

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA SOBRE
Mycobacterium tuberculosis y/o ACTIVADORA DE
MACROFAGOS DE EXTRACTOS DE PLANTAS
MEXICANAS CONOCIDAS COMO GORDOLOBO

POR:
BIOL. BIBIANA ROSALES HERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
NOVIEMBRE DE 2004

TM

Z5320

FCB

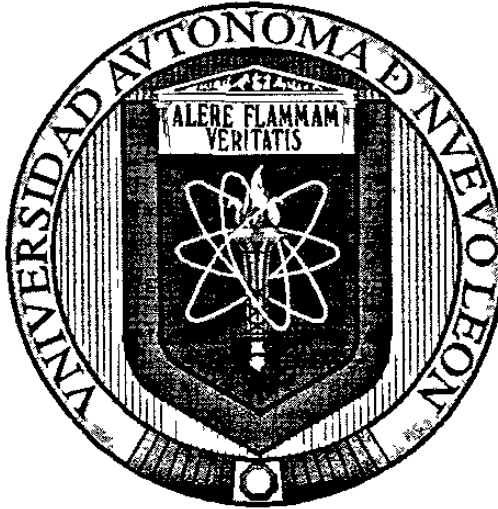
2004

. R6



1020150313

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Actividad antimicrobacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis* y/o activadora de macrófagos de extractos de plantas mexicanas conocidas como gordolobo.

Por

Biol. Bibiana Rosales Hernández

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

San Nicolás de los Garza, N.L.

TM
Z5320
FCE
2004
.R6





Actividad antimicobacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis* y/o activadora de macrófagos de extractos de plantas mexicanas conocidas como gordolobo.

Aprobación de la Tesis:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Delia Elva Cruz Vega".

Dra. Delia Elva Cruz Vega
Presidente

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Norma Laura Heredia Rojas".

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Secretario

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Santos García Alvarado".

Dra. José Santos García Alvarado
Vocal

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ma. Julia Verde Star".

Dra. Ma. Julia Verde Star
Vocal

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jorge Castro Garza".

Dr. Jorge Castro Garza
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Análisis de la actividad antimicobacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis* y/o activadora de macrófagos de extractos de plantas mexicanas conocidas como gordolobo.

Por

Biol. Bibiana Rosales Hernández

Este trabajo de investigación fue realizado en la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey N.L.; Laboratorio de Inmunología Molecular II del Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F. y Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L. bajo la dirección de la Dra. Delia Elva Cruz Vega y la co-dirección del Dr. Jorge E. Castro Garza.

Dra. Delia Elva Cruz Vega

Director

Dr. Jorge E. Castro Garza

Co-director

Para la realización de este trabajo de investigación y obtener el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología, se recibieron los siguientes apoyos:
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Beca Crédito No. 166347
Instituto Mexicano del Seguro Social Beca No. 99201566

Dedicatoria

A mi Señor, por darme fortaleza cuando me sentí flaquear, fé cuando pensé que no iba a terminar, paciencia cuando no me salían las cosas, perseverancia cuando comenzamos a obtener resultados.

Con mucho cariño para mis padres Diana Hernández Santamaría y Adrián Humberto Rosales Ortega, que aunque se encuentran lejos físicamente, siempre se encuentran en mi corazón.

A mi esposo; Oscar Agustín, porque ha confiado en mi.

A mi hermana Diana que me recibió en su casa y nos permitió un reencuentro.

A mi hermano Adrián por sus porras.

A mis sobrinos Luis Pablo y Michelle por su cariño.

A mi nueva familia, Espinosa Solis que me han adoptado y me han hecho sentir como en casita.

Agradecimientos

A la Dra. María Teresa González Garza y Barrón por invitarme a formar parte de este proyecto.

A la Dra. Delia Cruz Vega y Dr. Jorge Castro Garza por su tiempo y dedicación para la realización del trabajo.

Al Dr. Hugo Barrios, por su amistad, ayuda incondicional y sacarme de tantos apuros.

A mis sinodales por tomarse el tiempo para la revisión y redacción de este trabajo.

A mi comité tutorial Dr. Ricardo Gómez, Dra. Patricia Taméz, Dr. Alberto Morales, por sus sugerencias y comentarios durante el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Iris Estrada por aceptarme en su laboratorio y realizar una corta estancia, sin la cual, no hubiera podido obtener los resultados.

A la M en C Patricia Méndez Aragón por su dedicación para trabajar con paciencia y enseñarme las técnicas usadas.

A todo el Laboratorio de Inmunología Molecular II. Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

A la Dra. Azucena Oranday y Dra. Catalina Rivas por prestarnos sus laboratorios para la realización de los extractos.

A Yessenia Silva y Beatriz Padrón por ayudarme a realizar las identificaciones de los extractos.

A la M en C Luisa Yolanda Solís por ayudarme con las plantas provenientes de Chihuahua.

A la Ing. Michelle Macias por las plantas provenientes de Guadalajara.

A la M en C Abigail Aguilar por las plantas provenientes de Puebla.

A Mónica Lozano, Fermín Orona, Rocío Morales, Viviana Mata, Irma Iracheta, Luisa Yolanda Solís, Yessenia Silva y Beatriz Padrón, Gloria Espinosa, Alejandro Mancilla por su amistad.

A RAGASA INDUSTRIAS, SA DE CV, por las facilidades prestadas para la impresión de la tesis.

Gracias por el apoyo de las siguientes Instituciones:

CONACYT; CIBIN, IMSS; UANL; IPN.

También a todas aquellas personas que en un momento colaboraron conmigo, ya siendo con amistad, apoyo, guía o cualquier otra forma de ayuda.

A todas mis amistades.

Muchas gracias.

Indice

	Pagina
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 Antecedentes	6
1.1.1 Características biológicas y químicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.1.2 Patogénesis	7
1.1.3 Control de la Bacteria por el Sistema Inmune.	8
1.1.4 Interleucinas.	11
1.1.5 Óxido nítrico	13
1.2 Plantas utilizadas contra <i>M. tuberculosis</i>	15
1.2.1 Gordolobo	17
1.2.2 Plantas utilizadas en el estudio.	18
2. Importancia.	22
3. Hipótesis.	22
4. Objetivos.	23
5. Metodología y Diseño Experimental.	24
5.1 Muestras vegetales.	24
5.1.1 Recolección.	24
5.1.2 Obtención extractos.	24
5.2 Pruebas biológicas.	26
5.2.1 Actividad antimicobacteriana de los extractos vegetales.	26
5.2.1.1 Micobacterias.	26
5.2.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.	26
5.2.2 Determinación del efecto sobre macrófagos.	27
5.2.2.1 Cultivo y activación de macrófagos.	27

5.2.2.2 Determinación de la activación de los macrófagos por los extractos.	27
Obtención de RNA.	27
Producción de cDNA.	28
PCR.	29
5.3 Reacciones químicas de Identificación.	30
5.3.1 Identificación de saponinas.	30
5.3.2 Identificación de lactonas.	30
5.3.4 Identificación de Sesquiterpenlactonas.	30
5.3.5 Prueba de $KMnO_4$	31
5.3.6 Prueba para identificar oxhidrilos fenólicos.	31
5.3.7 Prueba para grupos carboxilo.	31
5.3.8 Identificación de Triterpenos y Esteroles.	31
5.3.9 Identificación de Cumarinas.	31
5.3.10 Identificación de Carbohidratos.	31
5.3.11 Identificación de Alcaloides.	32
6 Resultados	33
6.1 Colecta y clasificación de plantas conocidas como gordolobo.	33
6.2 Extractos obtenidos de las plantas colectadas.	33
6.3 Inhibición del crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv por los extractos de gordolobo.	36
6.4 Actividad estimuladora de los extractos en macrófagos medulares de ratón BALB/c.	42
6.4.1 Expresión de G3PDH	42
6.4.2 Expresión de IL-1 β	44
6.4.3 Expresión de iNOS.	44
6.4.4 Expresión de IL-10.	45
6.5 Pruebas parciales de identificación de compuestos químicos	46
7 Discusión	49

8 Conclusiones.	56
9. Literatura.	57
10 Anexos.	69
I Extracciones.	69
II Pruebas biológicas.	71
a) Actividad antimicobacteriana de los extractos	
azul alamar.	71
b) Determinación del efecto sobre macrófagos	
Obtención de monocitos.	72
Incubación con los extractos vegetales.	72
c) RT-PCR	
Obtención RNA.	73
Geles y lecturas para determinar calidad	
y cantidad de RNA.	73
cDNA.	74
PCR.	74
III Preparación reactivos.	75
IV Imagen del marcador.	77

Tablas:

- Tabla 1 Plantas usadas en medicina tradicional mexicana registradas bajo el nombre popular de gordolobo.
- Tabla 2 Nombre científico y procedencia de cada especie colectada.
- Tabla 3 Datos de los extractos de *Gnaphalium canescens*.
- Tabla 4 Datos de los extractos de *G. leucocephalum*.
- Tabla 5 Datos de los extractos de *G aff de currens*.
- Tabla 6 Datos de los extractos de *Bocconia frutescens*.
- Tabla 7 Nomenclatura de identificación en los geles de PCR.
- Tabla 8 Resumen de la expresión inducida por cada uno de los extractos por la prueba de RT-PCR.
- Tabla 9 Caracterización de los principios activos.
- Tabla 10 Preparación OADC.
- Tabla 11 Mezcla de azul alamar.
- Tabla 12 Medio para obtención de monocitos.
- Tabla 13 Mezcla de reacción para transcriptasa reversa.
- Tabla 14 Mezcla de reacción para PCR.
- Tabla 15. Solución de lisis
- Tabla 16. Solución de TBE 10X

Figuras

- Figura 1. Controles para la técnica de azul alamar
- Figura 2. MIC *B frutescens*
- Figura 3. MIC *G. canescens*
- Figura 4. MIC *G leucocephalum*
- Figura 5. MIC *G. aff decurrens*
- Figura 6. Integridad del RNA
- Figura 7. Expresión de G3PDH
- Figura 8. Expresión de IL-1 β
- Figura 9. Expresión de iNOS
- Figura 10. Expresión de IL-10

Abreviaturas

$\mu\text{g/ml}$	microgramo por mililitro
μm	Micra
cDNA	Ácido desoxirribonucléico clonal
cm	Centímetro
CMI	Inmunidad Mediada por Células
DEPC	Dietil pirocarbonato
g	Gramo
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocitas
HTR	Inmunidad de Tipo Retardado
IFN- γ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-1Ra	Receptor de la Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
I-NF- κ B	Inhibidor del Factor nuclear Kappa beta
iNOS	Enzima oxido nítrico sintetasa inducible
KO	Knock out
M	Molar
mg	Microgramo
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
MP	Fagocitos mononucleares
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	Factor nuclear Kappa beta
NOS	Enzima óxido nítrico sintetasa
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Intermediarios reactivos el Nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos del Oxígeno
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Reversa Transcriptasa
TB	Tuberculosis
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
μ l	Microlitro

Análisis de la actividad antimicobacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis* y/o activadora de macrófagos de extractos de plantas mexicanas conocidas como gordolobo.

RESUMEN.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa considerada como problema de salud mundial. El aumento en la incidencia de la tuberculosis se ha debido en parte a la aparición de cepas drogo-resistentes, por lo que se considera prioritaria la búsqueda de nuevos compuestos antimicobacteriales.

El gordolobo, es una planta reportada en la medicina tradicional en México con diversos usos medicinales, entre los cuales se menciona como antituberculoso. A partir de cuatro diferentes especies de gordolobo (*Gnaphalium canescens*, *G. aff. decurrens*, *G. leucocephalum* y *Bocconia frutescens*) se obtuvieron extractos hexánicos, metanólicos, etanólicos y acuosos del tallo, flor y hoja.

La actividad antimicrobiana se determinó por la técnica de Azul Alamar sobre la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* y encontramos que los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *B. frutescens*, tienen una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 125 µg/ml, mientras que los demás extractos probados no mostraron actividad contra *M. tuberculosis*.

En algunos casos la efectividad de un compuesto o extracto vegetal como antimicrobiano no se debe a una acción directa contra el microorganismo sino a una estimulación del sistema inmune que facilita el control y eliminación del parásito. Mediante ensayos de RT-PCR encontramos que los extractos hexánico y metanólico de hoja de *B. frutescens* y hexánico de flor de *G. aff. decurrens* (125 µg/ml) indujeron la expresión de IL-1β en macrófagos medulares de ratones BALB/c, pero ninguno de ellos indujo la expresión de IL-10. Mientras que los extractos hexánico de flor de *G. aff. decurrens* y metanólico hoja de *B. frutescens* indujeron la producción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS).

Estos resultados indican que el extracto metanólico de hoja de *B. frutescens* tiene actividad contra *M. tuberculosis* y actividad estimuladora sobre macrófagos. En tanto que el extracto hexánico de hoja de *B. frutescens* tienen solo acción contra *M. tuberculosis*, y el hexánico de flor de *G. aff. decurrens* tiene acción estimuladora sobre macrófagos.

Los ensayos de identificación parcial de compuestos en los extractos con actividad evidenciaron que el extracto metanólico de *B. frutescens* contiene insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cumarinas, grupos carbonilo, alcaloides, carbohidratos y lactonas, pero carece de esteroides y flavonoides.

El extracto hexánico de *B. frutescens* presentó insaturaciones, esteroides, sesquiterpenlactonas, cumarinas, grupos carbonilo, alcaloides, carbohidratos y lactonas. Carece de oxhidrilos fenólicos y flavonoides.

El extracto hexánico de flor de *G. aff. decurrens* presentó insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, flavonas, grupos carbonilo, carbohidratos y lactonas. Carece de triterpenos, esteroides y alcaloides.

La presencia de alcaloides ya había sido previamente reportada para el género *Boconnia*, pero no en *Gnaphalium*.

El presente trabajo es un preámbulo para posteriores investigaciones que conduzcan a identificar los compuestos responsables de las actividades encontradas en los extractos y que pueden llegar a ser buenos candidatos para ser utilizados en el control de la enfermedad.

Antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and/or macrophage activation of mexican plant extracts known as gordolobo.

Abstract:

Tuberculosis is an infectious disease considered as a world health problem. The increased incidence of tuberculosis in the last years has been due, in part, to the surge of multidrug-resistant strains, this has made the search of new antimycobacterial compounds a priority.

Gordolobo is a plant reported in traditional mexican medicine for many medical uses. One of those uses is against tuberculosis. Different species of plants are known as gordolobo. In this study, four different species of gordolobo (*Gnaphalium canescens*, *G. aff decurrens*, *G. leucocephalum* and *Bocconia frutescens*) were used. Hexane, methanol, ethanol and aqueous extracts of leaf, steam and flower were obtained from each species.

Antimicrobial activity was determined by Alamar Blue assay on *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Methanol and hexan leaves extracts from *B. frutescens* showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 125 µg/ml. None of the other tested extracts had any activity against *M. tuberculosis*.

In some cases the effectiveness as antimicrobial of a compound or vegetal extract is not due to a direct effect against the microorganism, but an immune system stimulation that facilitates the parasite control and its elimination. By RT-PCR assays we found that hexane and methanol leaf extract from *B. frutescens* and hexanic flower extract fom *G. aff decurrens* (125 µg/ml) induced IL-1β expression in murine (BALB/c) bone marrow macrophages, but none of these induced IL-10 expression. Hexane flower extract from *G. aff. decurrens* and methanolic leaf extract from *B. frutescens* induced the expression of inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS).

This research shows that methanol leave extract from *B frutescens* presents activity against *M. tuberculosis* and stimulating activity upon macrophages. While hexane extract from *B. frutescens* only has activity against *M. tuberculosis* and the hexane extract from *G. aff. decurrens* flower presents a stimulating activity upon macrophages.

The partial identification assays of compounds in activated extracts showed that the methanol extract from *B. frutescens* contains insaturations, phenol oxhidriles, sesquiterpenlactones, coumarines, carbonyl group, alkaloids, carbohydrates and lactones, but it lacks of steroids and flavonoids.

The hexane extract from *B. frutescens* showed insaturations, steroids, sesquiterpenlactones, coumarines carbonyl group, alkaloids, carbohydrates and lactones. It lacks of phenolic oxhidriles and flavonoids.

Hexane extract from *G. aff decurrens* flower shows saturations, phenolic oxhidriles, coumarines, sesquiterpenlactones, flavones, carbonyl group, carbohydrates and lactones. It lacks of triterpenes, steroids and alkaloids.

The presence of alkaloids had been previously reported for the generous *Bocconia*, but not for *Gnaphalium*.

The present research is a preamble for future investigation to find the responsible compounds of the activities reported here and test them as candidates to be used in tuberculosis control.

1. INTRODUCCIÓN.

Una de las enfermedades infecciosas re-emergentes que se ha convertido en un problema de salud pública mundial es la tuberculosis, cuyo principal agente causal es *Mycobacterium tuberculosis*. La Organización Panamericana de Salud (OPS) y La Organización Mundial de la Salud (OMS) consideran que la aparición de cepas drogo-resistentes es un obstáculo importante para el control de esta infección (OPS/WHO, 1999).

De acuerdo al reporte global de la OMS, la incidencia de la tuberculosis se ha incrementado en los últimos años. Cada año se reportan 8 millones de nuevos casos y 2 millones de muertes debidas a la tuberculosis. La falta de atención por parte de los sistemas de salud para el control de la tuberculosis, la diseminación de HIV/SIDA y el surgimiento de cepas multidrogo-resistentes han contribuido al impacto de esta enfermedad (WHO, 2003). Se estima que entre el 2002 y el 2020, aproximadamente 1,000 millones de personas contraerán la enfermedad, 150 millones se enfermarán y 36 millones morirán por esta enfermedad si no se encuentra alguna forma de controlar la enfermedad y su propagación (WHO, 2003).

La medicina herbolaria ha demostrado ser una fuente importante en la detección de moléculas con actividad farmacológica y en muchos casos su uso se ha difundido en la medicina moderna. Varios investigadores han informado de moléculas con actividad anti-micobacteriana obtenidas de extractos de plantas (Frame AD, *et al.*, 1998; Wächter GA, *et al.*, 1998; Houghton PJ, *et al.*, 1998; Lall N, *et al.*, 1999; Cantrell CL, *et al.*, 1999a; Cantrell CL, *et al.*, 1999b). Sin embargo, a la fecha no se ha reportado un compuesto cuyas características de actividad anti-micobacteriana y márgenes de toxicidad permitan que sea incluido dentro del tratamiento contra la tuberculosis. Por lo anterior y debido al alarmante surgimiento de cepas drogo-resistentes a los fármacos de línea (OPS/WHO, 1999) la búsqueda de nuevos compuestos anti-micobacteriales a partir de plantas medicinales es un reto constante y prioritario en esta área de investigación (Wagner H, *et al.*, 1985; Schultes RE, 1972; Farnsworth N, *et al.* 1985).

Hasta la fecha, se han registrado en México alrededor de 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total). Este número coincide con lo informado en varias regiones del

mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México y en todo el mundo la validación química farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en el 5% de las especies usadas por sus atributos medicinales (~200 especies) (Huertas, C, 1997).

1.1 ANTECEDENTES.

1.1.1 Características biológicas y químicas de *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis es una bacteria intracelular facultativa resistente a los ácidos y álcalis por su compleja estructura hidrofóbica presente en su pared celular. Dan leve tinción gram-positiva, tienen apariencia de bacilos rectos o un poco curvos con algunas células ramificadas, son inmóviles y no esporulados, de 1 a 10 μm de longitud y 0.2 a 0.6 μm de ancho. Es un patógeno capaz de sobrevivir intracelularmente en macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial (Walker, S, 2001).

Cuando la bacteria crece en medio sólido, las colonias tienen una apariencia cerosa y verrugosa; cuando crecen en medios líquidos, las células se agregan en cúmulos. Estos hábitos de crecimiento reflejan la presencia de la capa externa cerosa de las células (Ingraham, J, 1998).

Los miembros de este grupo tienen una estructura de la pared poco común (Ingraham, J, 1998). El complejo de la pared celular consta de una membrana citoplasmática interna rodeada por una pared rica en peptidoglicano. Las capas de peptidoglicano y arabinogalactano son semejantes en todas las especies, pero el lipoarabinomano, los ácidos micólicos y los ácidos micocerósicos varían de una especie a otra. En *M. tuberculosis* los ácidos micólicos son de cadenas carbonadas y especialmente alargadas. (Walker, S, 2001). La pared de peptidoglicano está unida mediante enlaces químicos a una capa de polisacárido que, a su vez, está unida mediante enlaces de tipo éster a ácidos micólicos (Ingraham, J, 1998).

Por esta razón sus células tienen una superficie externa cerosa que le confiere propiedades especiales como resistencia a muchos antibióticos y las protege de ambientes hostiles. Las micobacterias asociadas a enfermedades presentan un lento crecimiento por lo que requieren entre 2 y 6 semanas de incubación. La superficie cerosa disminuye la permeabilidad de

varios compuestos, incluida la mayoría de los colorantes. Las células deben calentarse hasta 75 °C para poder teñirlas. Estas características inusuales permiten que puedan ser identificadas mediante la tinción de ácido-alcohol resistencia y por eso se le conoce como bacterias ácido-alcohol resistentes (Ingraham, J, 1998). *M. tuberculosis* presenta además una capa externa de glucolípidos sulfatados que han sido involucrados en la virulencia. (Walker, S, 2001).

1.1.2 Patogénesis.

M. tuberculosis se transmite por aire en microgotas expulsadas cuando un paciente portador de tuberculosis pulmonar o laríngea tose, estornuda o habla. La infección ocurre cuando un individuo susceptible inhala una de estas microgotas. Una persona infectada puede permanecer así por muchos años (inclusive toda su vida) sin desarrollar la enfermedad y la única evidencia de un contacto previo con el bacilo o de infección es la prueba positiva a la tuberculina. Estas personas pueden desarrollar la enfermedad en cualquier momento, relacionándose la progresión de la enfermedad con estrés físico y emocional, especialmente con el debilitamiento del sistema inmunológico (WHO, 1995, Chan, J, *et al.*, 1994).

El desarrollo de la tuberculosis pulmonar, desde su inicio hasta las manifestaciones clínicas, se puede representar como una serie de batallas entre el hospedero y el invasor: a) Los bacilos inhalados pueden multiplicarse o ser eliminados por los macrófagos alveolares antes de que se produzca cualquier lesión; b) se pueden formar pequeños espacios caseosos (de milímetros de diámetro) que pueden progresar o estabilizarse antes de siquiera ser detectados por radiografías; c) se pueden formar lesiones caseosas grandes locales y verter al bacilo hacia el torrente sanguíneo y al sistema linfático o pueden curarse o estabilizarse; d) alternativamente las lesiones caseosas pueden licuarse e introducir bacilos y sus productos hacia al árbol bronquial, haciendo el control de la enfermedad más difícil (Dannenberg, A. *et al.*, 1994).

Una vez establecida la primera pequeña lesión caseosa tuberculosa, todas las batallas subsecuentes ocurren en un hospedero donde se puede producir daño al tejido o una respuesta inmune activadora de macrófagos. La primera produce una necrosis caseosa si existen altas concentraciones de productos bacilares como tuberculina. Lo segundo, conocido como inmunidad mediada por células (CMI) o resistencia celular adquirida, causa una acumulación de macrófagos

microbicidas activados alrededor del centro caseoso de la lesión. La interacción entre la multiplicación de bacilos y estas respuestas por parte del hospedero a los componentes bacilares determinará si la enfermedad progresa o se controla (Dannenberg, A. *et al.*, 1994).

1.1.3 Control de la bacteria por el sistema inmune.

M. tuberculosis penetra al sistema alveolar en aerosoles, una vez ahí son primariamente ingeridos por los macrófagos alveolares, pero puede ser también que la bacteria sea ingerida a través del sistema epitelial de neumocitos tipo II (Bermudez, LE, *et al.*, 1996, 2002; Mehta PK, *et al.*, 1996; Castro-Garza, J, *et al.*, 2002, Dobos KM *et al.*, 2000). Los macrófagos que fagocitan inicialmente a las bacterias no están activados y no controlan la infección, pero si atraen monocitos inactivados, linfocitos y neutrófilos a través de la producción de citocinas, ninguno de los cuales eliminan a la bacteria de manera eficiente (Smith, I., 2003). Las células incapaces de matar a las bacterias fagocitadas, proporcionan al microorganismo un ambiente que las protege de las células activadas reclutadas hacia el sitio de la infección permitiendo que se multipliquen intracelularmente. Durante este periodo, antes de que ocurra el desarrollo de la inmunidad específica, es cuando los organismos aparecerán en los ganglios linfáticos que drenan la región (Rossman, MD, 1996).

Posteriormente, se comienzan a formar lesiones focales granulomatosas compuestas de macrófagos derivados de células gigantes y linfocitos. Este proceso es generalmente efectivo para contener la diseminación de la bacteria. Mientras que la inmunidad celular se desarrolla, los macrófagos cargados con bacilos son eliminados, y esto da lugar a la formación del centro caseoso del granuloma, rodeado por una zona celular de fibroblastos, linfocitos y monocitos derivados de sangre. Aunque se asume que los bacilos de la tuberculosis no pueden multiplicarse dentro de este fino tejido caseoso debido a su pH ácido, a la baja disponibilidad del oxígeno y a la presencia de ácidos grasos tóxicos, algunos organismos permanecen vivos pero inactivos por décadas (Smith, I., 2003).

Se considera que las células dendríticas desempeñan un papel muy importante en los primeros estadios de la infección puesto que son mejores presentadores de antígenos que los macrófagos (Tascon, RE, *et al.*, 2000) y activarían las células T con los antígenos específicos de

M. tuberculosis (Bodnar, KA, *et al.*, 2001, Gonzalez-Juarrero, M, *et al.*, 2001). Debido a que las células dendríticas son migratorias, no como los macrófagos diferenciados, pueden contribuir a la diseminación de *M. tuberculosis* en los tejidos (Lipscomb, MF, *et al.*, 2002).

La bacteria es fagocitada en un proceso que inicia con el contacto de la bacteria con la manosa del macrófago y/o con los receptores del complemento (Rossman, MD, 1996, Schlesinger, LS, 1993). Se considera que el colesterol en las membranas plasmáticas es importante para este proceso, debido a que se ha observado que el retirar este esteroide en neutrófilos humanos disminuye la fagocitosis en *M. kansasii* (Peyron, PC, *et al.*, 2000). Experimentos similares evitaron la entrada de *M. bovis* BCG en macrófagos de ratones (Gatfield, J, *et al.*, 2000). Los receptores Toll-like 2 (TLR2) también juegan un papel en la regulación de la entrada de *M. Tuberculosis* (Noss, EH, *et al.*, 2001).

Una vez que se ha introducido al macrófago, tanto *M. tuberculosis* como otros patógenos intracelulares, residen inicialmente en vacuolas endocíticas llamadas fagosomas. Si ocurre el ciclo fagosomal normal de la maduración (la fusión fagosoma-lisosoma) estas bacterias encontrarán un ambiente hostil que incluye un pH ácido, intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y de nitrógeno (RNI's), enzimas lisosomales y péptidos tóxicos. Puesto que la mayoría de la destrucción de bacterias ocurre en el fagolisosoma del macrófago, los patógenos intracelulares han desarrollado muchas maneras de evitar el microambiente vacuolar hostil. Así las micobacterias patogénicas inhiben la fusión fagosoma-lisosoma (Armstrong, J, *et al.*, 1975; Deretic, V *et al.*, 1999) y evitan la acidificación del fagosoma (Crowle, AJ, *et al.*, 1991 Niederweis, M, 2003).

Los procesos de inflamación están muy ligados a la enfermedad. El crecimiento de *M. tuberculosis* promueve las respuestas inflamatorias del hospedero que son necesarias para controlar las infecciones pero pueden también causar daño severo del tejido fino (Smith, I., 2003). Unos de los agentes celulares del hospedero involucrados en el daño del tejido son proteasas como la catepsina D.

Se ha propuesto que la inmunidad de tipo retardado (HTR) y la CMI inhiben el crecimiento intracelular de los bacilos tuberculosos. En el caso de los monocitos, se reclutan primero en el

tubérculo (granuloma) por citocinas producidas por las células T sensibilizadas y a continuación son activados por otras citocinas para que destruyan los microorganismos intracelulares. La HTR es un mecanismo por medio del cual se destruyen los macrófagos no activados cargados de bacilos. Esto elimina un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano, pero ocurre un proceso de necrosis caseificante a costo del tejido del huésped (Rossman, MD,1996)

Fagocitosis e inmunidad específica. La actividad fagocítica de los macrófagos está relacionada con protección y también desempeña un papel importante en la inducción de las respuestas inmunitarias específicas. A través de la fagocitosis, los macrófagos atrapan e ingieren microorganismos, los inactivan y los digieren en componentes de tamaño variable. Algunos de estos se degradan todavía más, produciendo pequeños fragmentos antigénicos o epítopos, que se asocian a moléculas de histocompatibilidad de clase I y II, los cuales se transportan a la superficie de los macrófagos para ser presentados a las células T del individuo. Las células T responden al contacto con el antígeno y a otras señales secundarias e inician la respuesta inmunitaria. Los macrófagos funcionan como células atrapadoras, procesadoras y presentadoras de antígeno, esta función también la realizan los linfocitos B, las células de Langerhans y las células dendríticas (Rojas-Espinosa, O, 2001).

Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno y la fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos (Trinchieri, G. 1997).

Después de la identificación del microorganismo, las señales producidas por la inmunidad inespecífica, controlan aspectos de la inmunidad específica. Igualmente, la respuesta adaptativa puede dirigir a la respuesta innata contra agentes infecciosos, como en el caso de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Ambas respuestas son reguladas en gran parte por las interleucinas (Seder, RA., 1999).

1.1.4 Interleucinas.

Se denomina interleucinas a un conjunto de glucoproteínas solubles de bajo peso molecular que actúan como mensajeros y permiten la comunicación entre las diferentes subpoblaciones de leucocitos que participan en la respuesta del sistema inmune. Son producidas transitoriamente por las células del sistema inmune y diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta inmune específica (Oberholzer, A, *et. al.*, 2000) y están involucradas en procesos de crecimiento, multiplicación, diferenciación y activación celular, así como en la inmunidad e inflamación (Hernández-Urzúa, MA, 2001).

Las Interleucinas (IL-1, IL-2, IL-8), el TNF- α y el interferón gamma (INF γ) desempeñan funciones importantes en la presentación de los granulomas y en el control de la infección por *M. tuberculosis*.

La IL-1 es el pirógeno endógeno y el factor estimulante de la síntesis de las proteínas de fase aguda; estimuladora de la respuesta inmunitaria y de las reacciones inflamatorias. Su producción puede ser estimulada por adyuvantes como el muramil dipéptido y por lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas de las bacterias Gram negativas. Otros inductores son las sustancias activadoras de los linfocitos, como el TNF- α , los factores estimulantes de colonias granulocito-monocito (GM-CSF) y el IFN γ (Rojas-Espinosa, O, 2001).

Su actividad más importante es la estimulación de la proliferación de los linfocitos T. Es también un cofactor que estimula la proliferación de los linfocitos B, de los cuales depende la producción de anticuerpos.

Existen dos clases de IL-1 que han sido denominadas α y β . Producidas por dos genes diferentes, pueden ser producidas simultáneamente por el mismo organismo vertebrado. Pero la síntesis de una u otra puede variar según el tejido y la especie. Así por ejemplo, la IL-1 β es que se produce predominantemente en los monocitos y en las células del cerebro humano. En cambio, en los monocitos de ratón predomina la síntesis de IL-1 α (http://depa.pquim.unam.mx/inmuno/contenido/Cap10/cap10_tema2.htm).

En pacientes con tuberculosis, la IL-1 se sobre-expresa (van Crevel, R, *et al.*, 2002 cf. ref), especialmente en el sitio de la lesión (Law, K, *et al.*, 1996; Bergeron, A, *et al.*, 1997). Los estudios con ratones sugieren un importante papel de IL-1 en la tuberculosis: ratones con doble knock-out (KO) para IL-1 α y IL-1 β (Yamada, H, *et al.*, 2000), así como ratones deficientes en el receptor para IL-1 (IL-1R) tipo 1 (los cuales no responden a IL-1) mostraron un incremento en el crecimiento micobacteriano y una formación defectuosa del granuloma al ser infectados con *M. tuberculosis* (Juffermans, NP, *et al.*, 2000). Adicionalmente, los haplotipos para IL-1 β y el antagonista natural de IL-1Ra de 90 pacientes hindúes con tuberculosis en Londres mostraron una distribución desigual: un incremento de la producción de IL-1 β en relación a IL-1Ra dan lugar a un "haplotipo proinflamatorio", el cual fue más común en TB pleural que en otros tipos de tuberculosis (Wilkinson, RJ, *et al.*, 1999). La TB pleural es usualmente un caso de TB primaria que el hospedero controla por si solo, por lo que el aumento de la relación de la producción IL-1 β /IL-1Ra puede ser un factor que protege en contra de una presentación más severa de TB.

Sugawara y col. (2001) encontraron que ratones KO para el receptor tipo 1 de IL-1 infectados vía respiratoria con *M. tuberculosis*, cepas H37Rv o Kuroko, desarrollaron lesiones granulomatosas perceptiblemente más grandes con infiltración de neutrófilos en sus pulmones que los ratones silvestres. El número de colonias micobacteriales en pulmones y bazo aumentó a partir de la quinta semana post-infección. La producción de INF γ por las células del bazo fue menor en ratones KO.

La regulación de esta intrincada red de citocinas está controlada principalmente por la IL-10. Su función es interferir la síntesis de las citocinas TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 y GM-CSF por células T y regular negativamente la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α en macrófagos. La IL-10 sobre regula la expresión de las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad MHC clase II, (Smith EM, *et al.*, 1999; Opal SM., 2000) que son las proteínas especializadas encargadas de presentar los antígenos de los microorganismos asociadas a células para su reconocimiento por las células T (Abbas A, *et al.*, 1999). También favorece el desarrollo y la producción de inmunoglobulinas en células B e inhibe las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de las células T. El efecto total de estas acciones es inhibir la respuesta inespecífica y la mediada por células (Smith EM, *et al.*, 1999; Opal SM, 2000).

La IL-10 es producida por los macrófagos después de haber fagocitado a *M. tuberculosis* (Shaw TC, *et al.*, 2000) y unirse al LAM micobacteriano (Dahl, KE, *et al.*, 1996). Los linfocitos T, incluyendo las células T reactivas a *M. tuberculosis* son capaces de producir IL-10 (Barnes, PF, *et al.*, 1993a; Boussiotis, VA, *et al.*, 2000; Gerosa, F, *et al.*, 1999). En pacientes con tuberculosis, la producción de mRNA de IL-10 ha sido demostrada en las células mononucleares circulantes en los sitios de la enfermedad en la pleura y en los lavados de los fluidos alveolares (Barnes, PF, *et al.*, 1993b; Gerosa, F, *et al.*, 1999). Algunos investigadores han mostrado producción *ex vivo* de IL-10 por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis (Hirsch, CS, *et al.*, 1999; Torres, M, *et al.*, 1998), pero esto no ha sido encontrado por otros (Lin, Y, *et al.*, 1996). La IL-10 es un antagonista de las citocinas proinflamatorias a través de la inhibición de la producción de IFN- γ , TNF- α y de la IL-12 (Fulton, SA, *et al.*, 1998; Gong, JM, *et al.*, 1996; Hirsch, CS, *et al.*, 1999). Debido a que la IL-12 es esencial para la inmunidad protectora en la tuberculosis, se esperaría que la IL-10 interfiriera con la defensa por parte del hospedero contra *M. tuberculosis*. De hecho, los ratones transgénicos para IL-10 con infección micobacteriana desarrollan una carga bacteriana más grande (Murray, PJ, *et al.*, 1997). Otro estudio mostró que los ratones deficientes en IL-10 presentaron una carga bacteriana más baja a etapas tempranas después de la infección (Murray, PJ, *et al.*, 1999), no obstante otros dos autores encontraron resistencia normal (Erb, KJ, *et al.*, 1998; North, RJ, 1998.). En tuberculosis humana, la producción de IL-10 fue más alto en pacientes anérgicos, antes y después del acertado tratamiento, sugiriendo que la inducción de IL-10 por *M. tuberculosis* suprime una respuesta inmune eficaz (Boussiotis, VA, *et al.*, 2000).

1.1.5 Oxido Nítrico.

El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir del nitrógeno guanidino del aminoácido L-arginina a través de una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintetasas (NOS) resultando en NO y citrulina. Las NOS pueden ser constitutivas o inducibles:

a) **NOS constitutivas.** Son dependientes de calcio y calmodulina para su actividad y se localizan en endotelios (NOS endotelial) y en algunas neuronas tanto a nivel central como periférico (NOS neuronal). Las NOS constitutivas tienden a tener efectos inmediatos y

benéficos como el control de la resistencia vascular, flujo sanguíneo, presión sanguínea, función sexual del macho, protección en isquemia.

b) **NOS inducible.** Es independiente de calcio para su actividad y se localiza principalmente en macrófagos, células inflamatorias, hepatocitos y músculo endotelial. Bajo condiciones fisiológicas su efecto se refleja en horas o días. Tiene efectos antibacterianos, antifúngicos y antitumorales, pero cuando es sobre-producido por la estimulación de lipopolisacáridos, factores de necrosis tumoral u otras citocinas tiende a ser dañino para el organismo (Soberanes, F, *et al.*, 2001).

La producción de NO por los macrófagos es mediada por una estimulación antigénica a nivel de membrana, como lo puede ser un agente infeccioso. La señal se traduce en una fosforilación del inhibidor del factor nuclear kappa- β (I-NF- κ B) el cual es degradado. Una vez liberado el NF- κ B, este se traslada al núcleo, y promueve la transcripción de la óxido nítrico sintetasa, enzima responsable de la producción de NO (Lee, JIK, *et al.*, 1998).

El NO es un compuesto altamente tóxico, que junto con los metabolitos del oxígeno constituyen los elementos microbicidas más eficientes de las células fagocíticas.

La expresión de iNOS puede ser inducida por citocinas como IL-1 β y TNF- α y endotoxinas (Suschek CV, *et al.*, 2002; Estevez A, *et al.*, 2002; Estevez A, *et al.*, 2004; Stickings P, *et al.*, 2002a y b; Chen HQ, *et al.*, 2003; Beauregard C, *et al.*, 2003; Hashimoto T, *et al.*, 2003; Murakami Y, *et al.*, 2002; Reddy S, *et al.*, 2002; Takahashi M, *et al.*, 2002; Ito S., *et al.*, 2002; Teng X, *et al.*, 2002), usualmente en conjunción con IFN γ (Stuehr DJ, *et al.*, 1989; Green, SJ., *et al.*, 1991; 1993). La actividad de la enzima da lugar a la producción de grandes cantidades de NO en macrófagos los cuáles están implicados en aniquilar tumores invasivos (Stuehr DJ, *et al.*, 1989) y parásitos (Green SJ, *et al.*, 1991), destrucción de tejido en diabetes autoinmune y en varios desórdenes inflamatorios como shock séptico, artritis, rechazo de injertos y una gran variedad de fenómenos inmunopatológicos (Green SJ, *et al.*, 1993).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el macrófago juega un papel importante en el control de la infección por *M. tuberculosis* debido a la generación de peróxidos e intermediarios del nitrógeno reactivos (Chan J, *et al.*, 1992).

El mecanismo preciso por el que NO y otras especie de nitrógeno reactivo eliminan a *M. tuberculosis* no se conoce. Pero parece estar involucrado en la ruptura de DNA bacteriano, alteración de proteínas de señalización y/o inducción de apoptosis de macrófagos que albergan micobacterias. (Chan ED, *et al.*, 2001).

A pesar de los efectos potenciales del NO, distintas cepas de *M. tuberculosis* han presentado diferencias en cuanto a la susceptibilidad a los RNI, las razones todavía no se conocen (O'Brien L, *et al* 1994; Rhoades ER *et al.*, 1997; Yu K, *et al.*, 1999).

Se sabe también que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) uno de los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) generados por los macrófagos durante la explosión oxidativa tiene también efectos micobactericidas en fagocitos mononucleares (MP). Las interacciones del NO con las especies reactivas de oxígeno son complejas. Algunas veces estas moléculas se inactivan entre sí, pero, en determinadas circunstancias pueden combinarse para generar radicales peroxinitrato altamente reactivos. (Abbas AK, *et al.*, 1999).

En años recientes varios trabajos han reportado la producción de NO en macrófagos humanos cuando son infectados con *M. tuberculosis* (Fang, FC, 1999, Choi, H. *et al.*, 2002; Chan, ED. *et al.*, 2001; Nicholson S, *et al.*, 1996; Kuo, HP, *et al.*, 2000), sugiriendo que el NO puede tener un papel en el control de la tuberculosis humana (Choi, H. *et al.*, 2002).

1.2. PLANTAS UTILIZADAS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*.

En los últimos años se ha incrementado los reportes de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos de línea, por lo que se han buscado otras alternativas para el tratamiento de la tuberculosis. Una de estas opciones lo constituye la búsqueda de extractos o compuestos de origen vegetal, con actividad antimicrobiana y que provengan de plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de esta enfermedad.

Jiménez-Arellanes y col. (2003) reportaron que los extractos hexánicos de *Artemisia ludoviciana*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*, *Juniperus communis* y *Malva parviflora*, y los extractos metanólicos de *Artemisia ludoviciana* y *Juniperus communis* inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis*. Los extractos acuosos de estas plantas no presentaron actividad.

Grange (1990) realizó experimentos con plantas buscando actividad contra bacterias y especialmente contra *M. tuberculosis*. En este trabajo utilizaron extractos etanólicos de plantas, las cuales fueron preparadas a manera de tinturas, como las usadas en los remedios homeopáticos. Las plantas que presentaron actividad antibacteriana sobre la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* fueron: *Actaea spicata*, *Angustura vera*, *Arnica montana*, *Balsamum peruvianum*, *Cinnamomum camphora*, *Piper cubeba*, *Guaiacum officinalis*.

Shkurupii (2002) encontró que extractos de *Mentha piperita* en concentraciones de 600 y 300 $\mu\text{g/ml}$ administrado en inhalaciones ayuda al control de la tuberculosis.

Tshibangu (2002) reportó que el extracto obtenido con diclorometano de *Amorphophallus bequaertii* inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* a una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Por otro lado se ha demostrado que algunas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional contra diversos agentes infecciosos no tienen actividad tóxica directa contra dichos agentes, sin embargo han sido utilizados con gran éxito. Estudios recientes han demostrado que su éxito se debe a una acción estimuladora sobre el sistema inmunológico, favoreciendo el control de la enfermedad.

Tales son los casos de *Spiraea prunifolia* (So, HS, et al., 1999) y *Dichroa febrifuga* (Murata, K, et al., 1998) usados en el tratamiento de la malaria y de *Kalanchoe pinnata* usada contra la leishmaniasis (Da-Silva, SA, et al., 1999). El extracto de estas plantas no tiene actividad tóxica contra esos protozoarios parásitos, sin embargo activa a los macrófagos con la consecuente producción de óxido nítrico (Murata K, et al., 1998; Da-Silva SA, et al., 1999; So, HS, et al., 1999), el cual es uno de los principales efectores contra agentes infecciosos (Murata, K, et al., 1998, Nathan, CF, et al., 1991; Da-Silva, SA, et al., 1999, Abbas, AK, et al., 1999; So, HS, et al., 1999).

En otro ensayo se evaluó la actividad inmunomoduladora de *Mollugo verticillata*, mediante la producción de NO en células peritoneales tratadas *in vivo* usando el extracto etanólico con y sin BCG. El extracto presentó actividad inmunoestimuladora cuando las células peritoneales fueron

estimuladas *in vitro* con antígeno BCG únicamente. Los estudios fitoquímicos determinaron la presencia de glicósidos triterpenoides y quercetin en el extracto, estos compuestos pueden ser los responsables del efecto en el sistema inmune (Ferreira, AP, *et al.*, 2003).

Gómez-Flores y col. (2002) probaron extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*, la cual ha sido asociada con propiedades antiinflamatorias, antimicrobiales y antitumorales. Se encontró que incrementaba desde 4 hasta 18 veces la producción de NO, así como la producción de TNF- α en macrófagos peritoneales de ratón.

Kolodziej y col. (2003) estudiaron *Pelargonium sidoides*, planta usada en el Sur de África para el tratamiento de varias enfermedades del tracto respiratorio. Se encontró que el extracto acuoso tiene moderada actividad antimicrobacterial y significativa actividad inmunomoduladora. Mediante ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa por la reversa transcriptasa (RT-PCR) en macrófagos de médula ósea de ratón, se observó que estimulaba la síntesis de iNOS y TNF- α .

1.2.1 Gordolobo.

El gordolobo es una de las plantas reportadas en los libros clásicos de herbolaria y utilizadas en la medicina tradicional mexicana para los problemas de tuberculosis, la cual, en ocasiones es citada como "estados tísicos y escrofulosos". (Martínez, M. 1933; Instituto Nacional Indigenista, 1989; Chamouleau AYJ, 1990; Aguilar, A, *et al.*, 1994).

Dependiendo de la localización y comercialización dentro del territorio nacional, a ésta planta conocida con el nombre de gordolobo, corresponden varias especies y géneros e incluso diferentes familias. Bajo el mismo nombre de "gordolobo" han sido registradas más de 10 especies diferentes (Martínez M. 1933; Instituto Nacional Indigenista, 1989; Chamouleau AYJ, 1990; Aguilar A, *et al.*, 1994) (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas utilizadas en medicina tradicional Mexicana registradas bajo el nombre popular de gordolobo

Nombre científico	Familia	Localización
<i>Gnaphalium aff. decurrens</i> E. Ives	<i>Asteraceae</i>	Chihuahua
<i>Gnaphalium canescens</i> DC	<i>Asteraceae</i>	Jalisco
<i>Gnaphalium leucocephalum</i> A. Gray	<i>Asteraceae</i>	Coahuila
<i>Gnaphalium aff. conoideum</i> Kunth	<i>Asteraceae</i>	Tlaxcala
<i>Gnaphalium rodonthum</i>	<i>Asteraceae</i>	Oaxaca
<i>Gnaphalium roseum</i> Kunth	<i>Asteraceae</i>	Michoacán
<i>Gnaphalium obtusifolium</i> L	<i>Asteraceae</i>	Noreste
<i>Gnaphalium sphacellatum</i>	<i>Asteraceae</i>	Nayarit
<i>Gnaphalium oxyphyllum</i> DC	<i>Asteraceae</i>	Sonora
<i>Gnaphalium viscosum</i> Kunth	<i>Asteraceae</i>	DF
<i>Anaphalis margaritaceae</i>	<i>Zygophyllaceae</i>	BCS
<i>Archibaccharis auriculata</i>	<i>Zygophyllaceae</i>	Hidalgo
<i>Senecio barba-johannis</i> DC	<i>Zygophyllaceae</i>	Hidalgo
<i>Senecio sinuatus</i>	<i>Zygophyllaceae</i>	Hidalgo
<i>Bocconia frutescens</i> L	<i>Papaveraceae</i>	Chiapas

1.2.2. Plantas utilizadas en el estudio

Bocconia frutescens

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

DIVISIÓN: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermeae

CLASE: Dicotyledoneae

Subclase: Magnoliopsida

Orden: Papaverales

FAMILIA: Papaveraceae

GÉNERO: *Bocconia*

Especie: *B. frutescens* L

Nombres comunes: Cuatlataya, Gordolobo, Lloro sangre, Mano de león, Palo santo.

Descripción.

Planta arbustiva o arbórea, perennifolia de 1-3 m de alto, con látex amarillo o anaranjado a rojo; tallo a menudo ramificado desde la base, ramas jóvenes lanoso-tomentosas, con hojas aglomeradas hacia la parte superior; hojas con peciolo de 2-8 cm de largo, oblongas a elípticas en contorno general, hasta de 45 cm de largo y 30 cm de ancho (las superiores de dimensiones menores), con frecuencia glaucas, borde pinnatipartido hasta la mitad o menos de la distancia hacia el nervio medio, lóbulos laterales en hojas bien desarrolladas por lo común 6 o menos de cada lado, oblicuamente triangulares a trapeciformes, 2 o menos veces más largos que anchos, su ápice agudo u obtuso, aserrados, la base de la lámina por lo general truncada, haz glabro o casi glabro, envés tomentoso a glabrado; inflorescencia en forma de panícula amplia y laxa, muy ramificada, hasta de unos 40 cm de largo y 30 cm de ancho, brácteas oblongas-lanceoladas, de alrededor de 1 cm de largo; flores numerosas sobre pedicelos finos hasta de 1 cm de largo; 16-20 estambres, filamentos delgados de 3-5 mm de largo, anteras lineares de unos 6 mm de largo; ovario estipitado, estilo evidente, estigma bmelado; fruto elipsoide, angostándose hacia ambos extremos de 7-8 mm de largo, tanto reple como estilo (4 mm de largo) y estigma (4 mm de largo) persistentes, estípita hasta de 1 cm de largo; semillas de alrededor de 6 mm de largo, oscura, levemente reticulada, con un arrio basal evidente, cupuliforme, escamoso-pulposo. Florece y fructifica todo el año. (<http://148.233.168.204/pfnm/BocconiaFrutescens.html>).

Los estudios de los compuestos presentes en esta planta reportan la existencia de alcaloides, saponinas y triterpenos en hojas y flores, y de alcaloides y triterpenos en tallos. Las pruebas para glicósidos cardiotónicos, esteroides, antraquinonas, glicósidos cianogénicos y antocianinas se reportaron negativas. La presencia de alcaloides, saponinas y triterpenos puede dar indicio de la posible actividad biológica, ya que los alcaloides reportados en la Familia Papaveraceae son de gran importancia médica por las diversas actividades biológicas que presentan (analgésicas, narcotizantes, antimicrobianos, antitusígenos) y se conoce también que algunas saponinas y triterpenos son activos (Sánchez Arreola, E, *et al* 2001). Caballero-George y col. (2002 y 2003) encontraron alcaloides en el extracto etanólico de la raíz de la misma especie.

Gnaphalium sp

REINO: Plantae

PHYLUM: Magnoliophyta

DIVISIÓN: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermeae

CLASE: Dicotyledoneae

SUBCLASE: Magnoliopsida

Orden: Asterales

FAMILIA: Compositae o Asteraceae

GÉNERO: *Gnaphalium*

Especies: *G. aff decurrens* E. Ives

G. leucocephalum A Gray

G. canescens DC

Descripción.

Hierba anual o bienal de 10-40 cm de altura, con uno o varios tallos blanquecinos y densamente lanosos que parte de una roseta basal presente o ausente durante la floración; hojas de la roseta, oblanceoladas a espatuladas, de 20-70 mm de largo y 3-15 mm de ancho, o de 9-70 mm de largo y 3-11 mm de ancho, ambos tipos de hojas con el ápice romo a subagudo, mucronado, borde a veces repando, base largamente atenuada a no atenuada, bicoloras o excepcionalmente concoloras, con el haz glabrescente de color verde y en el envés densamente lanoso o excepcionalmente glabrescente; inflorescencia formada de glomérulos dispuestos en forma de espiga continua, ocasionalmente compuesta, interrumpida sólo en la base o muy alargada e interrumpida en toda su longitud; la porción continua de la inflorescencia mide 15-50 mm de largo; cabezuelas cilíndricas a acampanadas, de 3-4.5 mm de largo y 2-2.5 mm de ancho, con 3 a 5 series de brácteas, cuyo número varía entre 18 y 22, las exteriores ovadas a ovada-lanceoladas, de ápice agudo, rarísimamente romo, lanosa en su base, de color café, las interiores oblongas a lineares, con el ápice romo a agudo, glabras, de color café; flores hermafroditas 3 a 4 las femeninas 48 a 75, ambos tipos de flores de 3-3.8 mm de largo y con el ápice de la corola café o café amarillento; aquenios oblongos, de 0.7-0.8 mm de largo, de color beige a café oscuro,

superficie papilada; cerdas del vilano blancas, unidas en su base y desprendiéndose del aquenio formando un anillo (<http://148.233.168.204/pfnm/Gnaphalium.Americanum.html>).

Villagomez-Ibarra y col. (2001) reportaron en las variedades de montaña de *Gnaphalium oxyphyllum oxyphyllum*, *G. liebmannii* y *G. viscosum* actividad antibacteriana en los extractos hexánicos, metanólicos y en los extractos obtenidos con acetil acetato de flores, hojas y vástagos. Los extractos hexánicos mostraron en todos los casos la inhibición más alta. El extracto de flor de *G. oxyphyllum* exhibió la gama más amplia de actividad antimicrobiana.

Meragelman y col. (2003) encontraron diterpenos, con velutin, esqualenos y estigmasterol en el extracto metanólico de *G. gaudichaudianum*. Morimoto y col. (2003) encontraron flavonoides con actividad insecticida en la especie *G. aff. D. Don*.

Rojas-G y col. (2001) probaron diversos extractos crudos, hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de *Gnaphalium oxyphyllum* y *G. americanum* para evaluar la actividad antimicrobiana potencial contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, y *Candida albicans*. La concentración mínima inhibitoria fue <5 mg/ml, determinada por un análisis de dilución doble.

Mongelli y col. (1995) reportaron que *Gnaphalium spicatum* presenta actividad parcial contra *Staphylococcus aureus*.

Caceres y col. (1990) encontraron que *Gnaphalium stramineum* presenta actividad contra *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. Typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*. En un estudio posterior (1991) reportaron que *Gnaphalium viscosum* es efectivo contra *S. pyogenes*.

2. IMPORTANCIA.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas considerada actualmente como uno de los principales problemas de salud mundial debido al aumento del número de pacientes que la padecen y a la aparición de cepas drogo-resistentes. Aunque actualmente se cuenta con diversas drogas, la búsqueda continua de nuevas drogas menos tóxicas y más eficaces está plenamente justificada.

Los conocimientos utilizados desde la época de nuestros antepasados en la medicina tradicional y la riqueza existente de plantas registradas y clasificadas taxonómicamente en los diferentes herbarios del país (Aguilar A, *et al.*, 1994) deben aprovecharse con el fin de buscar alternativas en el tratamiento de la tuberculosis. Es necesario realizar estudios científicos de los extractos de plantas utilizadas, con el fin de corroborar su actividad, determinar sus componentes y la potencia de los mismos.

Al igual que muchas otras plantas medicinales, el "gordolobo", a pesar de su uso difundido en la medicina herbolaria, no tiene estudios que confirmen su valor terapéutico en la tuberculosis. Por lo que la búsqueda de algún producto vegetal que actúe contra el bacilo, ya sea de manera directa o a través de la activación del sistema inmune para contener y eliminar a la bacteria contribuiría al control de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS.

Los extractos de las hojas y flores de diferentes especies conocidas comúnmente como gordolobo en la medicina tradicional para el tratamiento de pacientes con tuberculosis, presentan actividad tóxica contra *Mycobacterium tuberculosis* y/o actividad estimuladora sobre macrófagos.

4. OBJETIVOS.

General.

Determinar *in vitro* la actividad inhibitoria del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y la actividad estimuladora sobre macrófagos de los extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y hexánicos de plantas conocidas comúnmente como gordolobo.

Específicos.

1. Determinar la actividad inhibitoria del crecimiento de *M. tuberculosis* de extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y hexánicos de hojas, flores y tallos de algunas especies de gordolobo mediante la técnica de Azul Alamar.
2. Determinar el efecto activador sobre macrófagos de los extractos acuoso, etanólico, metanólico y hexánico de las hojas y flores y tallos de algunas especies de gordolobo, usando como monitor la expresión de la enzima iNOS y de IL-1 β por RT-PCR.
3. Caracterizar parcialmente la composición de los extractos de gordolobo por medio de reacciones químicas de identificación de grupos funcionales.

5. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

5.1 MUESTRAS VEGETALES.

5.1.1 Recolección.

Las muestras de hojas, tallos y flores colectadas corresponden a las especies: *Gnaphalium aff. decurrens* E. Ives (Guadalajara, Jalisco), *G. leucocephalum* A Gray (Chihuahua, Chihuahua), *G. canescens* DC (Sierra de Arteaga, Coahuila) y *Bocconia frutescens* L (Pahuatlán, Puebla).

Una vez colectadas, se envió una muestra al Herbario IMSSM y al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL para su clasificación y depósito, extendiéndose los certificados correspondientes (voucher). Las muestras se secaron a temperatura ambiente, se separaron en hojas, tallos y flores. Se molieron, primero en un procesador de alimentos (Kitchen Aid MKFP450WW; Whirlpool, Francia) y posteriormente, para hacerlo mas fino, en un procesador para café (Kups Fast-Touch modelo 203, México).

5.1.2. Obtención de extractos (anexo I).

De cada muestra se obtuvo un extracto acuoso, etanólico, metanólico y hexánico (Cruz-Vega, DE., 2002)

Extracto acuoso. Un litro de agua se calentó a ebullición y se retiró del fuego, inmediatamente después se agregaron 30 g de muestra previamente molida (hojas o tallo o flor). Se tapó y se dejó en reposo hasta que la infusión estuviera a temperatura ambiente. El extracto resultante fue filtrado a través de un lienzo de algodón y posteriormente por papel filtro Whatman #3. Finalmente se sometió a liofilización y se almacenó en frascos de vidrio con tapón de rosca a temperatura ambiente hasta su uso (no mas de 1 año). Para su análisis, el liofilizado se disolvió en 1 ml de agua por cada 2 mg de muestra, la solución se esterilizó por filtración (0.2 μ) y se ajustaron a las concentraciones deseadas con medio de cultivo.

Extracto etanólico. Se pesaron 30 g de muestras molidas de hoja o tallo o flor y se dejaron agitando a baja velocidad en 1.5 litros de etanol por una semana en obscuridad. Se filtró a través de un lienzo de algodón crudo y después con papel filtro Whatman #3. El extracto se

evaporó a sequedad en rotavapor Büchi Safety Vap® R205 Brinkmann (Palo Alto, California) y se almacenó en frasco con tapón de rosca en lugar fresco y seco hasta su uso (no mas de 1 año). Para su análisis, el extracto se disolvió en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) por cada 2 mg de muestra. Las concentraciones a usar se ajustaron con medio de cultivo.

Extracto hexánico. Treinta gramos de muestra de hojas o tallos o flores molidas se sometieron a reflujo continuo en soxhlet por 7 días con 700 ml de hexano. El extracto obtenido fue filtrado con papel filtro No 1 (Fisher 09-802) y el hexano del extracto se eliminó por evaporación en un rotavapor a presión reducida hasta sequedad. Se almacenó en frasco con tapón de rosca en lugar fresco y seco hasta su uso (no mas de 1 año). Para su análisis, el extracto se disolvió en 1 ml de DMSO por cada 2 mg de muestra. Las concentraciones deseadas se ajustaron con medio de cultivo.

Extracto metanólico. Cada una de las muestras residuales de hojas o tallos o flores de la extracción con hexano se sometieron a reflujo continuo en un soxhlet por 7 días con 700 ml de metanol. El extracto se manejó de la misma manera que el anterior.

5.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS.

5.2.1 Actividad Anti-micobacteriana de los extractos vegetales:

Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias se utilizó la técnica de azul alamar, la cual permite tener resultados en tan solo 8 días, además de no requerir equipo especializado (Changsen, C, *et al.*, 2003; Woldemichael, GM, *et al.*, 2003; Luna-Herrera, J, *et al.*, 2003; Franzblau, SG, 2000; Pietro, RC, *et al.*, 2000; Franzblau, SG, *et al.*, 1998; Collins, L, *et al.*, 1997).

5.2.1.1 *Micobacterias.* Se usó la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* cultivada en medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC.

5.2.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (anexo II a). En microplacas de 96 pozos se agregaron 100 μ l de medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (anexo III, Tabla 10). Se agregaron 100 μ l de cada uno de los extractos a concentraciones iniciales de 2000, 200 y 20 μ g/ml a una hilera de la microplaca y se hicieron microdiluciones (1:2) dejándose una hilera sin extracto la cual sirvió como control de crecimiento de la bacteria. Posteriormente se inocularon 100 μ l de suspensión bacteriana, la cual fue ajustada previamente con nefelómetro de McFarland al tubo No. 1 (densidad óptica de 0.6) y diluidas 25:1 para obtener una concentración final de 1×10^4 bacterias/ml. Los pozos del perímetro fueron llenados con agua destilada estéril para minimizar la evaporización en la placa. Las microplacas fueron selladas con cintas adhesivas e incubadas a 37 °C por 5 días. Al quinto día, se agregaron 50 μ l de mezcla de alamar azul a un pozo control (anexo II, a; anexo 3, Tabla 11) y se dejaron incubando por 24 h a 37 °C. Si el cultivo viraba a rosa, entonces el colorante era agregado a los demás pozos. En caso de no virar, el colorante era agregado a otro pozo control y reincubado un día más. El color azul es interpretado como "no-crecimiento", mientras que el color rosa, indica "crecimiento". La MIC se define como la concentración más baja del extracto que inhibe el crecimiento de la micobacteria (Franzblau SG, *et al.*, 1998). Como control de actividad antimicobacteriana se usaron Isoniacida y Rifampicina a una concentración inicial de 125 μ g/ml y microdiluciones (1:2). La cepa H37Rv es susceptible a estas drogas (Franzblau, S., *et al.*, 1998).

5.2.2 Determinación del efecto sobre macrófagos (anexo II b).

5.2.2.1 Cultivo y activación de Macrófagos.

Monocitos extraídos de médula ósea de ratones BALB/c se cultivaron en microplacas de 6 pozos a una concentración de 3×10^6 cel/pozo a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo, 10% de suero fetal bovino, 15% de medio condicionado (sobrenadante del cultivo de células L929 de 5 días), 0.5 ml de mercaptoetanol 5×10^{-5} M, 2 ml de NaHCO₃ al 7.5% y 1 ml de antibiótico (antibiotic-antimycotic 100X, Invitrogen, Carlsbd, CA, USA) (anexo II, Tabla 12). Se incubaron por 10 días para que se diferenciaron a macrófagos. Al décimo día, se retiró el medio y se agregó medio fresco adicionado con 125 µg/ml de los extractos a analizar. Como control positivo de la activación de macrófagos, cultivamos las células con 2 µg/ml de LPS (O111:B4, Sigma, Saint Louis, MO, USA) o 400 ng/ml de PMA (Sigma). Mientras que las células cultivadas en las mismas condiciones pero sin estímulos externos correspondieron al control de células no activadas. Una cantidad igual de DMSO (0.894 M) usado para la dilución de los extractos se añadió a una serie de cultivos para descartar que el DMSO tuviera efecto sobre las células. En todos los casos los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones por 6 h.

5.2.2.1 Determinación de la activación de los macrófagos por los extractos.

Como evidencia de la activación de los macrófagos, se analizó la expresión de la enzima iNOS y las interleucinas IL-1β e IL-10 mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Como control de la calidad de las células y de la reacción de RT-PCR se analizó la expresión de la Glicerinaldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (anexo II, b).

Obtención de RNA (anexo III c).

A los macrófagos tratados con los extractos o controles de activación por 6 horas, se les retiró el medio y se les agregaron 600 µl de amortiguador de lisis [isotiocianato de guanidinium 4M (Sigma), sarcosil 0.5% (Sigma), citrato de sodio 1mM (Merck) y 2-mercaptoetanol 128.7 mM (Sigma)] (anexo III, tabla 15). El contenido de los pozos (lisado) se colectó en tubos eppendorf y se almacenó a - 70 °C hasta su uso (1 a 3 días) (anexo II, b).

Al lisado de los macrófagos se le agregaron 50 μ l acetato de sodio 2M (Merk), 500 μ l de fenol ácido pH 4.3 (Sigma) y 100 μ l de cloroformo (Merk) y se dejaron por 15 min en hielo agitándose cada 5 min. Las muestras se centrifugaron a 12,500 Xg por 5 min a 5° C (centrífuga Beckman J2-MC, Palo Alto, California). El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le agregó un volumen de Trizol, (Invitrogen) y 200 μ L de cloroformo. Se centrifugó a 18,700 Xg por 5 min a 5 °C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se le agregaron 500 μ l de isopropanol. Se centrifugó a 18,700 Xg por 5 min a 5 °C. El sobrenadante se decantó y a la pastilla se le agregaron 800 μ L de etanol al 80% en agua DEPC (1%). Se centrifugó a 18,700 Xg por 5 min a 5° C. Las muestras se dejaron secar en estufa a 37 °C de 10 a 15 min y se disolvieron en 8 μ l de agua DEPC.

La concentración del RNA extraído y su pureza se determinó al calcular la proporción de RNA/Proteínas (≥ 1.8) obtenida de la lectura de la absorbancia a 280/260 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). La integridad del RNA se observó luego de correr las muestras en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes por 60 min a 50 V (anexoII, c). Los geles se visualizaron en un espectro: Alpha Imager™ 200, DOCUMENTATION & Analisis System (San Leandro, CA, USA).

Producción de cDNA.

Se añadieron 2 μ l de oligo dt₁₂₋₁₈ (0.5 μ g/ml) (Gibco, BRL) a las muestras disueltas en 8 μ l de agua DEPC cada muestra y se incubó a 65°C por 10 min en un termociclador (Gene Amp PCR systems 2400 Perkin Elmer, Nolkwalk, Ct, USA). Después se colocó en hielo 5 min, se centrifugó por 10 seg y se le agregaron 10 μ l de mezcla de reacción (transcriptasa reversa) (anexo III, Tabla 13). La reacción se incubó a 37°C por 1 h y posteriormente a 95°C por 5 min para inactivar la enzima. Se agregaron 80 μ L de agua DEPC para un volumen final de 100 μ l. Las muestras se congelaron a -20 °C hasta su uso (1 a 3 días) (anexo II, c).

PCR.

A 5 μ l de cada muestra de cDNA se le agregaron 45 μ l de la mezcla de reacción para PCR (anexo II b). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Gene Amp PCR systems 2400) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 94 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 seg, 60 °C por 45 seg, 72 °C por 1:30 min y un paso final a 72 °C por 5 min. Las muestras se cargaron en gel de agarosa al 2% en TBE 1X (anexo III, Tabla 16) y se corrieron por 60 min a 100 V. Los geles se cargaron con una mezcla conteniendo 6 μ l de cada muestra y 2 μ l de solución de carga (anexoII c). El marcador de peso molecular (Molecular Weight Markers IX, Roche, Mannheim, Germany) fue usado de acuerdo al fabricante. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) por 2 min y se observó con luz UV en un transiluminador (Alpha Imager 200, San Leandro, CA, USA) (anexo II, c).

5.3 REACCIONES QUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN.

Las reacciones químicas de identificación fueron realizadas en todos los extractos siguiendo la metodología propuesta por Domínguez (1973). En todos los casos, la porción suficiente de extracto para realizar las reacciones fue la cantidad que se tomó con un aplicador de madera.

5.3.1 Identificación de Saponinas.

Prueba de Salkowski: a una porción de extracto se le agregaron 2-3 gotas de cloroformo, más 2-3 gotas de ácido sulfúrico. Un color café rojizo fue considerado como positivo.

Lieberman-Bouchard: Se disolvió una pequeña muestra en cloroformo, se le añadió el reactivo (que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo); la aparición de cualquier color en el lapso de 1 h indicó que la prueba era positiva.

5.3.2 Identificación de Lactonas.

Prueba de Shinoda: a una porción de extracto se le agregaron 3 o 4 gotas de hidróxido de sodio al 10 %. Si se formaba un color amarillo y desaparecía al agregar gotas de ácido sulfúrico se consideró como resultado positivo.

5.3.3 Identificación de Flavonoides.

Prueba de ácido sulfúrico: Una pequeña cantidad de muestra se disolvió en ácido sulfúrico concentrado, la prueba es positiva para flavonas y flavonoles si se observaron coloraciones amarillas; para flavonas naranja-guinda y para chalconas rojo-azuloso. Las quinonas se observaron con coloración roja- púrpura.

5.3.4 Identificación de Sesquiterpenlactonas.

Prueba de Baljet: Se utilizaron dos soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. Para la prueba se colocaron 2-3 mg del extracto más 3

a 4 gotas del reactivo, las muestras positivas para sesquiterpenlactonas formaron una coloración naranja o roja oscura.

5.3.5 Prueba de $KMnO_4$.

Al extracto se le agregó gota a gota una solución de $KMnO_4$ al 2 % en agua. Fueron positivas las que presentaron decoloración con más de tres gotas de reactivo.

5.3.6 Prueba para identificar Oxhidrilos fenólicos.

La muestra se disolvió en etanol y se agregó una gota de solución de cloruro férrico en piridina al 2.5 %. Fue positiva con la aparición de coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde.

5.3.7 Prueba para grupo carboxilo.

A la muestra disuelta en 3 gotas de etanol se le agregaron de 2 a 3 gotas de solución acuosa de bicarbonato de sodio 1.5 N. Fue positiva al desprenderse burbujas de dióxido de carbono.

5.3.8 Identificación de Triterpenos y Esteroles:

Prueba de Lieberman Burchard: una pequeña muestra de extracto se disolvió en cloroformo para añadir el reactivo (una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo); fue positiva si aparecía cualquier color en el lapso de 1 h.

5.3.9 Identificación de Cumarinas.

Se disolvieron el extracto en 1 ml solución de NaOH al 10 %. La prueba fue positiva cuando apareció una coloración amarilla que desapareció al acidular.

5.3.10 Identificación de Carbohidratos.

Prueba de antrona: El extracto se disolvió en 1 ml de agua mas 1 ml de solución de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado. Un anillo azul verdoso en la interfase fue positivo.

5.3.11 Alcaloides.

Prueba de Dragendorff: Solución A: Se disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua. Solución B: Se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 ml de solución A, 4 ml de solución B y 100 ml de agua. Se disolvió el extracto en etanol y se colocaron unas gotas en una placa de porcelana, se añadieron 3 gotas del reactivo de Dragendorff, la prueba fue positiva al aparecer un precipitado naranja marrón.

Prueba de Wagner: Se disolvieron 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua; la solución se afora con 100 ml de agua destilada. Se agregaron 4 gotas del reactivo al extracto, se considera positiva al observarse un precipitado marrón.

6. RESULTADOS.

6.1 COLECTA Y CLASIFICACIÓN DE PLANTAS CONOCIDAS COMO GORDOLOBO.

Se colectaron cuatro diferentes especies de plantas, conocidas todas ellas como gordolobo. Las plantas colectadas fueron clasificadas en el Herbario IMSSM y en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, asignándole su voucher (registro) correspondiente. En la tabla 2 se describe el nombre científico y la procedencia de cada especie.

Tabla 2. Nombre científico y procedencia de cada especie colectada.

Clasificación	Procedencia	Voucher
<i>Gnaphalium canescens</i> E. Ives	Sierra de Arteaga, Coahuila	024180*
<i>Gnaphalium leucocephalum</i> A. Gray	Chihuahua, Chihuahua	024179*
<i>Gnaphalium aff. decurrens</i> DC	Guadalajara, Jalisco	024178*
<i>Boconnia frutescens</i> L.	Pahuatlán, Puebla	14767**

* FCB, UANL ** Herbario IMSSM

6.2 EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS PLANTAS COLECTADAS.

Se obtuvieron extractos acuosos, etanólicos, hexánicos y metanólicos de tallos y flores de *G. leucocephalum*, *G. canescens* y *G. aff decurrens*, así como de hojas de *B. frutescens* de acuerdo a la metodología descrita. En las tablas 3, 4, 5 y 6 se muestran las cantidades y el rendimiento porcentual de cada una de ellas en cada uno de los diferentes procesos de extracción. El número asignado a cada extracto fue arbitrario de acuerdo al orden de obtención. El rendimiento porcentual se calculó dividiendo el peso inicial entre el peso seco obtenido X 100.

Tabla 3. Número asignado a cada extracto, parte de la planta utilizada, gramos obtenidos y rendimiento para *Gnaphalium canescens*.

No.	Extracto	Parte de la planta	gramos	Rendimiento %
1	etanólico	Flor	11.4	9.5
2	etanólico	Tallo	5.0	4.2
3	hexánico	Flor	3.2	5.6
4	metanólico	Tallo	1.1	1.8
5	hexánico	Tallo	0.9	4.5
8	metanólico	Flor	1.0	3.3
14	acuoso	Flor	0.7	7.0
20	acuoso	Tallo	0.9	12.0

Tabla 4. Número asignado a cada tipo de extracto, parte de la planta utilizada, gramos obtenidos y rendimiento para de *G. leucocephalum*.

No.	Extracto	Parte de la planta	gramos	Rendimiento %
6	etanólico	Flor	8.2	13.7
7	etanólico	Tallo	6.3	10.5
15	acuoso	Flor	1.5	10
21	hexánico	Tallo	2.2	7.3
23	metanólico	Tallo	2.3	7.7
24	acuoso	Tallo	1.4	7.3
26	metanólico	Flor	1.9	6.3
27	hexánico	Flor	1.6	5.3

Tabla 5. Número asignado a cada tipo de extracto, parte de la planta utilizada, gramos obtenidos y rendimiento para *G. aff. decurrens*.

No.	Extracto	Parte de la planta	gramos	Rendimiento %
9	etanólico	Flor	8.3	13.8
10	etanólico	Tallo	7.7	12.8
11	hexánico	Flor	1.6	5.3
18	acuoso	Flor	2.1	14.0
19	acuoso	Tallo	3.8	25.0
22	hexánico	Tallo	1.6	5.3
25	metanólico	Flor	3.8	12.7
28	metanólico	Tallo	6.1	20.3

Tabla 6. Número asignado a cada tipo de extracto, parte de la planta utilizada, gramos obtenidos y rendimiento para *B. frutescens*.

No.	Extracto	Parte de la planta	gramos	Rendimiento %
12	hexánico	Hoja	3.7	6.2
13	etanólico		7.4	12.3
16	metanólico		14.9	24.8
17	acuoso		8.7	19.2

6.3 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis* CEPA H37Rv POR LOS EXTRACTOS DE GORDOLOBO.

Se probó la actividad anti-micobacteriana de cada uno de los extractos mediante la técnica de azul alamar. Los extractos hexánico y metanólico de hoja de *B. frutescens* presentaron una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/ml (Fig. 1). Los extractos del género *Gnaphalium* no presentaron actividad (Fig. 2, 3 y 4).

Las concentraciones de Rifampicina e Isoniacida utilizadas fueron de 120 a 0.486 µg/ml y en todos los casos las drogas fueron efectivas para inhibir el crecimiento de la bacteria (Tabla 7, Fig. 1). El DMSO fue usado como diluyente de los extractos, por lo que este compuesto fue añadido en las mismas concentraciones a cultivos control. Las concentraciones más altas de DMSO fueron tóxicas para las bacterias y el punto donde la concentración de DMSO no produjo inhibición del crecimiento lo designamos "punto de corte". La inhibición del crecimiento producida por los extractos por debajo del punto de corte es la inhibición real dada por los extractos.

Tabla 7. Controles utilizados en las prueba de Azul Alamar. La concentración mínima que se probó de los antibióticos fue de 0.486 µg/ml. El punto de corte con el DMSO fue a partir del 25%.

Control	Abreviatura	(µg/ml)
Testigo	T	N.P.
Isoniacida	I	0.486
Rifampicina	R	0.486
DMSO	DM	12.5%

*N.P. No presentó

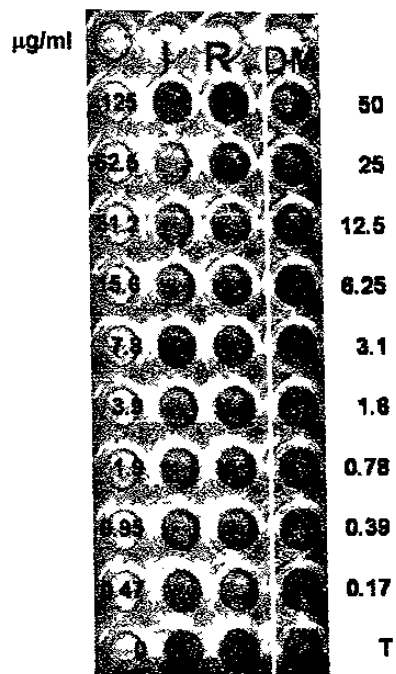


Figura 1. Controles usados en la prueba de azul alamar para la determinación de actividad antimicobacteriana de los extractos sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv. La concentración mínima usada de los antibióticos fue de 0.47 µg/ml. La actividad por parte del DMSO fue hasta la concentración de 12.5%.

Extracto	Numero	Parte de la Planta	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
acuoso	17	Hoja	N.P.*
etanólico	13		N.P.*
metanólico	16		125
hexánico	12		125

NP No presentó

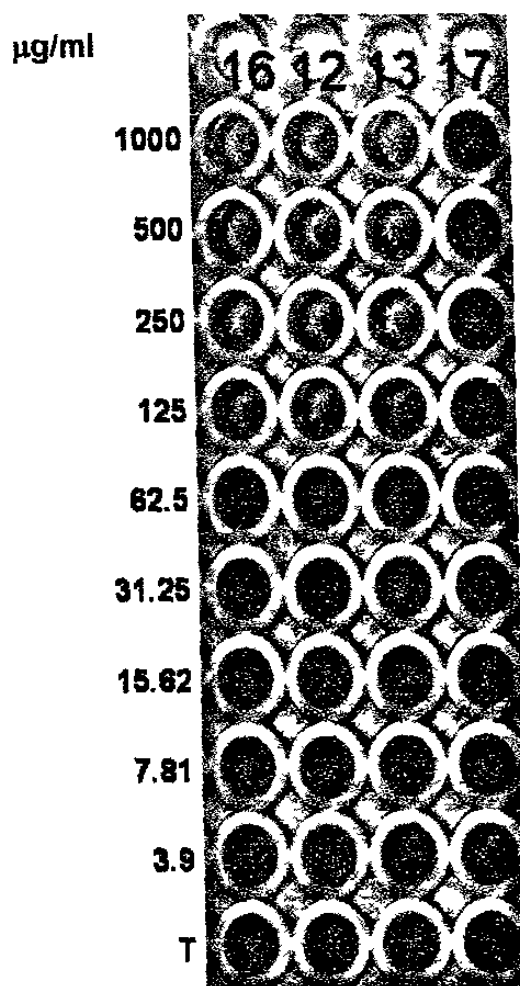


Figura 2 Determinación de actividad antimicobacteriana de los extractos de hoja de *B. frutescens* sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv mediante la técnica de azul alamar. La MIC correspondió a 125 $\mu\text{g/ml}$ en los extractos 12 (hexánico) y 16 (metanólico).

Extracto	Número	Parte de la Planta	MIC (µg/ml)
acuoso	14	Flor	NP
	20	Tallo	NP
etanólico	1	Flor	NP
	2	Tallo	NP
metanólico	8	Flor	NP
	4	Tallo	NP
hexánico	3	Flor	NP
	5	Tallo	NP

NP No presentó

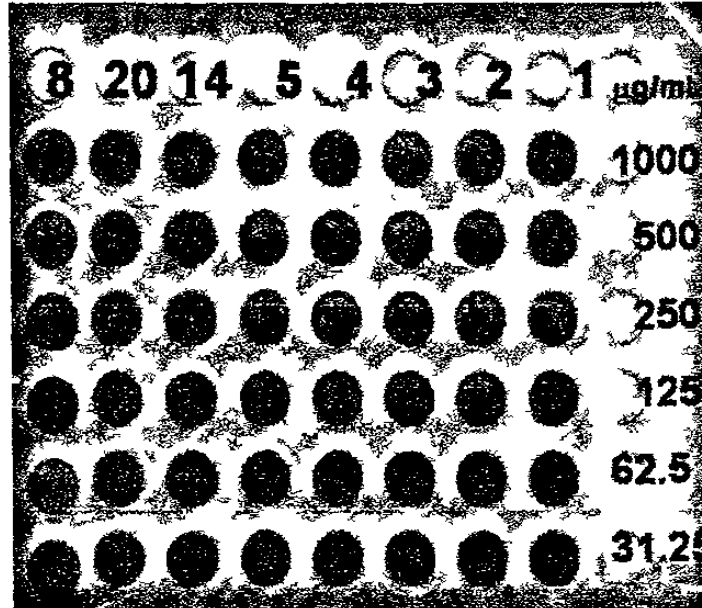


Figura 3. Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos de *G. canescens* sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv mediante la técnica de azul alamar.

Extracto	Número	Parte de la Planta	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
acuoso	24	Flor	NP
	15	Tallo	NP
etanólico	6	Flor	NP
	7	Tallo	NP
metanólico	26	Flor	NP
	23	Tallo	NP
hexánico	21	Flor	NP
	27	Tallo	NP

NP: No presentó

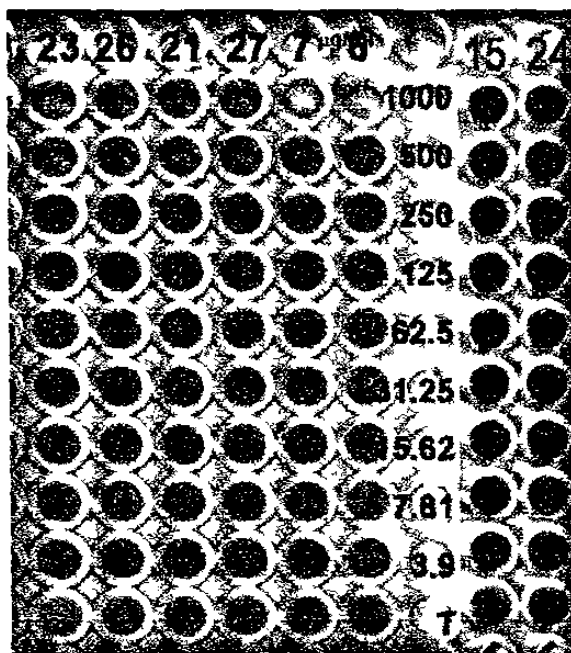


Figura 4 Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos de *G. leucocephalum* sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv mediante la técnica de azul alamar.

Extracto	Número	Parte de la Planta	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
acuoso	19	Flor	NP
	18	Tallo	NP
etanólico	9	Flor	NP
	10	Tallo	NP
metanólico	25	Flor	NP
	28	Tallo	NP
hexánico	22	Flor	NP
	11	Tallo	NP

NP: No presentó

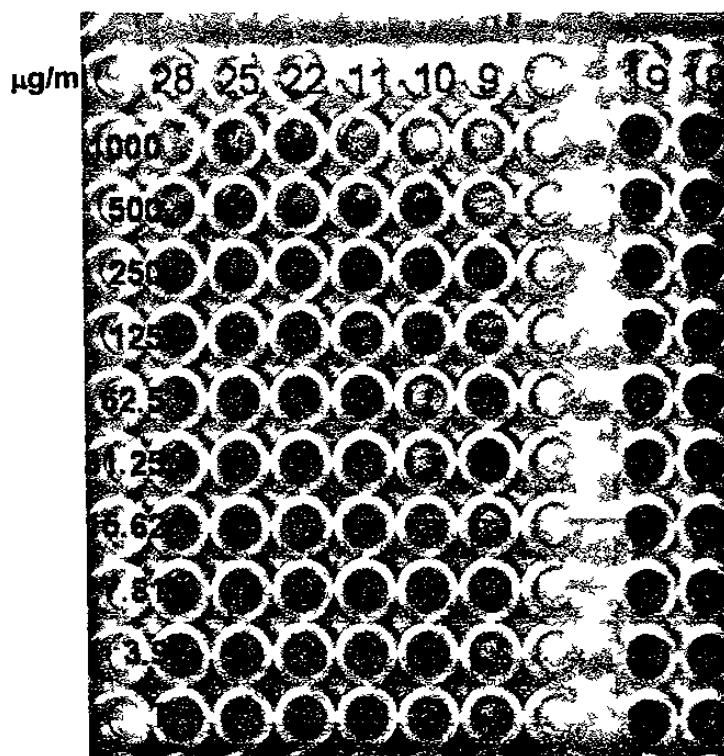


Figura 5. Determinación de la actividad antimicobacteriana de los extractos de *G. aff decurrens* sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv mediante la técnica de azul alamar.

6.4.2 Expresión de IL-1 β .

En todos los ensayos los macrófagos expresaron IL-1 β (Fig. 8), incluso los macrófagos que no recibieron ninguna estimulación. Las células estimuladas con PMA, LPS, o los extractos 11, 12 y 16 mostraron una aparente mayor expresión de IL-1 β al observarse las bandas de los amplicones más intensas. Esto indica que existen niveles basales de expresión de esta interleucina y su expresión aumenta cuando son estimuladas con los extractos vegetales.

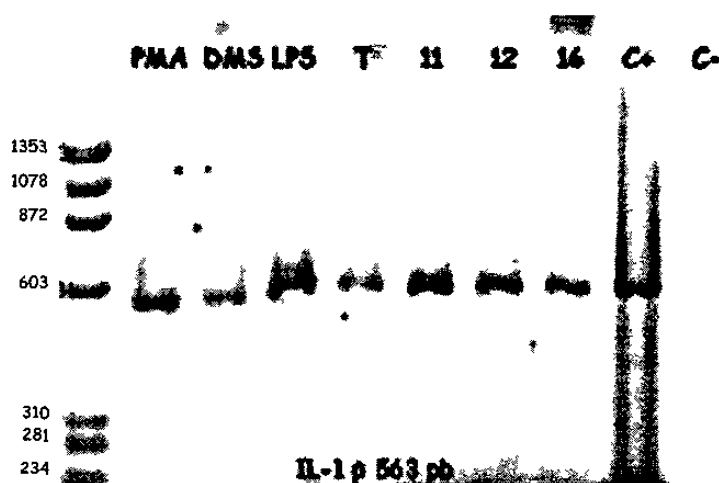


Figura 8. Expresión de IL-1 β en macrófagos medulares de ratón estimulados con extractos de gordolobo.

6.4.3 Expresión de iNOS.

Los macrófagos incubados con los extractos hexánico de flor de *G. aff decurrens* (muestra 11) con el extracto metanólico de hoja de *B. frutescens* (muestra 16) y con el control positivo PMA mostraron la expresión de la enzima iNOS (Fig. 9). Al resto de los extractos ensayados no se les detectó inducción en la expresión de esta enzima.

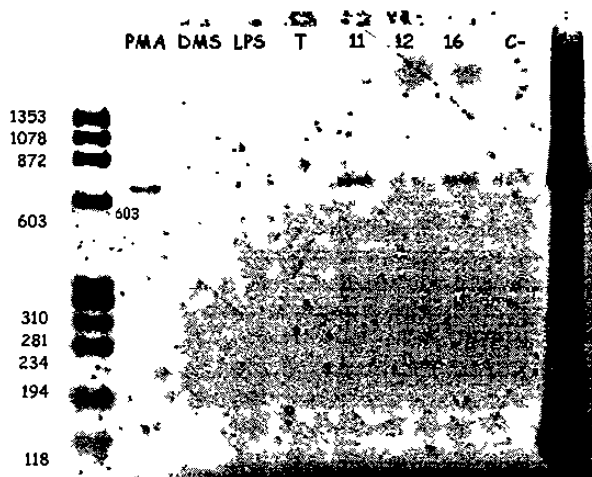


Figura 9. Expresión de iNOS en macrófagos medulares de ratón estimulados con extractos de gordolobo. Los extractos 11 (hexánico, flor *G. aff. decurrens*) y 16 (metanólico, hoja *B. frutescens*) indujeron su expresión.

6.4.4 Expresión de IL-10.

Los macrófagos expuestos a los compuestos y extractos usados no se detectó la expresión de IL-10 (Fig. 10), esto indica que los extractos no poseen actividad anti-inflamatoria.

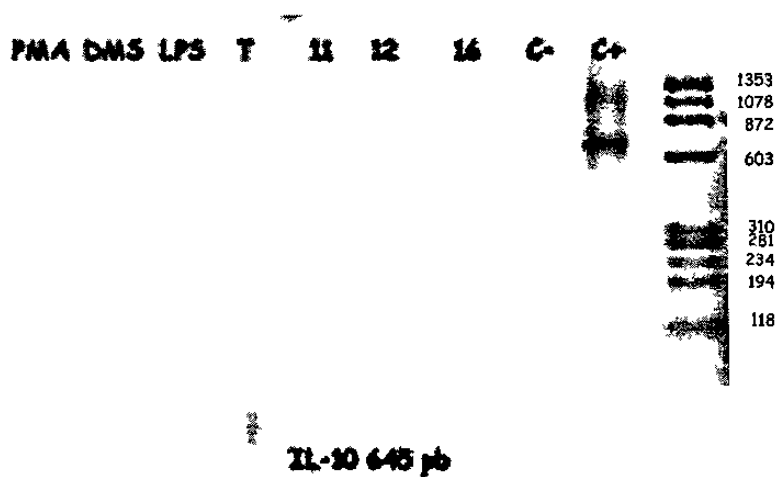


Figura 10. Ausencia de expresión de IL-10 en macrófagos medulares de ratón estimulados con extractos de gordolobo.

Tabla 9. Resumen de la expresión inducida por cada uno de los extractos mediante la prueba de RT-PCR.

Compuesto	IL-1 β	iNOS	IL-10
PMA	+	+	-
LPS	+	-	-
DMS	+	-	-
T	+	-	-
11	+	+	-
12	+	-	-
16	+	+	-

+ Expresa - No expresa

6.5 PRUEBAS PARCIALES DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS.

Se identificaron parcialmente los compuestos presentes en cada uno de los extractos (Tabla 9).

El extracto metanólico de hoja de *B. frutescens*, con actividad antimicrobacteriana e inmunoestimulante, presentó insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cumarinas, grupos carbonilo, alcaloides, carbohidratos y lactonas. No se observaron triterpenos, esteroides y flavonoides.

El extracto hexánico de hoja de *B. frutescens*, solo con actividad antimicrobacteriana, presentó insaturaciones, esteroides, sesquiterpenlactonas, cumarinas, grupos carbonilo, alcaloides, carbohidratos y lactonas; no se evidenciaron oxhidrilos fenólicos y flavonoides

El extracto hexánico de flor de *G. aff decurrens*, el cual únicamente presentó actividad estimuladora sobre los macrófagos, mostró insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, flavonas, grupos carbonilo, carbohidratos y lactonas. No se detectaron triterpenos, esteroides y alcaloides.

Tabla 10. Caracterización parcial de los principios activos de los extractos.

Extracto	Parte de la planta	Especie	Insaturaciones		Ox. Fen	Trit y Es.	Cu	Sesquiterpen -lactonas		Flav.			Alcaloides			Cabo-hidratos	Lac.
			Br/CCl ₄	KMnO ₄				BA	LE	SH	SA	DR	WA	MO			
A	F	<i>G. canescens</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
E	F		+	+	+	tr	+	+	+	+	fl	-	-	-	+	+	+
H	F		+	+	+	-	-	-	+	-	fl	-	-	-	+	+	-
M	F		+	+	+	-	-	-	+	+	fl	-	-	-	+	+	-
A	T		+	+	+	tr	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
E	T		+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
H	T		+	+	+	-	-	-	+	-	fl	-	-	-	+	+	-
M	T		-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A	F		+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
E	F		+	+	+	-	+	+	+	+	fl	-	-	-	+	+	+
H	F		+	+	+	tr	+	+	+	-	fl	-	-	-	+	+	+
M	F		+	+	+	-	+	+	+	+	fl	-	-	-	+	+	+
A	T	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
E	T	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
H	T	+	+	+	es	+	+	+	-	fl	-	-	-	+	+	+	
M	T	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	

Extracto	Parte de la planta	Especie	Insaturaciones		Ox. Fen	Trit. y Es.	Cu	Sesquiterpen -lactonas		Flav.		Gpos. Carbonilo		Alcaloides		Cabo-hidratos	Lac.
			Br/CCl ₄	KMnO ₄				FeCl ₃	LI	BA	LE	SH	SA	DR	WA		
A	H	<i>B. frutescens</i>	+	+	+	-	+		-		-		+			+	+
E	H		+	+	+	es	+		-		-		+			+	+
H	H		+	+	-	es	+		-		-		+			+	+
M	H		+	+	+	-	+		+		-		+			+	+
A	F	<i>G. aff. decurrens</i>	+	+	+	-	+		-		-		+			+	+
E	F		-	+	+	tr	+		+		-		+			+	+
H	F		+	+	+	-	+		-		-		+			+	+
M	F		+	+	+	-	+		-		-		+			+	+
A	T		+	+	+	-	+		-		-		+			+	+
E	T		+	+	+	-	+		-		-		+			+	+
H	T		+	+	+	-	+		-		-	ch	+			+	-
M	T		+	+	+	-	+		-		-	fl	+			+	+

Resultado

Prueba

Grupos funcionales

Parte de la planta

Li= Liberman
 BA=Bajet
 LE= Legal
 SH = Shinoda
 SA = Salkowski
 DR = Draggendorf
 WA = Wagner

Ox. Fen= Oxhidrilos Fenólicos
 Trit. y Est = triterpenos y esteroides
 Cu = cumarinas
 Flav.= Flavonoides
 Lac= Lactonas
 es= esteroides
 tr=triterpenos
 fl= flavonas
 ch= chalconas

F = Flor
 T = Tallo

A = Acuoso
 E = Etanólico
 H = Hexánico
 M= Metanólico

7. DISCUSIÓN.

Debido al resurgimiento de la tuberculosis a nivel mundial y a la aparición de cepas resistentes y multi-resistentes a los fármacos de línea actuales se ha iniciado, desde hace unos años, la búsqueda de nuevos compuestos que ayuden a controlar la enfermedad (WHO, 2003).

México cuenta con un amplio territorio, que abarca variados climas y ecosistemas en los que se encuentra una gran diversidad de plantas y animales, los cuales han sido utilizados por las culturas que han habitado el país para el tratamiento de enfermedades (Aguilar A, *et al.*, 1994, Martínez, M. 1933).

Desde hace algunos años, se han buscado plantas que tengan efecto contra diversos patógenos y ayuden al control de las infecciones. Varios autores han reportado resultados positivos en esta búsqueda (Grange, JM, *et al.*, 1990; Tshibangu, JN, 2002; Frame, AD, *et al.*, 1998; Wächter, GA, *et al.*, 1998; Houghton, PJ, *et al.*, 1998; Lall, N, *et al.*, 1999; Cantrell, CL, *et al.*, 1999a; Cantrell, CL, *et al.*, 1999b, Pietro, RC, *et al.*, 2000, Jiménez-Arellanes, A, *et al.*, 2003).

Hay diversos métodos *in vitro* para determinar la susceptibilidad de las bacterias a un compuesto, así como la concentración adecuada para tal efecto. Entre las técnicas utilizadas se destaca la técnica de azul alamar, técnica que con un bajo costo y de fácil manejo, permite en 8 días obtener las concentraciones mínimas inhibitorias requeridas para una actividad antimicobacteriana (Franzblau, SG, *et al.*, 1998).

Con ésta técnica, se han identificado diversos compuestos derivados de plantas con actividad contra *M. tuberculosis* (Changsen, C, *et al.*, 2003; Woldemichael, GM, *et al.*, 2003; Luna-Herrera, J, *et al.*, 2003; Franzblau, SG, 2000; Pietro, RC *et al.*, 2000; Franzblau, SG, *et al.* 1998; Collins, L, *et al.*, 1997, Jiménez-Arellanes, A, *et al.*, 2003).

Utilizando la técnica de azul alamar, encontramos que de los 28 extractos analizados, únicamente los extractos metanólico y hexánico de hoja de *B. frutescens* presentaron actividad contra *M. tuberculosis* a una concentración de 125 µg/ml. Para considerar a un extracto crudo como posible fuente de compuestos antimicrobianos, debe presentar actividad

a concentraciones menores de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Extractos que requieren concentraciones más altas para mostrar efecto, resultan en procesos imprácticos e incosteables al intentar aislar productos de baja actividad (Rios, J, *et al.*, 1988).

La naturaleza del solvente y el método de extracción determinan que compuestos se encuentran presentes en cada extracto. De ésta manera, los compuestos en las extracciones acuosas, etanólicas y metanólicas son polares e hidrofílicos, los obtenidos con hexano son no polares e hidrofóbicos. Esto determina la accesibilidad de los compuestos activos hacia el sitio de acción en el mecanismo de inhibición del crecimiento bacteriano ó el efecto activador de las células inmunes dependiendo de la vía para internalizarse. Lo que resalta la importancia de que un compuesto además de ser activo tenga la capacidad de penetrar a la célula y/o micobacteria.

Así, los compuestos activos no polares obtenidos en el extracto hexánico posiblemente penetraron en la bacteria disolviéndose temporalmente en la bicapa lipídica, mientras que los compuestos activos obtenidos en el extracto metanólico, entraron por otra vía que pudiera implicar a las porinas como lo ha propuesto Nikaido (1994). Tres de las principales drogas de línea utilizadas en el control de la tuberculosis son pequeñas moléculas hidrofílicas (isoniacida, etambutol y pirazinamida), las cuales son transportadas a la bacteria a través de porinas (Niederweis, M, 2003). En el presente trabajo, ninguno de los extractos acuosos presentó actividad bactericida, concordando con Jiménez-Arellanes y col. (2003). Es posible que en nuestros extractos no se hayan obtenido compuestos con actividad o con capacidad para penetrar a la bacteria.

Cuando el agente infeccioso es un organismo intracelular como *M. tuberculosis*, el acceso de los antibióticos a los sitios de acción es más difícil, pues tendrán que atravesar el sistema membranal de la célula hospedero y de la misma bacteria, además la bacteria puede compartimentalizarse intracelularmente quedando resguardada y haciendo todavía más difícil el paso de los antibióticos. En estos casos, la opción puede ser activar a las células inmunes para así poder eliminar a los organismos dañinos (Murata, K, *et al.*, 1998; Da-Silva, SA, *et al.*, 1999; So, HS, *et al.*, 1999; Ferreira, AP, *et al.*, 2003, Gómez-Flores, R. *et al.*, 2002; Kolodziej, H. *et al.*, 2003).

Múltiples sustancias liberadas durante procesos inflamatorios, tales como la IL-1, IL-6, TNF- α y el IFN γ , inducen la expresión de iNOS con la consecuente producción de NO, el cual tiene propiedades bactericidas (Suschek, CV, *et al.*, 2002; Estevez A, *et al.*, 2003 y 2004; Stickings P, *et al.*, 2002a y b; Chen HQ, *et al.*, 2003; Beauregard, C, *et al.*, 2003; Hashimoto, T, *et al.*, 2003; Murakami, Y, *et al.*, 2002; Reddy, S, *et al.*, 2002; Takahashi, M, *et al.*, 2002; Ito, S, *et al.*, 2002; Teng, X, *et al.*, 2002). Por otro lado Wang y col. (2001) identificaron que existe una sobre expresión concomitante de iNOS y de las interleucinas IL-1 β y TNF- α por parte de monocitos de sangre periférica y macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis. Un inhibidor competitivo de NOS produjo una disminución en la liberación de IL-1 β y TNF- α . Lo que indica que existe una interrelación entre la producción de las citocinas proinflamatorias y de la enzima iNOS, como un mecanismo para controlar la infección.

Kolodziej y col. (2003) describen que existen compuestos que presentan una débil actividad antimicobacteriana, pero con actividad inmunoestimuladora. Decidimos probar el efecto estimulador de los extractos con actividad antimicrobiana sobre los macrófagos, pues sería muy deseable que un compuesto tenga ambas actividades: antimicobacteriana y activadora de las células inmunes.

También probamos un extracto que no tuviera efecto antimicobacteriano contundente. Los candidatos para esto fueron los extractos etanólicos, hexánicos y metanólicos de *G. leucocephalum* y de *G. aff. decurrens*. En la técnica de azul alamar, estos extractos requirieron de 24 horas extra para considerar los resultados negativos como definitivos. Arbitrariamente, se escogió al extracto hexánico de flor de *G. aff. decurrens* para probar su actividad sobre macrófagos medulares.

Uno de los métodos utilizados para determinar la actividad inmunoestimuladora de los extractos en macrófagos es el análisis de la expresión de la interleucina IL-1 y la enzima iNOS mediante el uso de la técnica de RT-PCR (Han, B, *et al.*, 1999). Con ésta técnica, se determinó la actividad estimuladora de manera cualitativa. Como control de calidad de la prueba analizamos la expresión de la proteína Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), que es una proteína constitutiva presente en todas las células. En todos nuestros

ensayos, la G3PDH se expresó, indicando que los cultivos celulares estaban en buenas condiciones y que la reacción de RT-PCR se llevó a cabo adecuadamente.

Una de las condiciones para realizar una buena RT-PCR es contar con RNA de buena calidad. La proporción de RNA/proteínas fue ≥ 1.8 , indicando una adecuada pureza de ácidos nucleicos. La electroforesis en gel mostró un RNA íntegro al obtenerse dos bandas, una correspondiente a la subunidad 18S y la otra a la subunidad 28S. En este gel, también se observa una banda en la parte superior correspondiente a DNA genómico, sin embargo, este no interfiere con los ensayos, pues los iniciadores fueron diseñados a partir de la secuencia de mRNA ya procesado y los amplicones a obtener son de menor tamaño que los que pudieran obtenerse del DNA genómico y fácil de distinguir. En nuestros ensayos obtuvimos solo una banda correspondiente al tamaño esperado para el amplicón proveniente del cDNA.

Al analizar el efecto inmunoestimulador de los extractos con actividad antimicobacteriana se observó que el extracto metanólico de hoja de *B. frutescens* indujo la expresión de IL-1 β e iNOS en macrófagos. Esto indica que este extracto metanólico tiene compuestos que son capaces de estimular a los macrófagos y además que actúan directamente sobre la bacteria.

Bajo las mismas condiciones el extracto hexánico de hoja de *B. frutescens* indujo la expresión en macrófagos de IL-1 β , pero no la expresión de iNOS. Algunos autores mencionan que la expresión de iNOS está regulada por la actividad de IL-1 β (Suschek, CV, *et al.*, 2002; Estévez, A, *et al.*, 2004; Chen, HQ, *et al.*, 2003; Beauregard, C, *et al.*, 2003; Hashimoto, T, *et al.*, 2003). Sin embargo, la expresión de iNOS depende también de vías alternas a la de IL-1 β , como la vía del TNF- α (Fichera, LE, *et al.*, 2004) o en conjunción con IFN- γ (van den Hove, MF., *et al.*, 2002). Existen además inhibidores de la activación de iNOS (por lo tanto de la producción de NO) vía la IL-1, sin embargo, bajo estas condiciones la enzima iNOS se expresa por otra vía independiente de IL-1 (Mendes, AF, *et al.*, 2002). De hecho, la expresión de iNOS puede ser inducida por otras citocinas como IL-2, IL-6, IL-8 y GM-CSF (Rojas-Espinosa, O, 2001).

La expresión de iNOS en nuestros ensayos pudo deberse a la inducción dada por la actividad de la IL-1 β generada por la estimulación con los extractos o por la inducción de una

vía alterna. Pero el hecho de que en algunos casos se haya producido IL-1 β sin producción de iNOS sugiere que la inducción de la expresión de iNOS en los macrófagos medulares de ratón usados en este trabajo ocurre por una vía independiente a la estimulación por la IL-1 β , la cual no se activa cuando las células son incubadas con el extracto hexánico de *B. frutescens*. No podemos descartar tampoco, que específicamente el extracto hexánico de hoja de *B. frutescens* contenga entre sus compuestos algún inhibidor de la inducción de la expresión de iNOS vía IL-1 β . Para determinar esto se requiere de otros estudios que no se incluyen en los objetivos de este trabajo. La expresión de IL-1 β y/o iNOS en macrófagos medulares expuestos a los extractos de *B. frutescens* demuestran que este tiene propiedades inmunoestimuladoras. Sin embargo será necesario el aislamiento y la identificación de los compuestos presentes en el extracto para poder discernir los efectos de cada uno de ellos sobre la inmunomodulación.

Aun cuando los extractos del género *Gnaphalium* no inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis*, el extracto hexánico de flor de *G. aff decurrens* presentó actividad estimuladora en macrófagos determinado por la expresión de IL-1 β e iNOS. Este resultado, sugiere que la efectividad de este extracto en medicina tradicional en el tratamiento contra la tuberculosis se debe a sus propiedades estimulantes en el sistema inmune y no debido a una actividad directa sobre la bacteria.

Por otro lado, ninguno de los extractos indujo la expresión de IL-10. Esta es una interleucina que inhibe la producción de interleucinas pro-inflamatorias y la producción de iNOS. El no ser expresada con ninguno de los extractos probados, sugiere que estos no poseen efecto anti-inflamatorio.

En la literatura se han reportado compuestos aislados de plantas con actividad antimicobacteriana. Entre ellos están triterpenos (Cantrell, C, *et al.*, 1999a; Cantrell, C, *et al.*, 1999b; Newton SM, *et al.*, 2002; Woldemichael, GM, *et al.*, 2004), diterpenos (Wächter, GA, *et al.*, 1998) alcaloides (Rao, KV, *et al.*; 2003; Newton SM, *et al.*, 2002; Rastogi N, *et al.*, 1998), chalconas, flavonoides y productos similares a las chalconas (Lin, YM, *et al.*, 2002), cumarinas (Rastogi, N, *et al.*, 1998) sesquiterpenos (Rastogi, N, *et al.*, 1998) sesquiterpenolactonas (Rabe, T, *et al.*, 2002), esteroides, flavonoles (Woldemichael, GM, *et al.*,

2003; Woldemichael GM. *et al.*, 2004), así como plantas con actividad inmunoestimuladora en las que han sido aislados los compuestos quercetin y triterpenos glicósidos (Ferreira, AP, *et al.*, 2003).

Con las pruebas químicas de identificación se manifestó la presencia de alcaloides, sesquiterpenlactonas y cumarinas en *B. frutescens*. Sánchez-Arreola y col. (2001) reportaron en ésta planta actividad antimicrobiana sugiriendo que este efecto se debe principalmente a los alcaloides. Otros autores han reportado efectos similares de alcaloides: antifúngicos (Wanjala, CC, *et al.*, 2002; Kariba, RM, *et al.*, 2002; Nissanka, AP, *et al.*, 2001), antimicrobianos (Musumeci, R, *et al.*, 2003; Faizi S, *et al.*, 2003; Caballero-George, C, *et al.*, 2002, 2003; Cernakova, M, *et al.*, 2002; Nazrul Islam, SK, *et al.*, 2002; Wanjala, CC, *et al.*, 2002; Sansores-Peraza, P, *et al.*, 2000; Morsi, NM, 2000; Otshudi, AL, *et al.*, 2000; Hamasaki, N, *et al.*, 2000; Rao, KN, *et al.*, 2000), antiplasmodiales (Ross, SA, *et al.*, 2004), insecticidas (Nissanka, AP, *et al.*, 2001) y con propiedades inmunomoduladoras (Ivanovska, N, *et al.*, 1999).

En el extracto hexánico de flor de *G. aff decurrens* encontramos cumarinas y sesquiterpenlactonas, compuestos que han sido reportados con efecto antimicobacteriano.

En el Género *Gnaphalium*, se ha reportado la presencia de diterpenos (Meragelman, TL, *et al.*, 2003) y flavonoides (Morimoto, M, *et al.*, 2003), los cuales tienen diferentes propiedades en el control de parásitos. Nosotros encontramos además alcaloides, lo cual no había sido reportado en este género.

Un resultado muy importante es la actividad tanto bactericida como inmunoestimuladora que se encontró en un extracto crudo: el extracto metanólico de hoja de *B. frutescens*. Esto lo hace un excelente candidato para el tratamiento de la enfermedad al presentar ambas características. En este estudio analizamos la hoja, pues es la usada en la medicina tradicional, sin embargo el estudio de otras partes de la planta podría arrojar datos muy valiosos.

Algunos extractos no presentaron actividad sobre *M. tuberculosis*, pero si actividad inmunoestimulante, por lo que sería interesante probar el resto de los extractos para determinar este efecto en modelos de infección celular o en modelos animales.

En este trabajo iniciamos los estudios fitoquímicos para determinar el tipo de compuestos presentes en los extractos. En estudios posteriores se podrían aislar los ingredientes activos y determinar específicamente su papel en la actividad sobre la bacteria y/o sobre el sistema inmune. Así como si la actividad se debe a uno o varios componentes y si entre ellos hay sinergismo, adición o antagonismo.

8. CONCLUSIONES.

1. De las especies de gordolobo estudiadas, *B. frutescens* fue la única que tiene compuestos que presentan las dos actividades: actividad tóxica contra *M. tuberculosis* y actividad estimulante en macrófagos medulares de ratón BALB/c.
2. El extracto metanólico de *B. frutescens* presenta actividad antimicobacteriana y estimula a los macrófagos a expresar IL-1 β e iNOS.
3. El extracto hexánico de *B. frutescens* presenta actividad antimicobacteriana y estimula a los macrófagos a expresar IL-1 β pero no iNOS.
4. Las especies del género *Gnaphalium* no presentaron actividad contra *M. tuberculosis*.
5. El extracto hexánico de flor de *G. aff. decurrens* indujo la expresión de IL-1 β e iNOS en los macrófagos.
6. Ninguno de los extractos indujo la expresión de IL-10 en cantidades detectables en macrófagos medulares de ratón BALB/c, lo que sugiere que estos extractos no tienen propiedades anti-inflamatorias.
7. Los alcaloides presentes en *B. frutescens* y el género *Gnaphalium* pueden ser los responsables de la actividad observada en este estudio.

9. LITERATURA CITADA:

- Abbas, AK, Lichtman, AH, Pober, JS. 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. Tercera edición. Ed. Mc Graw Hill.
- Aguilar, A, Camacho, JR, Chino, S, Jácquez P, López, ME. 1994. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. IMSS. México.
- Armstrong, JA, Hart, PDA. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 142:1-16.
- Barnes, PF, Abrams JS, Lu, S, Sieling, PA, Rea, TH, Modlin, RL. 1993a. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect. Immun.* 61:197-203.
- Barnes, PF, Lu, S, Abrams, JS, Wang, E, Yamamura, M, Modlin, RL. 1993b. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 61:3482-3489.
- Beauregard, C, Brandt, PC, Chiou, GC. 2003. Induction of nitric oxide synthase and overproduction of nitric oxide by interleukin-1 β in cultured lacrimal gland acinar cells. *Exp. Eye Res.* 77:109-114
- Bergeron, A, Bonay, M, Kambouchner, M, Lecossier, D, Riquet, M, Soler, P, Hance, A, Tazi, A. 1997. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J. Immunol.* 159:3034-3043.
- Bermudez, LE, Goodman, J. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect. Immun.* 64:1400-1406.
- Bermudez, LE, Sangari, FJ, Kolonoski, P, Petrofsky, M, Goodman, J. 2002. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* 70:140-146.
- Bodnar, KA, Serbina, NV, Flynn, JL. 2001. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect. Immun.* 69:800-809.
- Boussiotis, VA, Tsai, EY, Yunis, EJ, Thim, S, Delgado, JC, Dascher, CC, Berezovskaya, A, Rousset, D, Reynes, JM, Goldfeld, AM. 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Investig.* 105:1317-1325.
- Caballero-George, C, Vanderheyden, PM, Apers, S, Van den Heuvel, H, Solis, PN, Gupta, MP, Claeys, M, Pieters, L, Vauquelin, G, Vlietinck AJ. 2002. Inhibitory activity on binding of specific ligands to the human angiotensin II AT(1) and endothelin 1 ET(A) receptors: bioactive benzo[c]phenanthridine alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. *Planta Med.* 68:770-775.

- Caballero-George, C, Vanderheyden, PM, Solis, PN, Gupta, MP, Pieters, L, Vauquelin, G, Vlietinck, A. 2003. *In vitro* effect of sanguinarine alkaloid on binding of [³H] candesartan to the human angiotensin AT1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **458**:257-262.
- Caceres, A, Cano, O, Samayoa, B, Aguilar, L. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* **30**:55-73.
- Caceres, A, Alvarez, AV, Ovando, AE, Samayoa, BE. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **31**:193-208.
- Cantrell, CL, Abate, L, Fronczek, FR, Franzblau, SG, Quijano, L, Fisher, NH. 1999a. Antimycobacterial eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa*. *Planta Med.* **65**:351-355.
- Cantrell, CL, Rajab, MS, Franzblau, SG, Fischer, NH. 1999b. Antimycobacterial triterpenes from *Melia volkensii* *J Nat Prod*, **62**:546-548
- Castro-Garza, J; King, C.H; Swords, W.E; Quinn F.D. 2002. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiology letters.* **212** 145-149.
- Cernakova, M, Kostalova, D. 2002. Antimicrobial activity of berberine--a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiol (Praha).* **47**:375-8.
- Chamouleau, AYJ. 1990. La curación por las plantas. Guía práctica de fitoterapia. Ed. ROCA. México, DF, pp. 127-129 y 337.
- Chan, ED, Chan, J, Schluger, NW. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**:606-612.
- Chan, J, Xing, YR, Magliozzo, S, Bloom, BR. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **175**: 1111-1112.
- Chan, J, Kauffmann, SHE. 1994. Immune mechanism of protection. *In* Bloom B.R. (editor), *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* ASM Press. Washington D.C. p 389.
- Changsen, C, Franzblau, SG, Palittapongarnpim P. 2003. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3682-3687.
- Chen, HQ, Tannous M, Veluthakal R, Amin R, Kowluru A. 2003. Novel roles for palmitoylation of Ras in IL-1 beta-induced nitric oxide release and caspase 3 activation in insulin-secreting beta cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**:1681-1694.

- Choi, HS, Rai PR, Chu, HW, Cool, C, Chan, ED. 2002. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**:178-186.
- Collins, L, Franzblau, SG. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1004-1009.
- Crowle, AJ, Dahl, R, Ross, E, May, MH. 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect. Immun.* **59**: 1823-1831.
- Cruz-Vega, D.E. Análisis fitoquímico y caracterización parcial de compuestos con actividad estimuladora sobre macrófagos y/o actividad antimicrobiana en extractos de raíz, tallo y hoja de *Carlwrightia corditolia* A Gray. Tesis Doctoral. F.C.B., UANL.
- Dahl, KE, Shiratsuchi, H, Hamilton, BD, Ellner, JJ, Toossi, Z. 1996. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **64**:399-405.
- Da-Silva SA, Costa SS, Rossi-Bergmann B. 1999. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric intermediates. *Parasitology.* **118**: 575-582.
- Dannenberg, AM Jr., Rook, GAW. 1994. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses. Dual mechanisms that control bacillary multiplication. *In* Bloom B.R. (editor), *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. ASM Press. Washington D.C. p 459.
- Deretic, V, Fratti, RA. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol. Microbiol.* **31**:1603-1609.
- Dobos KM, Spotts EA, Quinn FD, King CH. 2000. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect. Immun.* **68**:6300-6310.
- Domínguez XA. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 1^o Edición. 4^a reimpresión. Ed. LIMUSA. México, DF.
- Erb, KJ, Kirman, J, Delahunt, B, Chen, W, Le Gros, G. 1998. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of *M. bovis*-BCG infection in mice. *Immunol. Cell Biol.* **76**:41-46.
- Estevez, A, Tognetti, T, Rearte B, Sander V, Motta, AB. 2002. Interleukin-1 β in the functional and structural luteolysis. Relationship with the nitric oxide system. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **67**:411-417.
- Estevez, A, Farina, M, Franchi, A, Jonson, C, Vega M, Motta, AB. 2004. Interleukin-1 β up-regulates nitrite production: effects on ovarian function. *Nitric Oxide.* **10**:92-100.

- Faizi, S, Khan RA, Azher, S, Khan SA, Tauseef, S, Ahmad, A. 2003. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. pendula. *Planta Med.* 69:350-355.
- Fang, FC. 1999. An overview of nitric oxide infection. In F.C. Fang (editor), Nitric oxide and infection. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, NY. p 3-9.
- Farnsworth, N, Soejarto, D. 1985. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany.* 39: 231-240
- Ferreira, AP, Soares GL, Salgado, CA, Goncalves, LS, Teixeira, FM, Teixeira, HC, Kaplan, MA. 2003. Immunomodulatory activity of *Mollugo verticillata* L. *Phytomedicine.* 10:154-158.
- Fichera, LE, Albareda, MC, Laucella, SA, Postan, M. 2004. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect. Immun.* 72:359-63.
- Frame, AD, Rios-Olivares, E, De Jesús, L, Ortiz, D, Pagan, J, Mendez S. 1998. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *PR Health Sci. J.* 17:243-252.
- Franzblau, SG, Witzig, RS, McLaughlin, JC, Torres, P, Madico, G, Hernández, A, Degnan, MT, Cook, MB, Quenzer, VK, Ferguson, RM, Gilman, RH. 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* 36:362-366.
- Franzblau, S. 2000. A rapid, microplate-based assay for evaluating the activity of drugs against *Mycobacterium leprae*, employing the reduction of Alamar Blue. *Lepr. Rev.* 71 Suppl:574-75.
- Fulton, SA, Cross, JV, Toossi, ZT, Boom, WH. 1998. Regulation of interleukin-12 by interleukin-10, transforming growth factor- β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ in human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Infect. Dis.* 178:1105-1114.
- Gatfield, J, Pieter, J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 288:1647-1650.
- Gerosa, FC, Nisii, Righetti, S, Micciolo, R, Marchesini, M, Cazzadori, A, Trinchieri, G. 1999. CD4⁺ T cell clones producing both INF- γ and IL-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin. Immunol.* 92:224-234.
- Gomez-Flores, R, Calderon CL, Scheibel, LW, Tamez-Guerra, P, Rodriguez-Padilla, C, Tamez-Guerra, R, Weber, RJ. 2000. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytother. Res.* 14:617-622.

- Gong, J., Zhang, M, Modlin, RL, Linsley, PS, Iyer, DV, Lin, Y, Barnes, PF. 1996. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis* induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect. Immun.* 64:913-918.
- Gonzalez-Juarrero, M., Orme, IM. 2001. Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 69:1127-1133.
- Grange, JM, Davey, RW. 1990. Detection of antituberculosis activity in plants extracts. *J. Apl. Bacteriology.* 68:587-591.
- Green, SJ, Nacy, CA, Meltzer, MS. 1991. Cytokine induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: A protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J. Leukocyte Biol.* 50: 93-103.
- Green, SJ, Nacy, CA. 1993. Antimicrobial and immuno-pathologic effects of cytokine induced nitric oxide synthesis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 6:384.
- Han, B, DuBois, DC, Boje, KM, Free, SJ, Almon, RR. 1999. Quantification of iNOS mRNA with reverse transcription polymerase chain reaction directly from cell lysates. *Nitric Oxide.* 3:281-291.
- Hashimoto, T, Kihara, M, Yokoyama, K, Fujita, T, Kobayashi, S, Matsushita, K, Tamura K, Hirawa, N, Toya Y, Umemura S. 2003. Lipoxygenase products regulate nitric oxide and inducible nitric oxide synthase production in interleukin-1 β stimulated vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* 26:177-84.
- Hamasaki, N, Ishii, E, Tominaga, K, Tezuka, Y, Nagaoka, T, Kadota, S, Kuroki, T, Yano, I. 2000. Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from a chinese herbal medicine, Gosyuyu (Wu-Chu-Yu), against *Helicobacter pylori* *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 44:9-15.
- Hernández-Urzúa, MA, Alvarado-Navarro, A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev. Biomed.* 12:272-280.
- Hirsch, CS, Toossi, Z, Othieno, C, Johnson, JL, Schwander, SK, Robertson, S, Wallis, RS, Edmonds, K, Okwera, A, Mugerwa, R, Peters, P, Ellner, JJ. 1999. Depressed T-cell INF γ responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J. Infect. Dis.* 180:2069-2073.
- Houghton, PJ, Woldemarian, TZ, Watabe, Y, Yates, M. 1998. Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloid constituents of angostura bark, *Galipea officinalis*. *Planta Med.* 65:250-254.
- http://depa.pquim.unam.mx/inmuno/contenido/Cap10/cap10_tema2.htm
- <http://148.233.168.204/pfnm/Gnaphalium.Americanum.html>
- <http://148.233.168.204/pfnm/BocconiaFrutescens.html>)
- Huertas, C. 1997. La herbolaria: mito o realidad. *Biodiversitas.* 12

- Ingraham, JL, Ingraham CA. 1998. Introducción a la Microbiología. Vol. 1. Ed. Reverté. Barcelona, España. pp. 262-264.
- Instituto Nacional Indigenista. 1989. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Vol. II. México, D.F. pp.1048-1049.
- Ito, C, Kusano, E, Akimoto, T, Takeda, S, Sasaki, N, Umino, T, Iimura, O, Ando, Y, Asano, Y. 2002. Cilostazol enhances IL-1 β -induced NO production and apoptosis in rat vascular smooth muscle via PKA-dependent pathway. *J. Endocrinol.* 173:177-185.
- Ivanovska, N, Philipov, S, Istatkova, R, Georgieva, P. 1996. Antimicrobial and immunological activity of ethanol extracts and fractions from *Isopyrum thalictroides*. *J. Ethnopharmacol.* 54:143-151.
- Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. 2003. Activity against multidrug-resistant *M. tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother. Res.* 17:903-908.
- Juffermans, NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, van Deventer SJ, van Der Poll T. 2000. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis *J. Infect. Dis.* 182:902-908.
- Kariba, RM, Houghton, PJ, Yenesew, A. 2002. Antimicrobial activities of a new schizozogane indoline alkaloid from *Schizozygia coffaeoides* and the revised structure of isoschizogaline. *J. Nat. Prod.* 65:566-569.
- Kolodziej H., Kayser, O., Radtke, OA., Kiderlen AF., Koch, E. 2003. Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. *Phytomedicine.* 10 54:18-24.
- Kuo, HP, Wang, CH, Huang, KS, Lin, HC, Yu, CT, Liu, CY, Lu, LC. 2000. Nitric oxide modulates IL-1 β and TNF- α synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:192-199.
- Lall, N, Meyer, JJM. 1999. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J. Ethnopharmacol.* 66:347-354.
- Lipscomb, MF, Masten, BJ. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.* 82:97-130.
- Law, K, Weiden, M, Harkin, T, Tchou Wong, K, Chi, C, Rom, WN. 1996. Increased release of IL-1 β , IL-6, and TNF α by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153:799-804.
- Lee, JIK, Burckart, GJ. 1998. NF-Kappa B: Important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.* 38:981-993.
- Lin, YM, Zhou, Y, Flavin, MT, Zhou, LM, Nie, W, Chen, FC. 2002. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem.* 10:2795-2802.

- Lin, Y, Zhang, M, Hofman, FM, Gong, J, Barnes, PF. 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 64:1351-1356.
- Luna-Herrera, J, Martinez-Cabrera, G, Parra-Maldonado, R, Enciso-Moreno, JA, Torres-Lopez, J, Quesada-Pascual, F, Delgadillo-Polanco, R, Franzblau, SG. 2003. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22:21-27.
- Martínez, M. 1933. *Las plantas medicinales de México*. Editorial Botas. México, D.F.
- Mehta, PK, King, CH, White, EH, Murtagh, JJ Jr, Quinn, FD. 1996. Comparison of *in vitro* models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. *Infect. Immun.* 64:2673-2679.
- Mendes, AF, Caramona, MM, Carvalho, AP, Lopes, MC. 2002. Role of mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases on IL-1-Induced NF-kappaB activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes. *Nitric Oxide.* 6:35-44.
- Meragelman, TL, Silva, GL, Mongelli, E, Gil, RR. 2003. Ent-pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry.* 62:569-572.
- Mongelli, E, Desmarchelier, C, Coussio, J, Ciccía, G. 1995. Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. *Rev. Argent. Microbiol.* 27:199-203.
- Morimoto, M, Tanimoto, K, Nakano, S, Ozaki, T, Nakano, A, Komai, K. 2003. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *J. Agric. Food Chem.* 51:389-393.
- Morsi, NM. 2000. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol. Pol.* 49:63-74.
- Murakami, Y, Okada, S, Yokotani, K. 2002. Brain inducible nitric oxide synthase is involved in interleukin-1 β -induced activation of the central sympathetic outflow in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 455:73-78.
- Murata, K, Takano, F, Fushiya, S, Oshima, Y. 1998. Enhancement of NO production in activated macrophages *in vivo* by an antimalarial crude drug, *Dichroa febrifuga*. *J. Nat. Prod.* 61: 729-733.
- Murray, PJ, Wang, L, Onufryk, C, Tepper, RI, Young, RA. 1997. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J. Immunol.* 158:315-321.
- Murray, PJ, Young, RA. 1999. Increased antimycobacterial immunity in IL-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 67:3087-3095.
- Musumeci, R, Speciale, A, Costanzo, R, Annino, A, Ragusa, S, Rapisarda, A, Pappalardo, MS, Iauk L. 2003. *Berberis aetnensis* C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22:48-53.

- Nathan, CF, Hibbs, JB Jr, . 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3:65-72.
- Nazrul, Islam SK, Gray, AI, Waterman, PG, Ahasan, M. 2002 Screening of eight alkaloids and ten flavonoids isolated from four species of the genus *Boronia* (Rutaceae) for antimicrobial activities against seventeen clinical microbial strains. *Phytother. Res.* 16:672-674.
- Newton, SM, Lau, C, Gurcha, SS, Besra, GS, Wright, CW. 2002. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol.* 79:57-67.
- Nicholson, S, da Gloria Bonecini-Almeida, M, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie Q-W, Mumford R, Widner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.* 183:2293-2302.
- Niederweis, M. 2003. Mycobacterial porins-new channel proteins in unique outer membranes. *Mol. Microbiol.* 49:1167-1177.
- Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 153:241-252.
- Nissanka, AP, Karunaratne, V, Bandara, BM, Kumar, V, Nakanishi, T, Nishi, M, Inada, A, Tillekeratne, LM, Wijesundara, DS, Gunatilaka, AA. 2001. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry.* 56:857-861.
- North, RJ. 1998. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 113:55-58.
- Noss, EH, Pai, RK, Sellati, TJ, Radolf, JD, Belisle, D, Golenbock, T, Boom, WH, Harding, CV. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 167:910-918.
- O'Brien, L, Charmichael J, Lowrie, DB, Andrew, PW. 1994. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates *in vitro*. *Infect Immun.* 62:5187-5791.
- Oberholzer, A, Oberholzer, C, Moldawer, LL. 2000. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit. Care Med.* 28 (Suppl):N3-12.
- Opal SM, De Palo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 117:1162-1172.
- Otshudi, AL, Foriers, A, Vercruyse, A, Van Zeebroeck, A, Lauwers, S. 2000. *In vitro* antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo (DRC). *Phytomedicine* 7:167-172.

- Peyron, PC, Bordier, EN, N'Diaye, Maridonneau-Parini, I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Immunol.* 165:5186-5191.
- Pietro, RC, Kashima, S, Sato, DN, Januario, AH, Franca, SC. 2000. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine.* 7:335-338.
- Rabe, T, Mullholland, D, van Staden, J. 2002. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 80:91-94.
- Rao, KN, Venkatachalam, SR. 2000. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the *in vitro* cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. *Toxicol. In vitro.* 14:53-59.
- Rao, KV, Santarsiero, BD, Mesecar, AD, Schinazi, RF, Tekwani, BL, Hamann, MT. 2003. New manzamine alkaloids with activity against infectious and tropical parasitic diseases from an Indonesian sponge. *J. Nat. Prod.* 66:823-828.
- Rastogi, N, Araul, J, Goh, KS, Devallois, A, Philogene, E, Bourgeois, P. 1998. Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20:267-273.
- Rios, JL, Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23: 127-149.
- Reddy, S, Young, M. 2002. IL-1 β expression in islet cells of the NOD mouse and its spatial relationship to β cells and inducible nitric oxide synthase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958:190-193.
- Rhoades, ER, Orme, IM. 1997. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 65:1189-1195.
- Rojas, G, Levaro, J, Tortoriello, J, Navarro, V. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharmacol.* 74:97-101.
- Rojas-Espinosa, O. 2001. *Inmunología (de Memoria)*. 2^o ed. Ed. Médica Panamericana. México. D.F.
- Ross, SA, Sultana, GN, Burandt, CL, ElSohly, MA, Marais, JP, Ferreira, D. 2004. Syncarpamide, a new antiplasmodial (+)-norepinephrine derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. *Nat. Prod.* 67:88-90.
- Rossmann, MD, MacGregor, RB. 1996. *Tuberculosis*. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Philadelphia, PA, pp. 19-36.

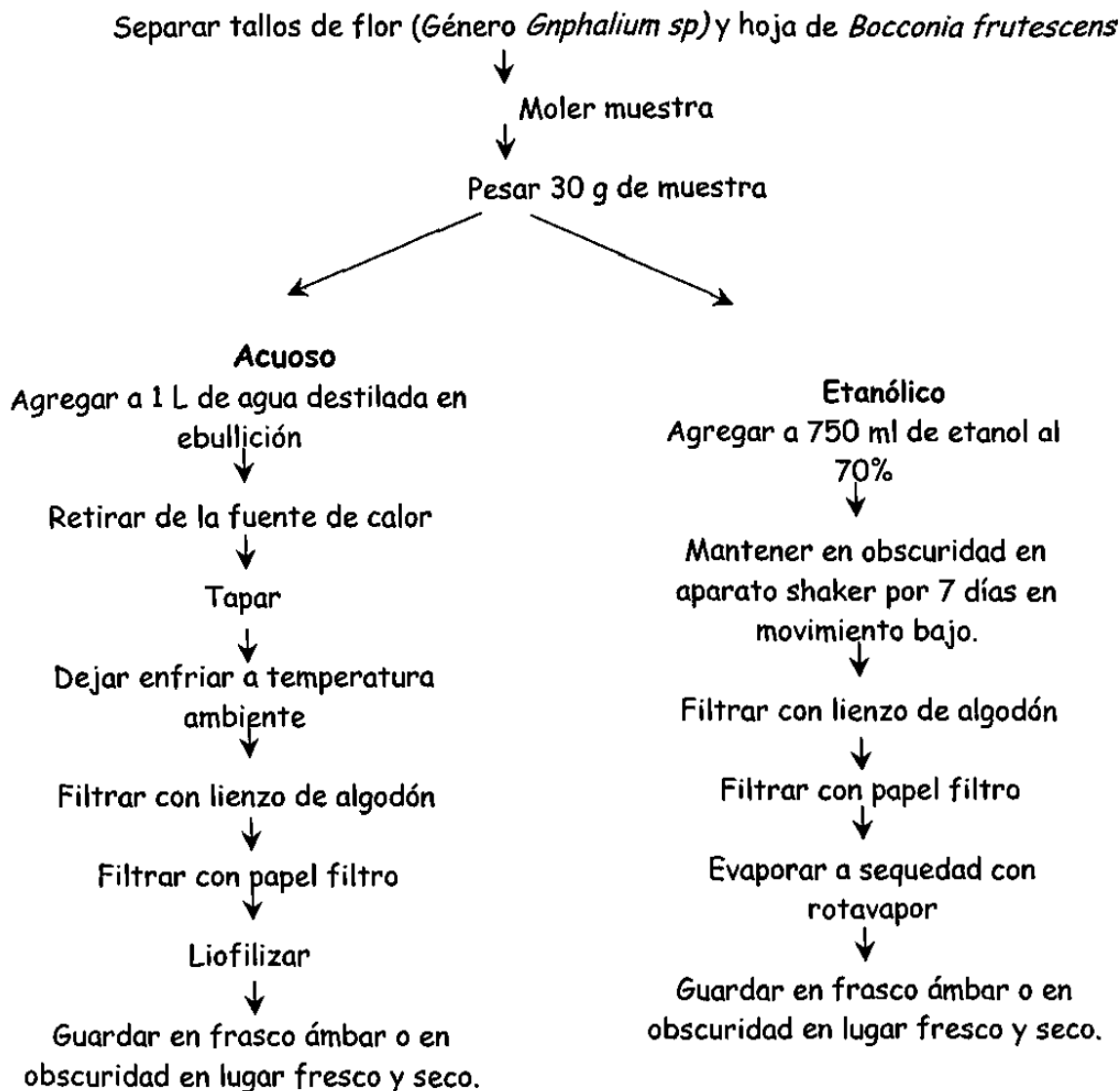
- Sánchez Arreola, E; Maiti Maiti, R; Quintero Flores, E; Vázquez Torres, M. 2001. Farmacognosia y aspectos fitoquímicos de Gordolobo (*Bocconia frutescens* L.). XV Congreso Mexicano de Botánica Fitoquímica.
- Sansores-Peraza, P, Rosado-Vallado, M, Brito-Loeza, W, Mena-Rejon, GJ, Quijano, L. 2000. Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Senna racemosa*. *Fitoterapia*. 71:690-692.
- Schauf, V, Rom, WN, Smith, KA, Sampaio, EP, Meyn, PA, Tramontana, JM, Cohn, ZA, Kaplan, G. 1993. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. *J. Infect. Dis.* 168:1056-1059.
- Schlesinger, LS. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* 150:2920-2930.
- Schultes, RE. 1972. The future of plant as resources of new biodynamic compounds. "Plants in the development of modern medicine". In Swain T (editor). Harvard University Press, Cambridge, Mass. pp 106.
- Seder, RA, Gazzinelli, RT. 1999. Cytokines are critical in linking the innate and adaptive immune responses to bacterial, fungal, and parasitic infection. *Adv. Intern. Med.* 44:353-388
- Shaw, TC, Thomas, LH, Friedland, JS. 2000. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine*. 12:483-486.
- Shkurupii, VA, Kazarinova, NV, Ogirenko, AP, Nikonov, SD, Tkachev, AV, Tkachenko KG. 2002. Efficiency of the use of peppermint (*Mentha piperita* L) essential oil inhalations in the combined multi-drug therapy for pulmonary tuberculosis. *Probl. Tuberk.* 4:36-39.
- Smith, EM, Cadet, P, Stefano, GB, Opp, MR, Hughes, TK Jr. 1999. IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J. Neuroimmunol.* 100:140-148.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:463-496.
- So, HS, Park, R, Oh, HM, Chai, KY, Lee, JH, Chung, HT. 1999. Enhancement of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Spiraea prunifolia* var *simpliciflora*'s root in RAW 264.7 cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2:343-355.
- Soberanes-Fragoso, F, Cortés-Salas, E. 2001. Óxido Nítrico: un nuevo concepto en veterinaria. *Revisión Bibliográfica. AMMVEPE.* 12: 21-23.
- Stickings, P, Mistry, SK, Boucher, JL, Morris, SM, Cunningham, JM. 2002a. Arginase expression and modulation of IL-1 β -induced nitric oxide generation in rat and human islets of Langerhans. *Nitric Oxide.* 7:289-296.

- Stickings, P, Cunningham, JM. 2002b. Interleukin-1 β -induced nitric oxide production and inhibition of insulin secretion in rat islets of langerhans is dependent upon the nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin. *Cytokine*. 18:81-85.
- Stuehr, DJ, Nathan, CF. 1989. Nitric Oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169:1543-1555.
- Sugawara, I, Hiroyuki, Y, Shucheng, H, Satoru, M. 2001. Role of interleukin (IL)-1 Type 1 Receptor in Mycobacterial Infection. *Microbiol. Immunol.* 45:743-750,
- Suschek, CV, Bonmann, E, Kapsokefalou, A, Hemmrich, K, Kleinert, H, Forstermann, U, Kroncke, KD, Mahotka, C, Kolb-Bachofen, V. 2002. Revisiting an old antimicrobial drug: amphotericin B induces interleukin-1-converting enzyme as the main factor for inducible nitric-oxide synthase expression in activated endothelia. *Mol. Pharmacol.* 62:936-946.
- Takahashi, M, Takahashi, S, Shimpo, M, Naito, A, Ogata, Y, Kobayashi, E, Ikeda, U, Shimada, K. 2002. β -very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 162:307-313.
- Tascon, RE, Soares, CS, Ragno, S, Stavropoulos, E, Hirst, EM, Colston, MJ. 2000. *Mycobacterium tuberculosis*-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. *Immunology*. 99:473-480.
- Teng X, Zhang H, Snead C, Catravas JD. 2002. Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 β and IFN- γ in rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282:C144-152.
- Torres, M., Herrera, T, Villareal, H, Rich, EA, Sada, E. 1998. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66:176-180.
- Trinchieri, G. 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr. Opin. Immunol.* 9:17-23.
- Tshibangu, JN, Chifundera, K, Kaminsky, R, Wright, AD, Konig, GM. 2002. Screening of African medicinal plants for antimicrobial and enzyme inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* 80:25-35.
- van Crevel, R, Ottenhoff, THM, van der Meer JWM. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 294-309.
- van den Hove, MF, Stoenoiu, MS, Croizet, K, Couvreur, M, Courtoy, PJ, Devuyst, O, Colin, IM. 2002. Nitric oxide is involved in interleukin-1 α -induced cytotoxicity in polarised human thyrocytes. *J. Endocrinol.* 173:177-185.

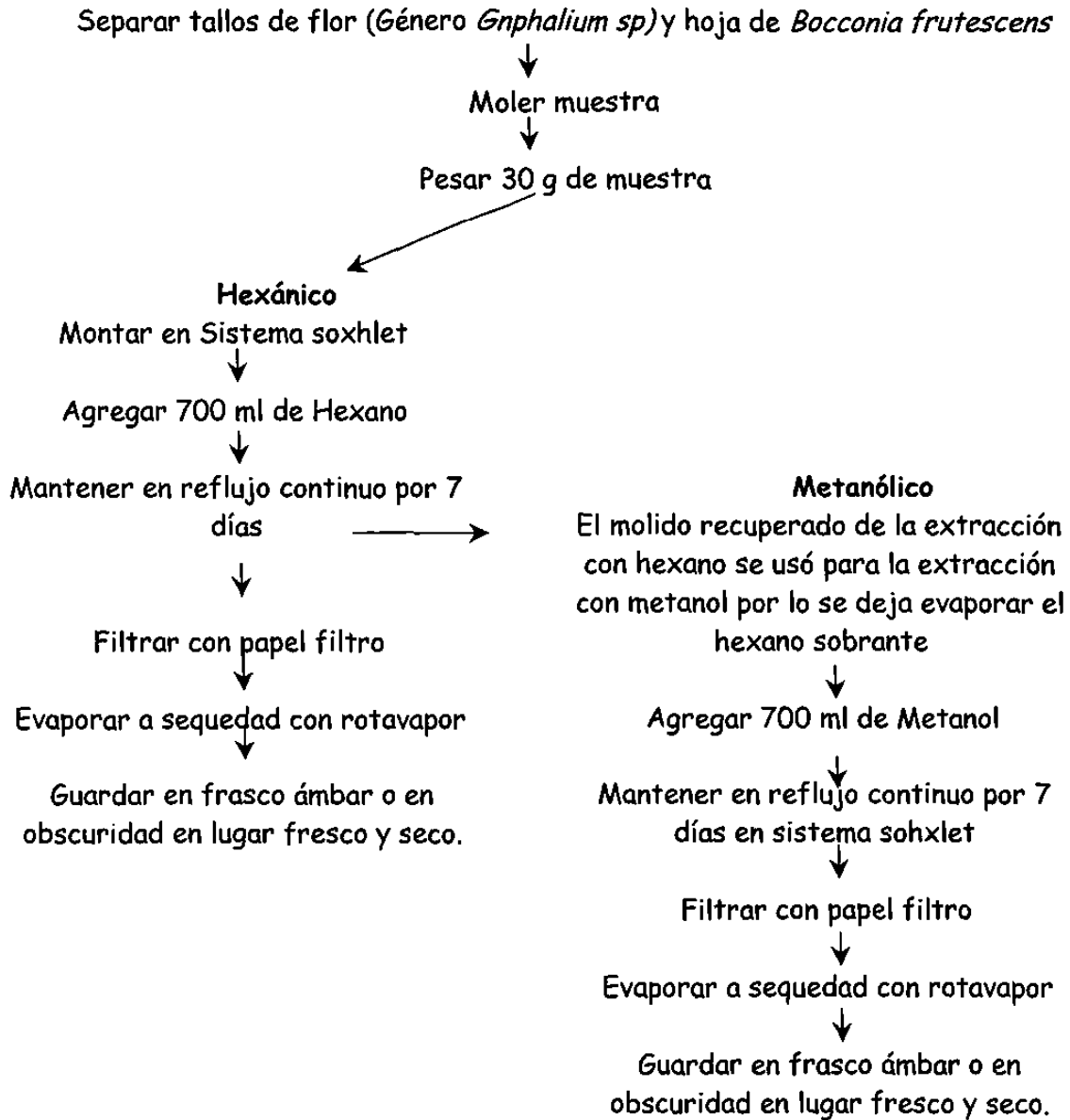
- Villagomez-Ibarra, JR, Sánchez, M, Espejo, O, Zuniga-Estrada, A, Torres-Valencia, JM, Joseph-Nathan, P. 2001. Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia*. 72:692-694.
- Wächter, GA, Scott, G, Montenegro, G, Suarez, E, Fortunato, RH, Saavedra, E, Timmermann, BN. 1998. A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* clos. *J. Nat. Prod.* 61: 965-968.
- Wagner, H, Hikino, H, Farnsworth, NR. 1985. Economic and medicinal plant research. Academic Press, New York. NY.
- Walker, ST. 1998. Microbiología. Ed McGraw Hill Interamericana. México D.F.
- Wang, CH, Lin, HC, Liu, CY, Huang, KH, Huang, TT, Yu, CT, Kuo, HP. 2001. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine secretion in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 5:283-291.
- Wanjala, CC, Juma, BF, Bojase, G, Gashe, BA, Majinda, RR. 2002. Erythraline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*. *Planta Med.* 68:640-642.
- Wilkinson, RJ, Patel, P, Llewelyn, M, Hirsch, CS, Pasvol, G, Snounou, G, Davidson, R, Toossi, Z. 1999. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 β on tuberculosis. *J. Exp. Med.* 189:1863-1874.
- Woldemichael, GM, Franzblau, SG, Zhang, F, Wang, Y, Timmermann, BN. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Med.* 69:628-631.
- Woldemichael, GM, Gutierrez-Lugo, MT, Franzblau, SG, Wang, Y, Suarez, E, Timmermann, BN. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haematospermum*. *J. Nat. Prod.* 67:598-603.
- OPS/WHO. 1999. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes y resistencia a los antimicrobianos. CD41/16,
- World Health Organization. 1995. Background information on tuberculosis and HIV. Chapter 1, pp 19.
- World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report 2003. Geneva, Switzerland, WO/TB/99.259.
- Yamada, H, Mizumo, S, Horai, R, Iwakura, Y, Sugawara, I. 2000. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 α/β double-KO mice. *Lab. Invest.* 80:759-767.
- Yu, K, Mitchell, C, Xing, Y, Magliozzo, RS, Bloom, BR, Chan J. 1999. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. Tuberculosis* is resistant to peroxy nitrate anion. *Tuber. Lung Dis.* 79:191-198.

10 ANEXOS

I Extracciones.



Extracciones (continuación)



II Pruebas biológicas.

a) Actividad Anti-micobacteriana de los extractos vegetales

Prueba Azul Alamar

Colocar agua destilada estéril en los pozos del marco de la microplaca.

↓
Agregar 100 μL de medio 7H9 suplementado con AODC a todos los pozos restantes

↓
Diluir los extractos en DMSO o en agua destilada y esterilizar por filtración.

↓
Diluir a la concentración deseada (2000, 200 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), con medio de cultivo 7H9 suplementado con AODC

↓
Agregar 100 μl de cada concentración de extracto a la fila 2 (una concentración por microplaca).

↓
Homogeneizar con pipeta.

↓
Tomar 100 μL de la fila 2 y adicionarlo a la fila 3, repetirlo hasta la fila 10. La fila 11 no contiene extracto y corresponde al control de crecimiento de micobacterias.
Desechar 100 μL de la fila 10 (es el exceso o sobrante)

↓
Ajustar la densidad de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con el nefelómetro de McFarland (tubo 1).

↓
Diluir la suspensión bacteriana 1:25 con medio 7H9 + OADC.

↓
Agregar 100 μl a los pozos correspondientes.

↓
Sellar las cajas

↓
Incubar por 5 días

↓
A un pozo control agregar 50 μl de Alamar azul

↓
Reincubar 24 h.

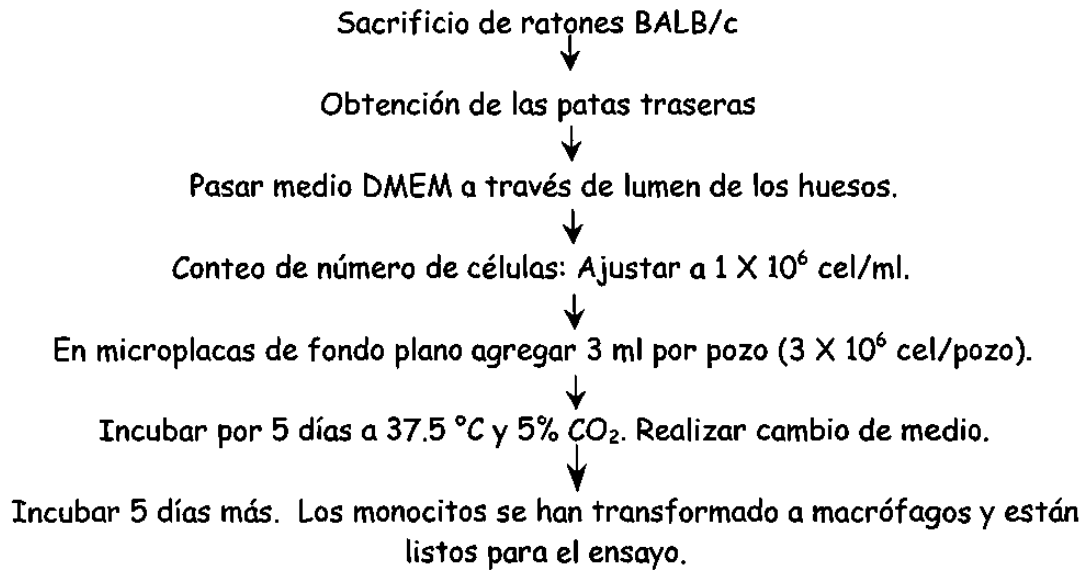
↓
Observar la placa, si hay viraje del pozo a color rosa, se aplica a todos los pozos correspondientes, si permanece azul, se aplica a otro pozo control azul alamar y se reincuba otras 24 h.

↓
Leer la placa

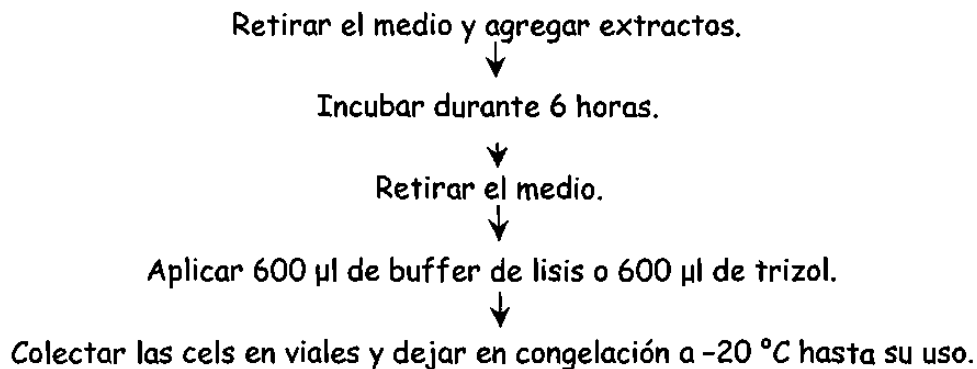
El color rosa indica que la bacteria está viva, el color azul indica muerte.

b) Determinación del efecto activador sobre macrófagos

Obtención de monocitos



Incubación de macrófagos con los extractos vegetales



c)RT-PCR

Obtención de RNA

Al lisado se le agregan:

- 50 µl acetato de sodio
- 500 µl fenol ácido
- 100 µl cloroformo



Dejar las muestras 15 min en hielo.



Centrifugar 12,500 Xg, 5 min, 5 °C



Recuperar fase acuosa. Agregar 600 µL de trizol y 200 µL cloroformo.



Centrifugar a 18,700 Xg 10 min 5 °C



Retirar el sobrenadante



Agregar 500 µl de isopropanol



Centrifugar a 18,700 Xg 10 min 5 °C



Decantar



Agregar Etanol al 80% en agua DEPC



Centrifugar a 18,700 Xg 10 min 5 °C



Secar a 37 °C



Resuspender en 8 µl de agua DEPC

Geles y lecturas para determinar calidad y cantidad de RNA

Hacer diluciones de cada muestra 1:100



Colocar la dilución en una celda del espectrofotómetro



Leer a 260/280 nm (absorbancia)



Determinar pureza del RNA por su relación RNA/proteínas.



Correr un gel de agarosa 1X en buffer TBE a 50 V por 60 min y observar la integridad del RNA después de teñir el gel en bromuro de etidio.

cDNA

Añadir 2 μ l de oligo (DT) a cada una de las muestras disueltas en 8 μ l de agua

DEPC



Incubar a 65 °C, 10 min en termociclador.



Colocar en hielo 5 min



Centrifugar 10 seg.



Añadir 10 μ l de mezcla de reacción de transcriptasa reversa



Incubar 1 h/37 °C



Incubar 5 min/97 °C



Agregar 80 μ l de agua DEPC



Congelar a -70°C hasta su uso

PCR

A 45 μ l de la mezcla de reacción para PCR agregar 5 μ l de cada muestra



Colocar las muestras en el termociclador con los tiempos y temperaturas programadas (mencionadas en material y métodos)



Realizar electroforesis de los productos amplificados en gel de agarosa al 2% con TBE 1X, 100 V, 60 min



Teñir el gel en bromuro de etidio 5 μ g/ml



Visualizar los amplicones en un transiluminador con LUV

III. Preparación de reactivos

Tabla 11. Preparación OADC 100 ml

Acido oleico*	50 mg
Albumina bovina Frac. V	5 g
Dextrosa	2 g
Catalasa**	4 mg
Agua destilada	100 ml
NaCL	85 %

* Se saponifica en NaOH 0.2 N a volumen igual

** Catalasa EC 1.11.1.6 Sigma C-9322 (de hígado bovino).

Tabla 12. Mezcla de azul alamar

Alamar azul 10X	Un volumen
Tween 80 al 10 %	Un volumen

*Preparar inmediatamente antes de usar. Conservarlo y usarlo protegido de la luz.

Tabla 13. Medio para obtención de monocitos

Medio DMEM	90 ml
antibiótico (antibiotic-antimycotic 100X)	1 ml
2-Mercaptoetanol (sol. de trabajo $5 \times 10^{-5}M$)*	0.5 ml
NaHCO ₃ 7.5% (solo si el medio no lo contiene)	2 ml
Suero fetal bovino	10 %
Suero de caballo	10 %
Medio condicionado DMEM**	15 %

* Para la preparación de solución de trabajo:

Primero se prepara una solución concentrada:

Mercaptoetanol 14.4 M (botella)	150 μ l
Medio sin aditivos (DMEM) o solución de Hanks	10 ml

Guardar en refrigeración protegido de la luz.

Se usó medio sin aditivos

Solución de trabajo:

250 μ l solución concentrada + 5 ml de medio DMEM

Esterilizar por filtración

**Medio condicionado es sobrenadante de cultivo de cel. L929 de 5 días de crecimiento.

Tabla 14. Mezcla de reacción para transcriptasa reversa:

Agua DEPC	2.4 μ l
Regulador 5X de la 1° cadena	4 μ l
DTT 100 mM	2 μ l
dNTP's 10 mM	0.8 μ l
M-MLV RT 200 U/ μ l	0.8 μ l

Tabla 15. Mezcla de reacción para PCR.

Agua DEPC	35.3 μ l
10 x PCR Reg	5.0 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2.5 μ l
dNTP's 10mM	2.5 μ l
Primer 5' 20 μ M	0.5 μ l
Primer 3' 20 μ M	0.5 μ l
Taq Polimerasa 5U/ μ l	0.2 μ l

Preparación de las soluciones amortiguadoras

Tabla 16. Solución de lisis

Stock [concentración]	Compuesto	Cantidad	concentración final
4 M	isotiocianato de guanidinio	1 ml	3.7 M
1 M	citrate de sodio	25 μ l	25.0 nM
14.3 M	2-mercaptoetanol	5 μ l	0.11 M
10%	Sarcosyl	50 μ l	0.5 %

Esterilizar todo excepto el 2- mercaptoetanol en autoclave 15' /15lb

Tabla 17. Solución de TBE 10X

Agua destilada	800 ml
Ácido bórico	55 g
Base de Tris.	108 g
EDTA	9.3 g

Ajustar el volumen a 1L con agua destilada

Para la elaboración de geles y para el corrimiento de los mismos se usó el TBE 1X

IV Imagen del marcador de peso molecular utilizado, Roche IX.

