actividad de enzimas citocromo P450.

3. Las MSP fueron inocuas en ratones BALB/c y podrían usarse como ingredientes seguros para desarrollar productos funcionales: las melaninas fueron inocuas en los ensayos de toxicidad aguda ( $LD_{50} > 5 \text{ g / kg}$ ) y sub-aguda (sin letalidad a 500 mg / kg por 30 días).

## XII LIMITACIONES

1. El bajo rendimiento de extracción de las melaninas solubles, que llevó alrededor de 2 años de trabajo.
2. Dificultad para dilucidar la estructura de las melaninas debido a su alto peso molecular y gran variedad de componentes que las conforman, así como a las características intrínsecas de la muestra (*e.g.*, alta higroscopicidad).
3. Escases de estudios previos sobre melaninas solubles de plantas en modelos *in vivo* que nos permitieran elegir las dosis y dilucidar su mecanismo de acción.
4. Las diferencias metabólicas entre los modelos murinos empleados en este estudio con el humano.

### XIII BIBLIOGRAFIA

- Abbas K, Lichtman A y Pillai S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. 8a Ed. pp. 34-87. Barcelona, España. E. Inc.
- Abid S, Khajuria A, Parvaiz Q, Sidiq T, Bhatia A, Singh S, Ahmad S, Randhawa M, Satti N. (2012). Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunus cerasus* in BALB/c mice. *Int Immunopharmacol* 12(4): 626-634. doi:10.1016/j.intimp.2012.02.001
- Agyare C, Akindele AJ y Steenkamp V. (2019). Natural products and/or isolated compounds on wound healing. *Evid Based Compl Alt Med* 2019(1): 1-3. doi: 10.1155/2019/4594965.
- Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, Kanda T, Yamada K, Totsuka M. (2005). Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett* 579(20): 4485-4491. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.019
- Al-Mufarrej S, Hassib A y Hussein M. (2006). Effect of melanin extract from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.) on humoral antibody response to sheep red blood to cells in albino rats. *J Appl Anim Res* 1(1): 37-41. doi:10.1080/09712119.2006.9706567
- Al Mofleh IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Sohaibani MO, Al-Yahya MA, Rafatullah S y Shaik SA. (2008). Gastroprotective effect of an aqueous suspension of black cumin *Nigella sativa* on necrotizing agents-induced gastric injury in experimental animals. *Saudi J Gastroenterol* 14(3): 128. doi:10.4103/1319-3767.41731

- Alonso-Castro AJ, Juárez-Vázquez MdC y Campos-Xolalpa N. (2016). Medicinal plants from Mexico, Central America, and the Caribbean used as immunostimulants. *Evid Based Compl Alt Med* 2016(4): 1-15. doi:10.1155/2016/4017676
- Ando I, Tsukumo Y, Wakabayashi T, Akashi S, Miyake K, Kataoka T y Nagai K. (2002). Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- $\kappa$ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int Immunopharmacol* 2(8): 1155-1162. doi:10.1016/s1567-5769(02)00076-0
- Araújo MCdPM, Barcellos NMS, Vieira PMdA, Gouveia TM, Guerra MO, Peters VM y Saúde-Guimarães DA. (2017). Acute and sub chronic toxicity study of aqueous extract from the leaves and branches of *Campomanesia velutina* (Cambess) O. Berg. *J Ethnopharmacol* 201(2): 17-25. doi:10.1016/j.jep.2017.02.043
- Araya H, Clavijo C y Herrera C. (2006). Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Arch Latinoam Nutr* 56(4): 361-365.
- Asare GA, Gyan B, Bugyei K, Adjei S, Mahama R, Addo P, Otu-Nyarko L, Wiredu EK y Nyarko A. (2012). Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. *J Ethnopharmacol* 139(1): 265-272. doi:10.1016/j.jep.2011.11.009
- Atsafack SS, Kuate JR, Mouokeu RS, Koanga Mogtomo ML, Tchinda AT, De Dieu TJ, Magnifouet Nana H, Ebelle Etame RM, Biyiti L. (2015). Toxicological studies of stem bark extract from *Schefflera barteri* Harms (Araliaceae). *Evid Based Compl Alt Med* 15(1): 44. doi:10.1186/s12906-015-0581-z

- Avramidis N, Kourounakis A, Hadjipetrou L y Senchuk V. (1998). Anti-inflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. *Arzneim Forsch* 48(7): 764-771.
- Ayoub Z y Mehta A. (2018). Medicinal plants as potential source of antioxidant agents: a review. *Asian J Pharm Clin Res* 11(6): 50-56. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11i6.24725
- Barbosa K, Bressan J, Zulet M y Martínez J. (2008). Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *An Sist Sanit Navar* 31(3): 259-280.
- Barrios M, Rodríguez–Acosta A, Gil A, Salazar AM, Taylor P, Sánchez EE, Arocha–Piñango CL y Guerrero B. (2009). Comparative hemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thromb Res* 124(3): 338-343. doi:10.1016/j.thromres.2008.11.001
- Benzie IF y Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1): 70-76.
- Benzie IF y Szeto Y. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem* 47(2): 633-636. doi:10.1021/jf9807768
- Besedovsky HO y Del Rey A. (2006). Regulating inflammation by glucocorticoids. *Nature Immunology* 7(6): 537-537. doi:10.1038/ni0606-537
- Blinova M, Yudintseva N, Kalmykova N, Kuzminykh E, Yurlova N, Ovchinnikova O y Potokin I. (2003). Effect of melanins from black yeast fungi on proliferation and differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts. *Cell Biol Int* 27(2): 135-146. doi:10.1016/s1065-6995(02)00297-4
- Bonneville M, O'brien RL y Born WK. (2010).  $\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10(7): 467. doi:10.1038/nri2781

- Born WK, Huang Y, Reinhardt RL, Huang H, Sun D y O'Brien RL. (2017).  $\gamma\delta$  T cells and B cells. *Adv Immunol* 134(1): 1-45. doi:10.1016/bs.ai.2017.01.002
- Brewer M. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci F* 10(4): 221-247. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
- Burkhart CG y Burkhart CN. (2005). The mole theory: primary function of melanocytes and melanin may be antimicrobial defense and immunomodulation (not solar protection). *Int J Dermatol* 44(4): 340-342. doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02556.x
- Bye R, Linares E, Mata R, Albor C, Castaneda P y Delgado G. (1991). Ethnobotanical and phytochemical investigation of *Randia echinocarpa* rubiaceae. *An Inst Biol Univ Nac Auton Mex Zool* 62(1): 87-106.
- Cabrera JC, Hernández JC, Gómez MDRÁ, Hernández JLF, Infante MR, López LM, Díaz AL, Arteaga CÁ, Hernández MR. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo. (Tesis de Licenciatura), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.
- Cabrera L. (2000). Caracterización Fisicoquímica y Nutricional del Fruto de Papache (*Randia echinocarpa*). (Tesis de Licenciatura), Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin.
- Cano-Campos M, Díaz-Camacho S, Uribe-Beltran MJ, López-Angulo G, Montes-Avila J, Paredes-López O y Delgado-Vargas F. (2011). Bio-guided fractionation of the antimutagenic activity of methanolic extract from the fruit of *Randia echinocarpa* (Sessé et Mociño) against 1-nitropyrene. *Food Res Int* 44(9): 3087-3093. doi:10.1016/j.foodres.2011.08.006

- Carding SR y Egan PJ. (2002).  $\gamma\delta$  T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2(5): 336. doi:10.1038/nri797
- Chen H-Y, Lin Y-C y Hsieh C-L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem* 104(4): 1418-1424. doi:10.1016/j.foodchem.2007.02.004
- Chen S-L, Yu H, Luo H-M, Wu Q, Li C-F y Steinmetz A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin Med* 11(1): 37. doi:10.1186/s13020-016-0108-7
- Chen X, Sheng Z, Qiu S, Yang H, Jia J, Wang J y Jiang C. (2019). Purification, characterization and *in vitro* and *in vivo* immune enhancement of polysaccharides from mulberry leaves. *PloS one* 14(1): e0208611. doi:10.1371/journal.pone.0208611
- Chinedu E, Arome D y Ameh FS. (2013). A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicol Inter* 20(3): 224. doi:10.4103/0971-6580.121674
- Cichoż-Lach H y Michalak A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 20(25): 8082-8091. doi:10.3748/wjg.v20.i25.8082
- Cuevas-Juárez E, Yuriar-Arredondo KY, Pío-León JF, Montes-Avila J, López-Angulo G, Díaz-Camacho SP y Delgado-Vargas F. (2014). Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *J Funct Foods* 9(1): 78-88. doi:10.1016/j.jff.2014.04.016
- d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, Di Mauro E, Garcia-Borron JC, Commo S, Galván I, Ghanem G, Kenzo K. (2015). Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human



- health and technological applications. *Pigment Cell Melanoma Res* 28(5): 520-544.  
doi:10.1111/pcmr.12393
- El-Obeid, El Tahir K, Abdelhalim M y Haseeb A. (2015). Protective action of herbal melanin against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Int J Chem Eng Appl* 2(1): 1-6.  
doi:10.15224/ 978-1-63248-055-2-01
- El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N y Hassib A. (2006). Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine* 13(5): 324-333.  
doi:10.1016/j.phymed.2005.03.007
- El-Obeid A, ELTahir KEH, Elhag H y Haseeb AM. (2015). Anti-ulcerogenic effects of *Nigella sativa* L. melanin. *World J Pharm Res* 5(1): 579-1593.
- El-Obeid AS, Kamal-Eldin A, Abdelhalim MAK y Haseeb AM. (2017). Pharmacological properties of melanin and its function in health. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 120(6): 515-522. doi:10.1111/bcpt.12748
- El-Obeid A, ELTahir KEH y Haseeb AM. (2015). Anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* L. Melanin. *World J Pharm Res* 5(2): 155-161.
- Engel LW y Straus SE. (2002). Business outlook: Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. *Nat Rev Drug Discov* 1(3): 229.  
doi:10.1038/nrd750
- Favari L, Arce-Díaz C, Ortíz-Martínez J, Pablo-Pérez S, Soto C y Meléndez-Camargo ME. (2013). Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Rev Mex Cienc Farm* 44(4): 53-61.

- Fukumura A, Tsutsumi M, Tsuchishima M, Hayashi N, Fukura M, Yano H, Ozaki K y Takase S. (2007). Effect of the inducer of interleukin-6 (ME3738) on rat liver treated with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 31(1): 49-53. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00286.x
- Fung P y Pysopoulos N. (2017). Emerging concepts in alcoholic hepatitis. *World J Hepatol* 9(12): 567. doi:10.4254/wjh.v9.i12.567
- Gao M, Cheng Y, Zheng Y, Zhang W, Wang L y Qin L. (2017). Association of serum transaminases with short-and long-term outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc Disord* 17(1): 43. doi:10.1186/s12872-017-0485-6.
- García-Borrón JC y Solano F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* 15(3): 162-173. doi:10.1034/j.1600-0749.2002.02012.x
- García Hernández M, Guerrero Ramírez G, Castro Corona MdlÁ y Medina de la Garza CE. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Med Uni* 11(45): 247-259.
- Gershwin ME, Nestel P y Keen CL. (2004). Handbook of nutrition and immunity. 1ra Ed. pp. 230-239. Totowa, NJ. Humana
- Gewiese-Rabsch J, Drucker C, Malchow S, Scheller J y Rose-John S. (2010). Role of IL-6 trans-signaling in CCl4 induced liver damage. *Biochim Biophys Acta* 1802(11): 1054-1061. doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.023
- Ghaedi E, Rezaei N y Mahmoudi M. (2019). Nutrition, immunity, and cancer. En *Nutrition and Immunity* (pp. 209-281):

- Gieseler RK, Marquitan G, Scolaro MJ y Schwarz A. (2012). Liposomas derivatizados con hidratos de carbono para la selección como diana de dominios de reconocimiento de hidratos de carbono celulares de lectinas CTL/CTLD y suministro intracelular de compuestos terapéuticamente activos. In: Google Patents.
- Gonçalves RdCR, Kitagawa RR, Raddi MSG, Carlos IZ y Sponchiado SRP. (2013). Inhibition of nitric oxide and tumour necrosis factor- $\alpha$  production in peritoneal macrophages by *Aspergillus nidulans* melanin. *Biol Pharm Bull* 36(12): 1915-1920. doi:10.1248/bpb.b13-00445
- Goodman LS, Laurence LB, Chabner B y Knollmann BC. (2011). Immunosuppressants, tolerogens and immunostimulants. 12 Ed. pp. M.-H. Medical
- Gutiérrez Zavala Á, Ledesma Rivero L, García García I y Grajales Castillejos O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Rev Cub Salud Pública* 33(1): 78-91.
- Harki E, Talou T y Dargent R. (1997). Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chem* 58(1-2): 69-73. doi:10.1016/S0308-8146(96)00215-4
- Hashim OH, Jayapalan JJ y Lee C-S. (2017). Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ* 5(1): e3784. doi:10.7717/peerj.3784
- Heinzerling L, Von Baehr V, Liebenthal C, Von Baehr R y Volk H-D. (2006). Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*. *J Clin Immunol* 26(4): 347-359. doi:10.1007/s10875-006-9023-5

- Holderness J, Jackiw L, Kimmel E, Kerns H, Radke M, Hedges JF, Petrie C, McCurley P, Glee PM. (2007). Select plant tannins induce IL-2R $\alpha$  up-regulation and augment cell division in  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 179(10): 6468-6478. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6468
- Hong SG, Hwang YH, Mun SK, Kim SJ, Jang HY, Kim H, Paik MJ y Yee ST. (2019). Role of Th2 cytokines on the onset of asthma induced by meta-xylene in mice. *Environ Toxicol* 34(10): 1121-1128.
- Hoogduijn M, Smit N, Van Der Laarse A, Van Nieuwpoort A, Wood J y Thody A. (2003). Melanin has a role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 16(2): 127-132. doi:10.1034/j.1600-0749.2003.00018.x
- Huang S, Pan Y, Gan D, Ouyang X, Tang S, Ekunwe SI y Wang H. (2011). Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans*. *Med Chem Res* 20(4): 475-481. doi:10.1007/s00044-010-9341-2
- Hung Y-C, Huang GS, Sava VM, Blagodarsky VA y Hong M-Y. (2006). Protective effects of tea melanin against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity: antioxidant activity and aryl hydrocarbon receptor suppressive effect. *Biol Pharm Bull* 29(11): 2284-2291. doi:10.1248/bpb.29.2284
- Hung Y-C, Sava V, Blagodarsky V, Hong M-Y y Huang G. (2003). Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury. *Life Sci* 72(9): 1061-1071. doi:10.1016/S0024-3205(02)02348-2
- Hung Y-C, Sava VM, Makan SY, Chen T-HJ, Hong M-Y y Huang GS. (2002). Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states. *Food Chem* 78(2): 233-240. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00403-4

- Hung YC, Steven Huang G, Sava VM, Makan SY y Hong MY. (2008). *Camellia sinensis* tea melanin suppresses transformation of the aryl hydrocarbon receptor and prevents against dioxin-induced toxicity in mice. *Int J Food Sci Tech* 43(2): 261-269. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01428.x
- Jatsa H, Fassi J, Kenfack M, Gipwe N, Kameni M, Simo N, Nkondo E, Dongmo A y Tchuenta L. (2018). Acute and sub-chronic oral toxicity studies of the leaves aqueous extract of *Clerodendrum umbellatum* Poir. on mice. *A J Physiol Biochem Pharmacol* 7(75). doi:10.5455/ajpbp.20180616012821
- Jung C, Hugot J-P y Barreau F. (2010). Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *Int J Inflamm* 2010(1): 1-12. doi:10.4061/2010/823710
- Kamei H, Koide T, Hashimoto Y, Kojima T, Hasegawa M y Umeda T. (1997). Effect of allomelanin on tumor growth suppression *in vivo* and on the cell cycle phase. *Cancer Biother Radiopharm* 12(4): 273-276. doi:10.1089/cbr.1997.12.273
- Kamei H, Koide T, Kojima T, Hasegawa M y Umeda T. (1997). Suppression of growth of cultured malignant cells by allomelanins, plant-produced melanins. *Cancer Biother Radiopharm* 12(1): 47-49. doi:10.1089/cbr.1997.12.47
- Karlsson O y Lindquist NG. (2013). Melanin affinity and its possible role in neurodegeneration. *J Neural Transm* 120(12): 1623-1630. doi:10.1007/s00702-013-1062-5
- Karlsson O y Lindquist NG. (2016). Melanin and neuromelanin binding of drugs and chemicals: toxicological implications. *Arch Toxicol* 90(8): 1883-1891. doi:10.1007/s00204-016-1757-0

- Kellermann S-A y McEvoy LM. (2001). The Peyer's Patch Microenvironment Suppresses T Cell Responses to Chemokines and Other Stimuli. *J Immunol* 167(2): 682-690. doi:10.4049/jimmunol.167.2.682
- Kereste J y Venger LA. (2003). Biologically active fraction of vegetable melanin, process for its production and its use. In: Google Patents.
- Kifayatullah M, Mustafa MS, Sengupta P, Sarker MMR, Das A y Das SK. (2015). Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *J Acute Dis* 4(4): 309-315. doi:10.1016/j.joad.2015.06.010
- Krause J y Tobin G. (2013). Discovery, development, and regulation of natural products. En *Using old solutions to new problems-natural drug discovery in the 21st century* (pp. 3-35):
- Krishna R. (2012). Applications of Pharmacokinetic principles in drug development. pp. 65-89. New York, EUA. R. Krishna
- Kumar CG, Mongolla P, Pombala S, Kamle A y Joseph J. (2011). Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201. *Lett Appl Microbiol* 53(3): 350-358. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03116.x
- Kunwar A, Adhikary B, Jayakumar S, Barik A, Chattopadhyay S, Raghukumar S y Priyadarsini K. (2012). Melanin, a promising radioprotector: Mechanisms of actions in a mice model. *Toxicol Appl Pharm* 264(2): 202-211. doi:10.1016/j.taap.2012.08.002
- Kurtz DM y Travloz GS. (2018a). The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Third Ed. pp. 22-27. T. F. Group

- Kurtz DM y Travloz GS. (2018b). *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. Third Ed. pp. 22-27.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J y Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci Technol* 25(4): 726-732. doi:10.1590/S0101-20612005000400016
- LaBrecque D, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Ghafor-Kjan A y Goh K. (2012). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica. *Guías De La Organización Mundial De Gastroenterología* 1(1): 1-31.
- Larsson BS. (1993). Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res* 6(3): 127-133. doi:10.1111/j.1600-0749.1993.tb00591.x
- Lee M-Y, Shin I-S, Seo C-S, Kim J-H, Han S-R y Shin H-K. (2012). Subchronic oral toxicity studies of the traditional herbal formula Bangpungdongseong-san in Crl: CD (SD) rats. *J Ethnopharmacol* 144(3): 720-725. doi:10.1016/j.jep.2012.10.019
- Lei M, Xue CH, Wang YM, Li ZJ, Xue Y y Wang JF. (2008). Effect of squid ink melanin-Fe on iron deficiency anemia remission. *J Food Sci* 73(8): H207-H211. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00930.x
- Li F, Yuan Q y Rashid F. (2009). Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge. *Carbohydr Polym* 78(1): 80-88. doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.005
- Lien DTP, Hoang CTK, Hanh NT, Chu DX, Tram PTB y Toan HT. (2017). Hepatoprotective effect of tofu processed from germinated soybean on carbon tetrachloride induced chronic liver injury in mice. *Food Health* 3(1): 1-11. doi:10.3153/JFHS17001

- Lin B-F, Chiang B-L y Lin J-Y. (2005). *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes *in vitro*. *Int Immunopharmacol* 5(4): 711-722. doi:10.1016/j.intimp.2004.12.001
- Lin J-Y y Tang C-Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem* 101(1): 140-147. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.014
- Liu C-J y Lin J-Y. (2014). Protective effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on inflammation and apoptosis in murine primary splenocytes. *J Food Drug Anal* 22(2): 210-219. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.015
- Liu L, Sun Y, Laura T, Liang X, Ye H y Zeng X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* CJ Tseng. *Food Chem* 112(1): 35-41. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.038
- Liu S, Manson JE, Lee I-M, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC y Buring JE. (2000). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 72(4): 922-928. doi:10.1093/ajcn/72.4.922
- Longo D, Kasper D, Jameson J, Fauci A, Hauser S y Loscalzo J. (2012). Harrison. Principios de Medicina Interna. 18 Ed. pp. 567-590. M.-H. Medical
- Lu Y, Ye M, Song S, Li L, Shaikh F y Li J. (2014). Isolation, purification, and anti-aging activity of melanin from *Lachnum singerianum*. *Appl Biochem Biotech* 174(2): 762-771. doi:10.1007/s12010-014-1110-0
- Makare N, Bodhankar S y Rangari V. (2001). Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *J Ethnopharmacol* 78(2-3): 133-137. doi:10.1016/s0378-8741(01)00326-9



- Manvitha K y Bidya B. (2014). *Aloe vera*: a wonder plant its history, cultivation and medicinal uses. *J Pharmacogn Phytochem* 2(5): 85-88.
- Martínez-Sánchez L, Martínez-Domínguez G, Molina-Valencia J, Vallejo-Agudelo E, Gallego-González D, Pérez-Palacio M, Gaviria-García J y Rodríguez-Gázquez M. (2016). Uso de terapias alternativas y complementarias en pacientes con dolor crónico en una institución hospitalaria. *Rev Soc Esp Dolor* 23(6): 280-286. doi:10.20986/resed.2016.3451/2016
- Matés JM y Sánchez-Jiménez F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4(4): 0339-0345. doi:10.2741/mates
- Mimura T, Maeda K, Hariyama H, Aonuma S, MIKIO S y Fujita T. (1982). Studies on biological activities of melanin from marine animals. I. Purification of melanin from *Ommastrephes bartrami* Lesuel and its inhibitory activity on gastric juice secretion in rats. *Chem Pharm Bull* 30(4): 1381-1386. doi:10.1248/cpb.30.1381
- Mochizuki M, Shimizu S, Urasoko Y, Umeshita K, Kamata T, Kitazawa T, Nakamura D, Nishihata Y, Ohishi T. (2009). Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in pregnant and lactating rats. *Toxicol Sci* 34(2): 175-181. doi:10.2131/jts.34.175
- Montefiori DC y Zhou J. (1991). Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antivir Res* 15(1): 11-25. doi:10.1016/0166-3542(91)90037-R
- Montes-Avila J, Ojeda-Ayala M, Lopez G, Pio-León F, Díaz-Camacho SP, Ochoa-Terán A y Delgado-Vargas F. (2018). Physicochemical properties and biological activities of melanins from the black-edible fruits *Vitex mollis* and *Randia echinocarpa*. *J Food Meas Charact* 12(1972). doi:10.1007/s11694-018-9812-6

- Morita CT, Jin C, Sarikonda G y Wang H. (2007). Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* 215(1): 59-76. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x
- Mukinda J y Syce J. (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *J Ethnopharmacol* 112(138-144). doi:10.1016/j.jep.2007.02.011
- Müller M y Elsässer HP. (2013). Alterations in the secretory pattern of dermal dendritic cells following melanin uptake. *Cell Tissue Res* 352(3): 599-610. doi:10.1007/s00441-013-1577-y
- Murugan SB, Deepika R, Reshma A y Sathishkumar R. (2013). Antioxidant perspective of selected medicinal herbs in India: A probable source for natural antioxidants. *J Pharma Res* 7(4): 271-274. doi:10.1016/j.jopr.2013.04.023
- Nielsen MM, Witherden DA y Havran WL. (2017).  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol* 17(12): 733. doi:10.1038/nri.2017.101
- Öberg F, Haseeb A, Ahnfelt M, Pontén F, Westermarck B y El-Obeid A. (2009). Herbal melanin activates TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Phytomedicine* 16(5): 477-484. doi:10.1016/j.phymed.2008.10.008
- Offen D, Ziv I, Barzilai A, Gorodin S, Glater E, Hochman A y Melamed E. (1997). Dopamine–melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 31(2): 207-216. doi:10.1016/s0197-0186(96)00150-7
- OMS. (1993). Directrices sobre conservación de plantas medicinales. pp. 13-16. Gland, Suiza. M. Natura

- Orhan DD, Orhan N, Ergun E y Ergun F. (2007). Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol* 112(1): 145-151. doi:10.1016/j.jep.2007.02.013
- Ortonne JP. (2002). Photoprotective properties of skin melanin. *Br J Dermatol* 146(61): 7-10. doi:10.1046/j.1365-2133.146.s61.3.x
- Owen J, Punt J y Stranford S. (2014). Kuby Inmunología 7a Ed. pp. 113-270. CDMX, México. M. G. H. Interamericana
- Park T-J, Kim J-S, Kim T-K, Park H-M, Choi S-S y Kim Y. (2008). Characterization of Melanin-TiO<sub>2</sub> Complexes Using FT-IR and <sup>13</sup>C Solid-state NMR Spectroscopy. *Bull Korean Chem Soc* 29(12): 2459-2464. doi:10.5012/bkcs.2008.29.12.2459
- Pasco D, Pugh N, Khan I y Moraes R. (2005). Immunostimulatory agents in botanicals. In: Google Patents.
- Percival SS. (2011). Nutrition and immunity: balancing diet and immune function. *Nutr Today* 46(1): 12-17. doi:10.1097/NT.0b013e3182076fc8
- Perez G, Perez-Gonzalez C, Zavala S y Vargas S. (1993). Cicatrizing activity of *Randia echinocarpa* in gastric ulcers. *Phyton* 54(2): 157-162.
- Phaniendra A, Jestadi DB y Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 30(1): 11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0
- Pío-León JF, Díaz-Camacho SP, López MG, Montes-Avila J, López-Angulo G y Delgado-Vargas F. (2012). Physicochemical, nutritional, and antioxidant characteristics of the fruit of *Ehretia tinifolia*. *Rev Mex Biod* 83(1): 273-280. doi:10.22201/ib.20078706e.2012.1.1148

- Pío-León JF, Montes-Avila J, López-Angulo G, Díaz-Camacho SP, Vega-Rios A, López-Valenzuela JÁ y Delgado-Vargas F. (2018). Melanins of *Vitex mollis* fruit with differences in water-solubility show high inhibition of carbohydrate digestive enzymes and antioxidant activity. *Food Biochem* 42(3): 12509. doi:doi:10.1111/jfbc.12509
- Porth C. (2011). Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states. 3er Ed. pp. 3-6. North American , EUA. S. Publishing
- Prados-Rosales R, Toriola S, Nakouzi A, Chatterjee S, Stark R, Gerfen G, Tumpowsky P, Dadachova E y Casadevall A. (2015). Structural characterization of melanin pigments from commercial preparations of the edible mushroom *Auricularia auricula*. *J Agr Food Chem* 63(33): 7326-7332. doi:10.1021/acs.jafc.5b02713.
- Puertollano M, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G y A de Pablo M. (2011). Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr Top Med Chem* 11(14): 1752-1766. doi:10.2174/156802611796235107
- Pugh, Balachandran P, Lata H, E Dayan F, Joshi V, Bedir E, Makino T, Moraes R, Khan I. (2005). Melanin: Dietary mucosal immune modulator from *Echinacea* and other botanical supplements. *Int Immunopharmacol* 5(637-647. doi:10.1016/j.intimp.2004.12.011
- Pugh ND, Balachandran P, Lata H, Dayan FE, Joshi V, Bedir E, Makino T, Moraes R, Khan I. (2005). Melanin: dietary mucosal immune modulator from *Echinacea* and other botanical supplements. *International Immunopharmacology* 5(4): 637-647. doi:10.1016/j.intimp.2004.12.011

- Quan J, Piao L, Xu H, Li T y Yin X. (2009). Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(4): 849-854. doi:10.1271/bbb.80757
- Revskeya E, Chu P, Howell RC, Schweitzer AD, Bryan RA, Harris M, Gerfen G, Jiang Z, Jandl T. (2012). Compton scattering by internal shields based on melanin-containing mushrooms provides protection of gastrointestinal tract from ionizing radiation. *Cancer Biother Radiopharm* 27(9): 570-576. doi:10.1089/cbr.2012.1318.
- Rhiouani H, El-Hilaly J, Israili Z y Badiaa L. (2008). Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *J Ethnopharmacol* 118(378-386). doi:10.1016/j.jep.2008.05.009
- Riley P. (1997). Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29(11): 1235-1239. doi:10.1016/S1357-2725(97)00013-7
- Rita dC, Pombeiro-Sponchiado y Regina S. (2005). Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol Pharm Bull* 28(6): 1129-1131. doi: 10.1248/bpb.28.1129
- Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR y Trujillo López Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil* 30(1): 15-20.
- Rufián-Henares JA y Morales FJ. (2007). Functional properties of melanoidins: *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res Int* 40(8): 995-1002. doi:10.1016/j.foodres.2007.05.002
- Santos-Cervantes ME, Ibarra-Zazueta ME, Loarca-Piña G, Paredes-López O y Delgado-Vargas F. (2007). Antioxidant and antimutagenic activities of *Randia echinocarpa* fruit. *Plant Food Hum Nutr* 62(2): 71-77. doi:10.1007/s11130-007-0044-x

- Santos E, Cunha de Oliveira D, Hastreiter A, Batista da Silva G, Beltran J, Tsujita M, Crisma A, Meiry Peris Neves S, Ambrósio Fock R. (2016). Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz J Vet Res Anim Sci* 53(138). doi:10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145
- Sava V, Hung Y-C, Blagodarsky V, Hong M-Y y Huang G. (2003). The liver-protecting activity of melanin-like pigment derived from black tea. *Food Res Int* 36(5): 505-511. doi:10.1016/S0308-8146(00)00258-2
- Sava V, N. Galkin B, Hong M-Y, Yang P-C y Huang G. (2001b). A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity. *Food Res Int* 34(337-343). doi:10.1016/S0963-9969(00)00173-3
- Sava V, Yang S-M, Hong M-Y, Yang P-C y Huang GS. (2001). Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food chemistry* 73(2): 177-184.
- Sava V, Yang S-M, Hong M-Y, Yang P-C y Huang GS. (2001). Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chem* 73(2): 177-184. doi:10.1016/S0308-8146(00)00258-2
- Senyuk OF, Gorovoj LF, Beketova GV, Savichuk NO, Rytik PG, Kucherov II, Prilutckaya AB y Prilutsky AI. (2011). Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) *Int J Medic Mushrooms* 13(1): doi:10.1615/intjmedmushr.v13.i1.20
- Serrano-Silvas R. (2013). Extracción, purificación, caracterización químico biológica y evaluación in vitro del efecto inmunomodulador del pigmento de la pulpa de la fruta de

- papache (*Randia echinocarpa*) (Tesis de Licenciatura), Universidad Autónoma de Sinaloa. ,
- Sethi J y Singh J. (2015). Role of Medicinal Plants as Immunostimulants in health and disease. *Ann Med Chem Res* 1(2): 1009.
- Shalaby EA y Shanab SM. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr J Pharm Pharmacol* 7(10): 528-539. doi:10.5897/AJPP2013.3474
- Shcherba V, Babitskaya V, Kurchenko V, Ikonnikova N y Kukulyanskaya T. (2000). Antioxidant properties of fungal melanin pigments. *Appl Biochem Micro* 36(5): 491-495. doi:10.1007/BF02731896
- Shenoy KA, Somayaji S y Bairy K. (2001). Hepatoprotective effects of *Ginkgo biloba* against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Indian J Pharmacol* 33(4): 260-266.
- Solano F. (2014). Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science* 2014(1-28). doi:10.1155/2014/498276
- Suvarna G y Sharma BB. (2018). Concanavalin- A potential glycoprotein. *Mol Cell Proteomics* 9(2): 77-90.
- Tada M, Kohno M y Niwano Y. (2010). Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. *J Clin Biochem Nutr* 46(3): 224-228. doi:10.3164/jcbn.09-84
- Tan KC, Liu Y, Ambrose B, Tulig M y Belongie S. (2019). The Herbarium Challenge 2019 Dataset. *arXiv:1906.05372* doi:10.3164/jcbn.09-84

- Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A y Khetani V. (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 179(3): 183-196. doi:10.1016/s0300-483x(02)00338-4
- Tietz N, Rinker A y Shaw L. (1983). IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. *Clin Chim Acta* 135(3): 339. doi:10.1016/0009-8981(83)90294-2
- Upadhyay G, Kumar A y Singh MP. (2007). Effect of silymarin on pyrogallol-and rifampicin-induced hepatotoxicity in mouse. *Eur J Pharmacol* 565(1-3): 190-201. doi:10.1016/j.ejphar.2007.03.004
- Urán ME y Cano LE. (2008). Melanin: implications in some disease pathogenesis and its capacity to evade the host immune response. *Infectio* 12(2): 128-148.
- Vargas-Solis R y Pérez-Gutiérrez R. (2002). Diuretic and urolithiatic activities of the aqueous extract of the fruit of *Randia echinocarpa* on rats. *J Ethnopharmacol* 83(145-147). doi:10.1016/S0378-8741(02)00091-0
- Vargas RS y Gutierrez RP. (2002). Diuretic and urolithiatic activities of the aqueous extract of the fruit of *Randia echinocarpa* on rats. *J Ethnopharmacol* 145-147. doi:1016/s0378-8741(02)00091-0
- Vega-Aviña R, Aguiar-Hernández H, Gutiérrez-García JA, Hernández-Vizcarra JA, Vega-López IF y Villaseñor JL. (2000). Endemismo regional presente en la flora del municipio de Culiacán, Sinaloa, México. *Acta Bot Mex* 53): 1-15. doi:10.21829/abm53.2000.858
- Vega Aviña R, Bojórquez B y Germán A. (1989). Flora de Sinaloa. pp. 49. S. d. E. P.-U. A. d. Sinaloa



- Verma RS y Babu A. (1995). Human chromosomes: principles and techniques. 2a Ed. pp. 45-98. New York, EUA. McGraw-Hill
- Wang S, Panter K, Evans R y Bunch T. (2001). The effects of pokeweed mitogen (PWM) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Anim Reprod Sci* 67(3-4): 215-220. doi:10.1016/S0378-4320(01)00122-1
- Weber LW, Boll M y Stampfl A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33(2): 105-136. doi:10.1080/713611034
- Wimer BM y Mann PL. (2002). Mitogen information summaries. *Cancer Biother Radiopharm* 17(5): 569-597. doi:10.1089/108497802760804808
- Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M y Matar C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 10(11): 1618. doi:10.3390/nu10111618
- Yao Z-Y y Qi J-H. (2016). Comparison of antioxidant activities of melanin fractions from chestnut shell. *Molecules* 21(4): 487. doi:10.3390/molecules21040487
- Yoon YD, Han SB, Kang JS, Lee CW, Park S-K, Lee HS, Kang JS y Kim HM. (2003). Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum*. *Int Immunopharmacol* 3(13-14): 1873-1882. doi:10.1016/j.intimp.2003.09.005
- Zhang L, Jin N, Nakayama M, O'Brien RL, Eisenbarth GS y Born WK. (2010). Gamma delta T cell receptors confer autonomous responsiveness to the insulin-peptide B: 9-23. *J Autoimmun* 34(4): 478-484. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.008

## XIV ANEXOS

### 14.1 Perspectivas

14.1.1 Determinar el efecto inmunomodulador de las MSP en ratones infectados o inmunosuprimidos.

14.1.2 Determinar porcentaje celular de LT  $\gamma\delta$  en sangre total de humanos sanos y/o con sensibilidad alérgica que consuman MSP.

14.1.3 Determinar la biodisponibilidad de las MSP en modelos *in vitro* (métodos de digestión) e *in vivo*, para conocer que partes de la estructura de las MSP son liberadas y/o absorbidas para ejercer efectos benéficos a la salud.

14.1.4 Determinar el efecto protector de las MSP ingeridas por ratones BALB/c expuestos a radiación.

14.1.5 Determinar la toxicidad crónica las MSP.

### 14.2 Productos

De la tesis de doctorado se presentaron carteles en congresos nacionales:

**Gil-Avilés M.R.**, Díaz-Camacho S.P., Bernal-Reynaga R., Osuna-Martínez L.U., Montes-Ávila J, López-Angulo G., Delgado Vargas F. Actividad antioxidante e inmunomoduladora de melaninas solubles del fruto *Randia echinocarpa* (papache). 14<sup>a</sup>. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Morelos, México 2018.

**Gil Avilés M.R.,** Díaz-Camacho S.P., Delgado-Vargas F. Actividad antioxidante e inmunomoduladora de las melaninas solubles del fruto de *Randia echinocarpa*. 3er Encuentro de Jóvenes Investigadores Sinaloenses. Mazatlán, Sinaloa. 2015.

**Gil Avilés M.R.,** Díaz-Camacho S.P., Delgado-Vargas F. Actividad antioxidante e inmunomoduladora *in vivo* de las melaninas solubles del fruto de *Randia echinocarpa*. 5to Encuentro de Jóvenes Investigadores Sinaloenses. Mazatlán, Sinaloa. 2018.

Se presentaron ponencias en congreso nacional:

**Gil-Avilés M.R.,** Díaz-Camacho S.P., Bernal-Reynaga R., Osuna-Martínez L.U., Montes-Ávila J, López-Angulo G., Delgado Vargas F. Actividad antoxidante e inmunomoduladora de melaninas solubles del fruto *Randia echinocarpa* (papache). 4to Encuentro de Jóvenes Investigadores Sinaloenses. Mazatlán, Sinaloa. 2016.

**Gil-Avilés M.R.,** Díaz-Camacho S.P., Bernal-Reynaga R., Osuna-Martínez L.U., Montes-Ávila J, López-Angulo G., Delgado Vargas F. Actividad antoxidante e inmunomoduladora *in vivo* de melaninas solubles del fruto *Randia echinocarpa* (papache). 4to Encuentro de Jóvenes Investigadores Sinaloenses. Mazatlán, Sinaloa. 2017.

Se generó un artículo original:

**Gil-Avilés M.R.,** Montes-Ávila J, Díaz-Camacho SP, Picos-Salas MA, López-Angulo G, Reynoso-Soto EA, Osuna-Martínez LU y Delgado-Vargas F. (2019). Soluble melanins of

the *Randia echinocarpa* fruit–Structural characteristics and toxicity. *J Food Biochem.* 43: e13077.

Título tentativo de segundo artículo:

*In-vivo* immunomodulatory and antioxidant activity of soluble melanin isolated from *Randia echinocarpa* fruit

## XV SIGLAS Y ABREVIACIONES

=: Porcentaje.

ABTS: Radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico

ALP: Fosfatasa alcalina.

ALT: Alanina aminotransferasa.

ANOVA: Análisis de varianza.

AST: Aspartato aminotransferasa.

BRI: Glucósidos Iridoides de *Boschniaka rossica*

CAT: Catalasa.

CCl<sub>4</sub>: Tetracloruro de carbono.

CPA: Células presentadoras de antígeno.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.

DHTA Daño hepático tóxico agudo

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EHNA: Esteatosis hepática no alcohólica.

EHNAS: Esteatohepatitis no alcohólica severa.

FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro.

GPx: Glutación peroxidasa.

GSH: Glutación activo.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.

H&E: Hematoxilina y eosina

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

IL-10: Interleucina 10.

IMC: Índice de masa corporal.

kg: Kilogramo.

L: Litro.

LT  $\alpha\beta$ : Linfocitos T alfa-beta

LT  $\gamma\delta$ : Linfocitos T gamma-delta

LTC: linfocitos T citotóxicos o citolíticos.

LTh: Linfocitos T helper o colaboradores

m: Metro.

MDA: Malondialdehido.

mg: Miligramo.

mL: Mililitro.

MSP Melaninas solubles de papache

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

p.o.: *Per oral*.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

SFB: Suero fetal bovino

SOD: Superóxido dismutasa.

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular 1.

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta.

IL-2: Interleucina 2

IL-3: Interleucina 3.

IL-6: Interleucina 6.

IL-10: Interleucina 10.

IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma

i. p.: Intraperitoneal

kg: Kilogramo.

L: Litro.

m: Metro.

MDA: Malondialdehido.

mg: Miligramo.

mL: Mililitro.

MLN: Ganglio Linfático del Mesenterio.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

p.o.: *Per oral*.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

SOD: Superóxido dismutasa. TCR: Receptor en la célula T

TPTZ: 2,4,6-tripiridiltriazina férrica.

PP: Placas de Peyer