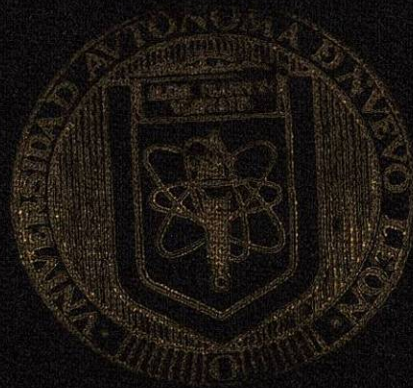


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS METANOLICOS Y
ACUOSOS DE LAS HOJAS DE *Ocimum basilicum*, *Rosa* sp., *Plantago*
virginica, *Persea arborescens* y *Larrea tridentata* SOBRE LA
PROLIFERACION DE LINFOCITOS TIMICOS DE RATA,
SU TOXICIDAD CONTRA LINEAS TUMORALES MURINAS Y
HUMANAS Y SUS EFECTOS ANTIBIOTICOS CONTRA *Candida albicans*

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BACTERIOLOGIA PARASITOLOGO

PRESENTA

LICENCIADA ALICIA VERASTEGUI RODRIGUEZ

INTÉRPRETE S. L.

ENERO DE 2003

TL

OK99

.A1

V47

2003

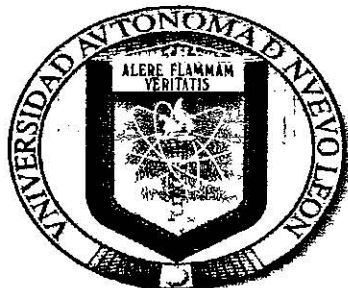
c.1



1080171446

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS DE *Ocinum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata* SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS TÍMICOS DE RATA, CITOTOXICIDAD CONTRA LINEAS TUMORALES MURINAS Y HUMANAS, Y SUS EFECTOS ANTIBIÓTICOS CONTRA *Candida albicans*.

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA

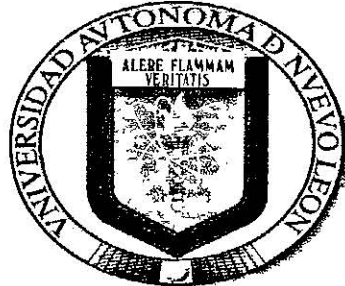
LAURA ALICIA VERASTEGUI RODRÍGUEZ

MONTERREY, N. L.

ENERO DE 2003.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS Y ACUOSOS DE LAS HOJAS DE *Ocimum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata* SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS TÍMICOS DE RATA, CITOTOXICIDAD CONTRA LINEAS TUMORALES MURINAS Y HUMANAS, Y SUS EFECTOS ANTIBIÓTICOS CONTRA *Candida albicans*.

COMISION DE EXAMEN

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
PRESIDENTE

DR. RICARDO GÓMEZ FLORES
SECRETARIO

DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA
VOCAL

DR. JUAN MANUEL ALCOCER
SUPLENTE

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 PROPIEDADES MEDICINALES DE LAS PLANTAS	2
2.2 COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS PLANTAS	6
2.2.1 Lípidos	6
2.2.2 Compuestos Aromáticos	8
2.2.3 Aminas	8
2.3 SISTEMA INMUNE	10
2.3.1 Linfocitos	11
2.3.1.1 Linfocitos T	12
2.3.1.2 Linfocitos B	12
2.3.1.3 Células NK	13
2.3.1.4 Interacción Linfocito-Macrófago	13
2.4 CÁNCER	14
2.5 <i>Candida albicans</i>	16
2.6 SISTEMA INMUNE Y EXTRACTOS VEGETALES	16
2.7 CANCER Y EXTRACTOS VEGETALES	19
2.8 MICROORGANISMOS Y EXTRACTOS VEGETALES	20
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
5. MATERIAL Y MÉTODO	
5.1 ORIGEN DEL MATERIAL	25
5.1.1 REACTIVOS	25
5.1.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	25
5.1.3 LINEAS CELULARES	25
5.2 VIABILIDAD CELULAR	26
5.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	27
5.3.1 EXTRACTOS METANÓLICOS	27

5.3.2	EXTRACTOS ACUOSOS	27
5.4	PRUEBAS QUÍMICAS	
5.4.1	PRUEBAS PARA FLAVONOIDES	28
5.4.2	PRUEBAS PARA SESQUITERPILACTONAS	29
5.4.3	PRUEBAS PARA COUMARINAS	29
5.4.4	PRUEBAS PARA LIGNANOS	29
5.4.5	PRUEBAS PARA ESTEROLES	30
5.4.6	PRUEBAS PARA SAPONINA Y SAPOGENINA	30
5.4.7	PRUEBAS PARA CARBOHIDRATOS	30
5.4.8	PRUEBAS PARA ALCALOIDES	30
5.5	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS INMUNES <i>IN VITRO</i>	
5.5.1	OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATA	31
5.5.2	PRUEBA DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS	31
5.6	DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL <i>IN VITRO</i>	32
5.7	DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIMICÓTICO SOBRE <i>Candida albicans</i>	32
5.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33

6. RESULTADOS

6.1	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS DE RATA <i>IN VITRO</i>	34
6.2	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LINEAS CELULARES	62
6.3	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Candida albicans</i>	66
6.4	PRUEBAS QUÍMICAS DE LOS EXTRACTOS	75
6.4.1	Pruebas Químicas de los extracto acuosos	75
6.4.2	Pruebas Químicas de los extractos metanólicos	75

7. DISCUSIÓN

85

8. CONCLUSIONES

98

9. RELEVANCIA DEL TRABAJO

102

10. LITERATURA CONSULTADA

103

APÉNDICE

1.	PREPARACIÓN DE REACTIVOS	113
2.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE Con A	114

“Atesora tus visiones y tus sueños, puesto que son hijos de tu alma; los bosquejos de tus logros finales”

Napoleón Hill

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme protección, fe y fortaleza para seguir adelante.

A mi mamá la maestra Dora Rodríguez mi gran amiga, por tener confianza en mi, por enseñarme que no hay obstáculo grande, por ser mi ejemplo, por los sacrificios y esfuerzos por los que hemos pasado para llegar a este punto..... Nadie mejor que tu lo comprendes.

A mi hermano Osvaldo Verástegui por compartir sueños y alegrías, por ser mi amigo.

A Oscar Ballesteros por estar conmigo, ser una gran motivación en mi vida, por su amor, comprensión y ayuda

Los quiero mucho

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad por brindarme la formación de un profesionista.

A la Dra. Cristina Rodríguez por su apoyo para realizar esta tesis y por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, logrando mi superación personal y profesional.

Al Dr. Ricardo Gómez por ayudarme a alcanzar esta meta. Por su apoyo, asesoría y oportunidades de aprendizaje, permitiéndome incursionar en el mundo de la investigación.

A la Dra. Lidia Rivera y Q. B. P. José Luis Méndez por su apoyo, asesoría y facilidades otorgadas para realizar este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio que me ayudaron a sacar adelante el trabajo, con buena disposición Diana Caballero, Carolina Solís, Marco Iván Ordaz, Enriqueta Monreal, Jeannie Salinas, Jessica Jacobi

A mi tía la Dra. Lupita Alanis por su apoyo para dar inicio y término de mi carrera profesional.

A mi familia, sobre todas las cosas, especialmente a mi mamá, por su apoyo, paciencia y comprensión.

A mi novio Oscar Ballesteros que en todo momento he contado contigo, por tu amor.

A mis amigas Lupita Hinojosa, Mayra Rizza, Almendra Castañeda, Tania Gutiérrez, Ayamin Arellano, Elva Salinas, Daniela Benavides..... Por brindarme su amistad incondicional, compartir tantas cosas, seguir a mi lado y ayudarme a salir adelante.

A todas aquellas personas que de alguna forma u otra hicieron posible este trabajo con su apoyo.

Muchas gracias

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
ATCC	American Type Cell Culture
CD	Cluster de diferenciación
Cels/ml	Células por cada mililitro
Con A	Concanavalina A
CO ₂	Dióxido de carbono
DMF	Dimetil Formamida
D. O.	Densidad óptica
Exp	Experimento
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Índice de Proliferación
LPS	Lipopolisacárido
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
NK	Células asesinas naturales (del inglés natural killer)
nm	Nanómetros
PBS	Solución Salina de Fosfatos
PHA	Fitohemaglutinina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
YM	Medio para levadura (del inglés Yeast Medium)
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µg/ml	Microgramos por cada mililitro

RESUMEN

Debido a la capacidad de compuestos aislados de plantas para interactuar con funciones biológicas, los objetivos de este estudio se enfocaron en el desarrollo y aplicación de bioensayos para la búsqueda de actividad inmunoregulatora, antitumoral y antibiótica de extractos acuosos y metanólicos de las plantas mexicanas, *Ocimum basilicum*, *Plantago major*, *Rosa sp.* *Persea americana* y *Larrea tridentata*. Los extractos se evaluaron a concentraciones de 3.91 µg/ml a 250 µg/ml en particular, para determinar sus efectos antibióticos sobre *Candida albicans* se utilizaron concentraciones de 7.81 µg/ml a 500 µg/ml.

Se observó que los extractos acuoso y metanólico de *O. basilicum* y el acuoso de *Rosa sp.* estimularon significativamente la proliferación de linfocitos tímicos de rata estimulados con Con A *in vitro* en comparación del control no tratado.

Además se observó que el extracto metanólico de *P. americana* fue citotóxico contra la línea celular proveniente de mieloma humano U937, sobre la línea del linfoblasto murino L1210 y sobre la línea del fibrosarcoma murino L929, está última línea tumoral resulto ser más susceptible a los extractos, pues también el extracto metanólico de *P. virginica* y el acuoso de *Rosa sp.* tuvieron actividad citotóxica. Sin embargo, se observó que todos los extractos de las plantas tuvieron actividad de estimulación del crecimiento *in vitro* sobre la línea celular de linfoblastoma murino L5178Y.

Respecto a la actividad antibiótica casi todos los extractos de las plantas (exceptuando los extractos de *P. virginica*) mostraron actividad de inhibición significativa del crecimiento *in vitro* contra *C. albicans* siendo los extractos acuosos de *Rosa sp.* y *P. americana* los de mayor actividad.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad en todas las culturas se describe el uso de plantas como medicamentos para tratar enfermedades. Debido a la pública pérdida de confianza de la medicina alópata. El uso de las llamadas hierbas medicinales ha ganado popularidad con el fin de encontrar medicamentos nuevos y más eficaces.

El 30% de los fármacos empleados hoy en día proceden o se han sintetizado a partir de compuestos vegetales. Las plantas producen miles de metabolitos que pueden ser utilizados para el tratamiento y prevención de enfermedades como cáncer, procesos inflamatorios, enfermedades infecciosas y cardíacas, entre otras. Las plantas pueden interactuar y tener efectos significativos sobre el sistema inmune, estimulándolo de tal manera que incremente la capacidad de defensa. Igualmente, compuestos aislados de plantas pueden tener capacidad antibiótica y antitumoral directa.

La flora mexicana es una de las más ricas del mundo, sin embargo los estudios de la flora mexicana son relativamente escasos. Aprovechando el conocimiento etnofarmacológico existente sobre la gran variedad de plantas, los objetivos de este estudio se enfocaran hacia el desarrollo y aplicación de bioensayos para la búsqueda de actividad inmunoregulatora, antitumoral y antibiótica de algunas plantas del noreste de México.

2. ANTECEDENTES

2.1 PROPIEDADES MEDICINALES DE LAS PLANTAS

La búsqueda de propiedades curativas en las plantas se remonta a tiempos ancestrales; culturas de todo el mundo han usado infusiones de miles de plantas nativas, como en la prehistoria y en muchas ocasiones se obtiene alivio de los síntomas o inclusive la cura del padecimiento.

Se estima que hay de 250, 000 a 500 000 especies de plantas en la Tierra. Un porcentaje relativamente pequeño (1-10%) son usados como alimento para animales y el hombre; por lo que es posible que una mayor proporción de estas plantas se utilice para fines médicos. Alrededor de un cuarto hasta la mitad de todos los productos farmacéuticos tienen orígenes de plantas, aunque muy pocos se usan como antimicrobianos desde la aparición de productos derivados de bacterias y hongos (Murphy, M. C. 1999).

Existen plantas que interactúan de forma benéfica en el sistema inmune, no sólo como causantes de alergias sino que tienen la capacidad de estimular la inmunidad de manera benéfica, y como ejemplo bien estudiado tenemos a la *Echinacea* y el *Aloe vera* (Kaufman P. B. et al 1999).

Por otra parte, los medicamentos a base de plantas han tomado parte importante en el tratamiento del cáncer, por ejemplo los alcaloides vinblastina y vincristina derivados de la planta *Catharanthus roseus* (Kaufman P. B. et al 1999) o los populares café y té verde de los que se menciona actividad anticancerígena (Shwaireb M. H., et al 1995).

Pero en su mayoría se reporta actividad antibiótica por parte de las plantas, de hecho un promedio de dos a tres antibióticos derivados de microorganismos es lanzado cada año, por lo que nuevas fuentes de antibióticos están siendo investigadas especialmente las de origen vegetal, aunado al peligro

de la automedicación y el uso indebido de los antibióticos tradicionales (Murphy, M. C. 1999)

Las plantas que se utilizaron en este estudio se seleccionaron, debido a las propiedades reportadas que a continuación se describen brevemente.

La planta *Ocimum basilicum* se eligió debido a que se le atribuyen propiedades antiespasmódicas y desparasitantes (Luna A. 1987). En remedios caseros se recomienda la infusión de sus hojas y flores para el dolor de cabeza y de garganta sus hojas machacadas como antiséptico y cataplasma en heridas y llagas. Es comúnmente conocida como albahaca; es una planta muy común en el jardín de agradable y trascendente aroma, es muy usada en la cocina como hierba aromática (Fig. 1). El principal ingrediente activo es el eugenol (Martínez J. R. 1990).

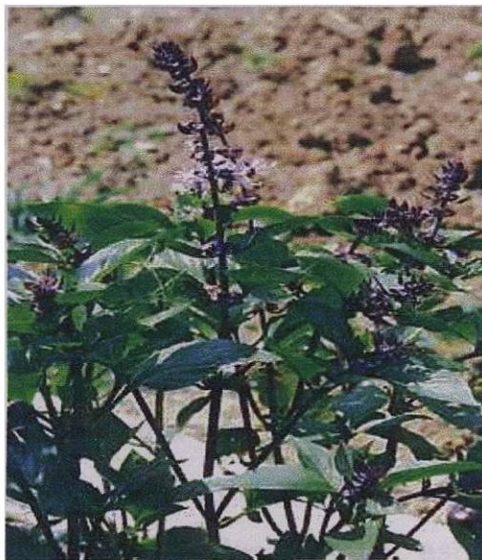


Fig. 1 Planta de *Ocimum basilicum*

En general a todas las especies de *Plantago* (*lanceolata*, *media*, *maritima*, *arenaria*, y *major* (que es la más estudiada en la actualidad) se le atribuyen propiedades antitumorales y de estimulación del sistema inmune (Gómez-Flores R. et al 2000); en este estudio se utilizó *Plantago virginica*, es una planta anual con

hojas ovadas, con varias nervosidades, con bordes dentados y con pedúnculos altos terminados por una espiga larga y cilíndrica. Generalmente crece junto al zacate y se le conoce como llantén (Fig. 2), su infusión se utiliza para dolor de oídos como diurético y antiinflamatorio. Las hojas machacadas se utilizan para la cicatrización de heridas y erupciones herpéticas (Luna A. 1987).



Fig. 2 Planta de *Plantago virginica*

Rosa, por su parte, es una planta es mundialmente conocida por su belleza y suave olor (Fig. 3). En la actualidad se conoce más de 15 mil variedades de rosa (*Rosa alba, incarnata, rosa, etc*). Sus efectos varían según la especie de rosal, pero en general se habla del uso de los pétalos de la flor principalmente. La infusión de los pétalos tiene propiedades laxantes, astringentes, emolientes para la piel, antiinflamatoria de ojos, párpados y para lavar los ojos, también se usa para tratar irritaciones de la garganta, y contra la gonorrea en inyecciones uretrales (Luna A. 1987).



Fig. 3 Planta de *Rosa sp.*

En relación a *Persea americana* (Fig. 4) comúnmente conocida como aguacate, su fruto es ampliamente utilizado como alimento. Sin embargo sus hojas se utilizan desde hace años para combatir los cólicos menstruales, y como lavado para afecciones micóticas de cabeza y piel (Luna A. 1987).

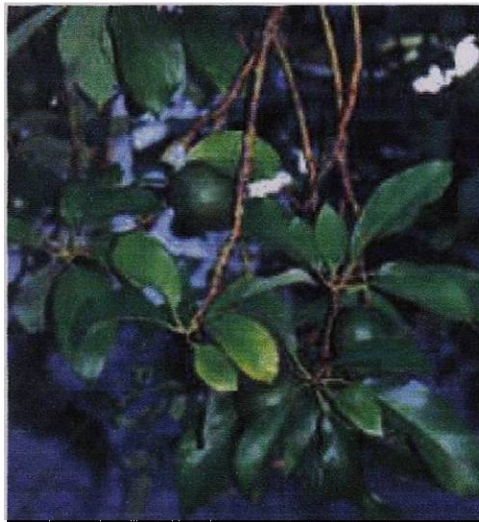


Fig. 4. Árbol de *Persea americana*

Por otro lado, *Larrea tridentata* (Fig. 5) es el nombre de la planta comúnmente conocida como gobernadora o chaparral la cual tiene un fuerte aroma. Es hepatotóxica por ello, se utilizan infusiones muy diluidas (Heron S. y Yarnell E. 2001) para disolver cálculos renales y vesiculares, como antirreumático aplicado en forma tópica y lavados de la infusión para infecciones micóticas de la piel (Zintzun T. 1986). Existen otras especies que tienen las mismas propiedades.

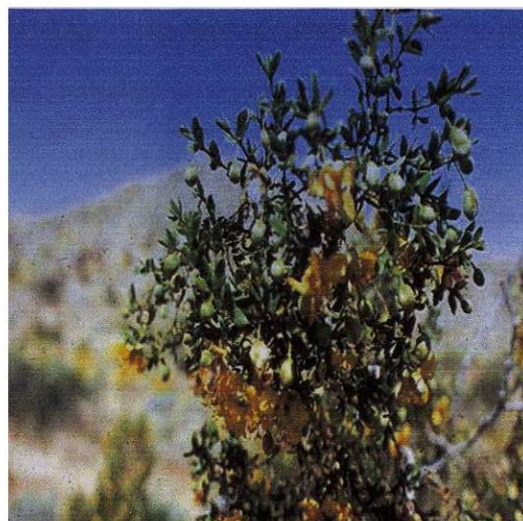


Fig. 5 Planta de *Larrea tridentata*

2.2 COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS PLANTAS

Las plantas elaboran una variedad muy amplia de compuestos químicos que a menudo reciben el nombre de fitoquímicos. Estas sustancias tienen como función alimentar, proteger o estimular el crecimiento de las plantas (Kaufman P. B. et al 1999).

2.2.1 LIPIDOS

Los lípidos constituyen una heterogénea colección de moléculas, están unidos por una única característica que es la insolubilidad en agua. De los

diversos tipos de lípidos presentes en las estructuras biológicas sólo dos tienen gran importancia: los esteroides y los fosfolípidos. El esteroide más importante estructuralmente es el colesterol (Smith C. U. 1975).

Los esteroides son sustancias ampliamente distribuidas tanto en el reino animal como el vegetal, son compuestos orgánicos, donde el ejemplo típico es el colesterol, el cual también lo podemos encontrar en las plantas y es el precursor de los demás esteroides. Aquí podemos mencionar a las saponinas y sapogeninas esteroidales que son sustancias con propiedades de jabón, y se encuentran en las plantas unidas a uno o varios azúcares (Romo de Vivar A., 1985).

Dentro de los lípidos se encuentra otro grupo de sustancias químicas de gran interés, que son los terpenoides, los cuales se aíslan frecuentemente en forma de aceites esenciales y se dividen en cinco grupos de acuerdo a las unidades de isopreno que contengan: monoterpenos (2), sesquiterpenos (3), diterpenos (4), triterpenos (6), politerpenos (n). Todos estos compuestos son metabolitos secundarios de plantas. Dentro de estos compuestos destacan las lactonas sesquiterpénicas ó sesquiterpenlactonas ya que tienen propiedades químicas y biológicas interesantes, destacándose la función de hormonas vegetales (Romo de vivar A., 1985).

Tanto las grasas como los aceites, desde el punto de vista químico son ésteres de ácidos grasos y glicerol. Se les llama aceites si son líquidos y grasas si son sólidos (Burton D. J y Routh J. L. 1977). Son sustancias muy comunes a todas las plantas. La gobernadora, contiene gran cantidad de una cera de la cual se ha aislado un antioxidante, el ácido nordihidroguayarético (Domínguez X.A 1973).

Otras sustancias muy comunes en las plantas son las ceras. Las ceras son lípidos simples, ésteres de ácidos grasos y alcoholes de peso molecular elevado (Burton D. J y Routh J. L. 1977).

2.2.2 COMPUESTOS AROMÁTICOS

Prácticamente todas las plantas contienen una variedad de productos naturales que incluyen un anillo aromático. Dentro de los compuestos aromáticos fenólicos se encuentran los fenilpropanoides, flavonoides, taninos y quinonas que son fenoles simples, que se encuentran comúnmente formando parte de los tejidos. También están los compuestos aromáticos fenólicos en su forma de ésteres metílicos y el ejemplo más común en las plantas son las coumarinas (Murphy, M C. 1999). Como ejemplo de los fenilpropanoides se encuentran las hidroxycoumarinas, fenilpropanos y lignanos. Dentro los flavonoides tenemos a las catequinas, leucoantocianidinas, flavanonas, flaonas, antocianinas, flavonoles, charconas, auronas e isoflavones. Y como ejemplos de quinonas podemos mencionar tres principalmente: la benzoquinona, naftoquinona y antroquinona (Kaufman P. B. et al. 1999). Por otro lado están los compuestos aromáticos no fenólicos, un ejemplo de estos compuestos son los tetrapirroles, donde se incluyen la clorofila, ficoeritrina, ficocianina, y otros compuestos que son pigmentos de las plantas (Murphy, M. C. 1999).

2.2.3 AMINAS

Dentro de los compuestos de las plantas están las aminas. El grupo de las aminas se divide en aminas alifáticas que son compuestos que tienen olores muy fuertes y desagradables que poseen algunas plantas para atraer a insectos; y las aminas aromáticas que destacan por sus propiedades fisiológicas ya que aquí se encuentran los alcaloides (Kaufman P. B. et al 1999).

Para obtener compuestos activos de plantas, se utilizan diferentes solventes con diversos grados de polaridad, principalmente se usa agua, etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona. En la Tabla 1 se enlistan los principales compuestos activos de plantas que se obtienen dependiendo el solvente utilizado.

AGUA	ETANOL	METANOL	CLOROFORMO
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides
*Polisacáridos	Polifenoles	Terpenos	Flavonoides
Taninos	*Poliacetilenos	Saponinas	
Saponinas	Flavonoles	Taninos	
Terpenos	Terpenoides	*Xantocianinas	
*Polipéptidos	*Esteroles	*Totaroles	
*Lectinas	Alcaloides	*Quassinoides	
	*Propolios	*Lactonas	
		Flaonas	
		*Penonas	
		Polifenoles	

DICLOROMETANO	ETER	ACETONA
Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
	Terpenoides	
	*Coumarinas	
	*Ácidos grasos	

* Compuestos obtenidos con un sólo solvente. (Murphy C. M 1999).

Tabla 1. Solventes usados para la extracción de compuestos activos de plantas.

2.3 SISTEMA INMUNE

El ser humano vive rodeado de una gran variedad de agentes patógenos, los cuales pueden causar enfermedad, para evitar esto los organismos han desarrollado mecanismos de defensa, al conjunto de estos mecanismos se le denomina inmunidad. Existen mecanismos de defensa innatos (inmunidad innata ó natural) con los cuales se nace y no son específicos, estos constituyen la primera barrera de defensa; este tipo de defensa nos permite controlar la mayor parte de los agentes patógenos. Nuestra piel y membranas mucosas son las primeras barreras, las mucosas generalmente están bañadas con líquidos como saliva, lágrimas ó secreción nasal (moco), que contienen sustancias antimicrobianas, y la microflora natural (Stites D. P., et al 1996). Pese a estas defensas, las mucosas son los sitios más comunes de entrada de microorganismos y de sus toxinas. Si la inmunidad innata no es suficiente para controlar a los agentes infecciosos, entonces se desarrolla una respuesta inmune específica, respuesta que recibe el nombre de inmunidad adquirida la cual posee memoria inmunológica específica, que tiende a evitar que el agente infeccioso provoque enfermedad a un reto antigénico posterior. (García-García M. y Rosas-Landa V. 1999).

El sistema inmune consta de una serie de órganos, tejidos y células distribuidos por todo el cuerpo. Las células del sistema inmune se originan en la médula ósea se dividen en dos clases según el tejido u órgano linfoide en donde se diferencian; estas son macrófagos y linfocitos. Ellas provienen de una célula pluripotencial (madre estaminal) que se multiplica continuamente a nivel de médula ósea, la cual da origen a grupos de células que empiezan a desarrollarse en dos líneas llamadas, mielocítica y linfocítica (García-García M. y Rosas-Landa V. 1999).

2.3.1 LINFOCITOS

Los linfocitos son responsables de la producción de anticuerpos y linfocinas (moléculas que modulan la respuesta inmune), participan en la respuesta inmunológica específica, se diferencian en células T y células B. En los mamíferos las células T maduran en el timo, mientras que las B maduran en el hígado fetal y en médula ósea (órganos linfoides primarios). Los órganos linfoides secundarios (ó periféricos) son el bazo, ganglios linfáticos y tejidos asociados a mucosas, estos proporcionan a los linfocitos un entorno en el que puedan interaccionar, con células accesorias (macrófagos) y con los antígenos, después de migrar desde los órganos linfoides primarios a través del torrente sanguíneo (Woods S. L. 1996). Precisamente en los órganos linfoides primarios es dónde los precursores de linfocitos T y B adquieren la habilidad de reconocer antígenos por el desarrollo de receptores específicos de superficie. Pero existe un tercer tipo de linfocitos llamados células asesinas naturales (células NK) morfológicamente son linfocitos granulares grandes (Roitt I. et al. 1998).

Los linfocitos expresan una gran cantidad de receptores y moléculas en la superficie, que pueden ser utilizados para distinguir a las poblaciones celulares. Muchos de estos marcadores de superficie pueden ser identificados por anticuerpos monoclonales específicos. Así se designó un sistema de nomenclatura llamado CD (cluster de diferenciación) que se deriva del análisis con un grupo de anticuerpos monoclonales y se asigna un número para indicar el marcador de superficie que se reconoció por dicho grupo de anticuerpos monoclonales (Roitt I. et al. 1998).

Cualquier atenuación de la función de los linfocitos puede llevar a una amplia supresión inmunológica incrementando así la posibilidad de desarrollar metástasis tumorales o infecciones tales como las causadas por el VIH, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans*.

2.3.1.1 Linfocitos T

Los linfocitos T durante la infancia, se diferencian en el timo, pero al llegar la adolescencia, el timo involuciona y entonces la diferenciación ocurre sobre todo en la piel y mucosa intestinal (Bell R. A. y K. P. High 1997). Existen varios tipos de células T; células T cooperadoras que interactúan con las células B, ayudándoles a diferenciarse, multiplicarse y producir anticuerpos, o interactúan con fagocitos para ayudarles a destruir al patógeno intracelularmente. Otro tipo de células T es llamado células T citotóxicas debido a que tienen la capacidad de destruir a células infectadas con virus, patógenos intracelulares o cancerosas. Responden al reto antigénico proliferando y expandiendo las clonas específicas de antígeno para amplificar las respuestas inmunes (Weber y Pert, 1989). Poseen un receptor de células T asociado no covalentemente al llamado complejo CD3, lo que conjuntamente se denomina complejo receptor de las células T. Otros marcadores característicos que posee es el CD2 el cual les brinda la característica de adherirse a eritrocitos de oveja, y los marcadores de superficie que distinguen a las subpoblaciones de células T que son el CD 4 para las células T cooperadoras y el CD 8 para las células T citotóxicas (Roitt I. et al. 1998).

2.3.1.2 Linfocitos B

Los linfocitos B constituyen del 5 al 15% de los linfocitos circulantes. Reconocen al antígeno en forma soluble, por medio de sus inmunoglobulinas de membrana (Ig) que forman parte del complejo receptor de las células B. Están genéticamente programados para expresar un receptor específico en la superficie para un antígeno en particular, una vez que reconocen a este antígeno específico, la célula B se multiplica y diferencia en célula plasmática, la cual es capaz de producir grandes cantidades de anticuerpo, que es secretado en forma soluble (Stites D. P., et al 1996). Los anticuerpos son cadenas largas de glicoproteína que son idénticos al receptor original, de manera que se adhieren al antígeno que inicialmente activó a la célula B. La células B expresan diferentes tipos de inmunoglobulinas en la

superficie, dependiendo del sitio donde se encuentren las células, es decir la mayoría de las células B presentes en el torrente sanguíneo expresan dos tipos de inmunoglobulinas en la superficie IgM e IgD, en cambio las células presentes en mucosa intestinal expresan IgA en la superficie, por otro lado la IgM se encuentra en la superficie de las células B asociado a otras moléculas (por ejemplo a CD79a y CD79b) de superficie formando el llamado complejo de receptores de células B. Otros receptores de superficie de las células B son el CD35, CD21 que son receptores de C3b y C3d de complemento respectivamente. Cd19, CD20 y CD22 son los principales marcadores de superficie para identificar a las células B, otras moléculas que identifican a los linfocitos B humanos son CD72-78, aunque el CD40 también es importante en linfocitos B, esta relacionado con la interacción de células B y T (Roitt I., et al. 1998).

2.3.1.3 Células NK

Las células NK a diferencia de otros linfocitos, carecen de especificidad y de memoria, por lo que forman parte del sistema de inmunidad natural o inespecífico. Representan el 15-20% de los linfocitos. Poseen dos tipos de funciones: acción citotóxica y reguladora del sistema inmune a través de las citocinas que producen. También pueden desarrollar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ó ADCC. La mayoría de los receptores de superficie de las células NK, también los poseen las células T o monocitos/macrófagos, pero el CD16 es el marcador más común para identificarlos de las demás poblaciones de linfocitos y el CD 56. (Roitt I., et al. 1998).

2.3.1.4 Interacción Linfocito-Macrófago

La interacción entre linfocito-macrófago es un evento central en el inicio y regulación del sistema inmune hacia antígenos solubles y particulares. (Gómez-Flores et al 1990). La activación y proliferación inducidas por antígenos se suelen producir en los tejidos linfoides y pueden ser observadas *in vitro* cultivando

linfocitos en presencia de un agente activador. Estos agentes activadores se denominan mitógenos; son moléculas capaces de estimular a los linfocitos en ausencia de antígeno, entre ellos se encuentran las lectinas, que son proteínas de origen vegetal y bacteriano capaces de unirse a los hidratos de carbono. Algunas de ellas activan los linfocitos mediante el entrecruzamiento de los receptores de células B o los receptores de células T (Ferrante A. et al 1990). Por ejemplo la fitohemaglutinina (PHA) extraída de la alubia roja y la concanavalina A (Con A) que procede de la semilla de ricino, estimulan a la mayoría de las células T humanas y murinas, el lipopolisacárido (LPS) estimula las células B murinas y el mitógeno de la hierba carmín estimula a las células T y B humanas. Se cree que la estimulación *in vitro* de los linfocitos mediante mitógenos es una estimulación bastante fidedigna del proceso de estimulación producido por los antígenos específicos (Roitt I., et al. 1998).

2.4 CANCER

El cáncer es el resultado de alteraciones en una célula que modifica su potencial de crecimiento, la respuesta a los mecanismos de control y función. Estos cambios pueden implicar mutaciones en uno o más genes, anormalidades cromosómicas graves o anomalías en la transcripción y alteración de las propiedades de crecimiento de la célula. La proliferación de esta célula transformada genera un crecimiento maligno sugiriendo un origen monoclonal del cáncer (Madigan T. M., et al 1998).

Los mecanismos moleculares que desencadenan la formación de un tumor están relacionados con genes que tienen la capacidad de transformar una célula normal en maligna (los oncogenes). Estos genes evolutivamente conservados y presentes en células normales están activos durante la vida embrionaria y participan en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Después de esta

etapa se encuentran en estado latente (protooncogenes). Se han identificado 30 oncogenes celulares cuya estructura es homóloga a la de los oncogenes aislados de virus de RNA (oncogenes virales). La reactivación de los oncogenes puede ocurrir por inserción viral (retrovirus), mutaciones puntuales, amplificación génica o rearrreglos cromosómicos, lo que conduce a la producción de proteínas anormales o a un exceso de síntesis de proteína normal. Estos productos tienen propiedades transformantes y están íntimamente relacionados con la iniciación y progresión de las neoplasias (Roitt I., et al. 1998).

Las células cancerosas pueden separarse del tumor maligno y entrar al torrente sanguíneo o al sistema linfático, el proceso mediante el cual el cáncer se extiende del tumor original a otras partes del cuerpo para formar nuevos tumores que se conoce como metástasis. La metástasis es un parámetro muy significativo en la progresión de los tumores malignos, y el primer determinante en un mal pronóstico. La metástasis por torrente sanguíneo es la vía principal por la cual las células tumorales infectan otros sitios del cuerpo. (Qian F. et al. 2001).

El cáncer se clasifica según el tipo de tejido; sarcoma (los de origen mesenquimatoso afecta el tejido óseo y muscular), leucemia/linfoma (de origen hematopoiético linfoide) y carcinomas (los de origen epitelial que constituyen la mayor parte de los cánceres glandulares, pecho, estómago, útero, piel y lengua).

Los tratamientos que se han utilizado para combatir el cáncer (eliminación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, entre otras) tienen el gran inconveniente de no ser selectivos entre células cancerosas y células normales, por ello la búsqueda de sustancias provenientes de fuentes naturales que tengan la capacidad estimular al sistema inmunológico, y sean capaces de inhibir, controlar o eliminar el cáncer (Gómez-Flores, et al. 2000); esto ha llevado a muchos investigadores a estudiar diversas plantas medicinales. Muchas plantas han mostrado tener capacidad farmacológica. (Evans, 1982).

2.5 *Candida albicans*

Candida es un hongo dimórfico oportunista, la especie patógena más importante de este género es *C. albicans* que es el agente común del algodoncillo oral y vaginal, candidiasis de piel y broncopulmonar. Los individuos más afectados son las personas inmunosuprimidas, niños y personas de la tercera edad. El ejemplo más común de individuos inmunosuprimidos atacados por este patógeno son los enfermos de SIDA (Madign T. M. et al 1998).

La candidiasis es una infección primaria o secundaria que involucra a un miembro del género *Candida*, esencialmente *C. albicans*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables, desde aguda, subaguda y crónica hasta episódica, estas manifestaciones se localizan en boca, garganta, piel, cuero cabelludo, vagina, dedos, uñas, bronquios, pulmones y sistema gástrico o transformarse en sistémicas como en la septicemia, endocarditis y meningitis. *C. albicans* es una especie endógena, la enfermedad por tanto, representa una infección oportunista. Las especies de *Candida* (sobre todo *C. albicans*) se adquieren como comensales en mucosa y aparato digestivo de la vagina materna al momento del parto. La infección sistémica es la micosis profunda oportunista comúnmente encontrada en pacientes inmunocomprometidos (Rippon J. W. 1988).

2.6 EL SISTEMA INMUNE Y LOS EXTRACTOS VEGETALES

Las plantas tienen compuestos que interactúan con las células del sistema inmunológico, por ejemplo en el proceso inflamatorio donde extractos metanólicos de hojas de algunas plantas de Nepal pueden inhibir la biosíntesis de leucotrienos por parte de leucocitos polimorfonucleares de bovino (Kumar S., et al 2000).

Además extractos acuosos de *Viscum album L.* se usan como terapia por sus efectos estimulantes del sistema inmune y agentes citotóxicos, la fracción de polisacáridos del extracto es el responsable de la actividad inmunopotenciadora, semejante a la presente en los polisacáridos de la planta *Echinacea*. Por su parte, las lectinas vegetales son conocidas por tener actividad mitogénica del sistema inmune (Ferrante A. et al 1990), como ejemplo bastante estudiado tenemos a las lectinas provenientes de la cactácea *Aloe vera* que activa la proliferación de linfocitos murinos (Kaufman P. B. 1999).

También sesquiterpenlactonas derivadas de plantas medicinales mexicanas tienen gran actividad antiinflamatoria (Heinrich M., et al 1998), datos recientes demuestran que estos compuestos son potentes inhibidores del factor proinflamatorio NF- Kappa β , por lo que da como resultado la inhibición de la IL-8 (Mazor R.L, et al 2000); también se observó inhibición de la producción de óxido nítrico *in vitro* (Wong H. R., et al 1999).

En cambio las quinonas tienen la capacidad de ser sustancias antihemorrágicas debido a su potencial de oxidar tejidos; mientras que los taninos han mostrado tener un efecto de estimulación en células fagocíticas (Murphy, C M. 1999).

Otras sustancias con actividad inmunológica son las coumarinas, que tienen la capacidad de estimular la actividad de proteinasa por parte de macrófagos murinos, lo que lleva a un efecto benéfico indirecto en los procesos infecciosos, también debido a dicha actividad se han utilizado para el tratamiento de edemas y altos niveles de proteína en sangre (Knight K. R., et al 1992); también tienen propiedades antitrombosis, vasodilatadoras (Brouwer M. A. et al. 2000) y antiinflamatorias (Plesca-Manea L, et al. 2002).

Aunque los alcaloides se utilizan como analgésicos los presentes en hojas de *Adhatoda vasica nees* presentan actividad antiinflamatoria (Kaufman P.B 1999).

Las pectinas, por su parte también presentan propiedades inmunológicas por ejemplo una pectina aislada de *Plantago major* (Michaelsen T. E., et al 2000).

Plantago major, presenta varias propiedades inmunológicas como: antiinflamatorias, antitumorales, inducción de proliferación de linfocitos de rata, así como incremento en la producción de óxido nítrico y TNF-alfa de macrófagos peritoneales de rata (Gómez-Flores R., et al. 2000), asimismo tiene la capacidad de activar el complemento, atribuido a una pectina (Michaelsen T. E., et al 2000). También tiene propiedades de acelerar el proceso de cicatrización de las heridas, esto quizás se deba a la capacidad que tiene de activar ambas vías del complemento (Michaelsen T. E, et al 2000). Por otra parte mostró la capacidad de proteger contra la infección de *Streptococcus pneumoniae* en ratones cuando se les administró de manera sistémica, activando la inmunidad innata (Hetland G., et al 2000).

Asimismo el extracto metanólico de *Plantago asiatica* mostró tener efecto inhibitorio en la producción de óxido nítrico en líneas celulares J774 estimuladas con LPS y estimulación en la producción de INF- γ por macrófagos peritoneales murinos (Tezuka Y., et al 2001).

Por su parte, *Ocimum basilicum* tiene propiedades antiinflamatorias y puede bloquear las vías de la cicloxigenasa y lipoxigenasa del metabolismo ácido araquidónico (Singh S. 1998). Los extractos acuosos y metanólicos de *O. basilicum* mostraron regresión de úlceras gástricas inducidas a ratas (Akhtar M. S. y Munir M. 1989).

Por otro lado, los extractos de *Rosa roxburghii* tienen propiedades antiateroesclerosis cuando se alimentan a modelos animales con colesterol (Zhang C., et al 2001).

Además el extracto acuoso de *Persea americana* mostró propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Adeyemi O., et al 2002).

2.7 EL CANCER Y LOS EXTRACTOS VEGETALES

Existen varias plantas que tienen propiedades anticancerígenas y que muchas veces son utilizadas en conjunto con las terapias convencionales. Por ejemplo una droga usada para el tratamiento del cáncer llamada rheim es una antroquinona aislada de plantas de la especie *Rheum*, debe su actividad anticancerígena a la habilidad de destruir la membrana celular que presente microfilamentos de actina alterados (Iosi F., et al 1993).

El café verde y té verde se mencionan como probables agentes preventivos de cáncer, en un estudio por Shwaireb M. H., et al (1995) se confirmó la capacidad de inhibir la formación de tumores de glándulas mamarias en ratas alimentadas con extractos acuosos de las hojas del té y café verdes.

Por otra parte, varios compuestos derivados de plantas se asocian con actividad antioxidante, por ejemplo flavonoides, coumarinas, lignanos y alcaloides de plantas chinas mostraron tener propiedades antioxidantes, reflejadas en la habilidad de inhibir la peroxidación de los lípidos en cerebro y riñón de rata (Ng TB, et al 2002). Asimismo el flavonoide aislado del frijol de soya (*Glycine max*), llamado geneisteina, tiene actividad anticancérgica ya que puede disminuir la incidencia y el número de tumores e incrementar la viabilidad en modelos animales (Barnes S. 1995), así como inhibición de la proliferación de líneas celulares tumorales (Peterson G. 1995).

También las sesquiterpenlactonas tienen la propiedad de inhibir tumores cancerosos. En plantas de la especie *Podocarpus* se aislaron lactonas con actividad citotóxica, que además de su actividad de hormona vegetal también tienen actividad antileucémica (Kaufman P. B., et al 1999).

Asimismo existen plantas que presentan propiedades anticancerígenas, que en muchas ocasiones se deben a la presencia de alcaloides (Pinn G. 2001); por ejemplo los alcaloides vinblastina y vincristina derivados de *Catharanthus roseus* que se han usado por años en el tratamiento de linfomas y leucemias, tienen como

mecanismo anticancerígeno el desamblaje de microtubulos y la mitosis se detiene en metafase (Kaufman P. B. et al 1999).

Por su parte, *Plantago major* demostró tener actividad citotóxica contra una línea celular de hepatocarcinoma humano (Ruffa M. J., et al 2002).

También el extracto acuoso de *Persea americana* mostró actividad citotóxica para diversas líneas celulares especialmente contra la PC-3 que es adenocarcinoma de próstata (Oberlies N. H., et al 1998).

2.8 MICROORGANISMOS Y EXTRACTOS VEGETALES

La tendencia de la medicina ha incrementado el uso de drogas derivadas de plantas como antibióticos, debido a que estos se han convertido en inefectivos particularmente en procesos virales. Recientemente, el aumento de personas con virus de inmunodeficiencia humana (HIV) ha detonado intensa investigación sobre derivados de plantas que puedan ser efectivos para tratamiento del síndrome, especialmente en naciones subdesarrolladas. (De Clercq E. 1995).

Los principales grupos de componentes antimicrobianos de las plantas son: fenoles, terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Murphy M. C. 1999).

Respecto a los terpenoides, son los responsables de la fragancia de la planta son los llamados aceites esenciales. En 1984 se reportó que tienen actividad antibacterial, antifungica, antiviral y antiprotozoarios, además que el 60% de los aceites esenciales son inhibidores de hongos y 30% de bacterias rompiendo la membrana por medio de compuestos lipofílicos (Chaurasia, S. C., y K. K. Vyas 1977). Por su parte las sesquiterpenlactonas tienen actividad biológica que incluye reguladora de crecimiento vegetal y antihelmíntica. (Romo J., et al 1967). Un ejemplo de diterpenoide con actividad antimicótica es el *Taxol* descubierto por Wani et al. (1971).

Asimismo, los fenoles muestran efecto antibacterial contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Chew B. P., et al 1985; Ebi G. C. 2001) y antifúngico (Kobayashi A, et al. 1994) un ejemplo son los ácidos cinámico, caféico, catecol y pyrogalol.

También las quinonas reportan propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Yang X., et al 2001). Son responsables del color pardo que toman los frutos al ser cortados o golpeados (Murphy M. C. 1999)

Por otro lado los flavones, flavonoides y flavonoles son sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones de microorganismos, por ello su efecto antibiótico *in vitro*, tienen la capacidad de formar complejos con proteínas extracelulares y solubles así como complejos con proteínas de la pared celular de bacterias en mecanismos semejantes a los de las quinonas mencionadas anteriormente, un ejemplo son las catequinas las cuales han mostrado la capacidad de inhibir *in vitro* a *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sp.*, entre otros microorganismos (Kaufman P.B. et al 1999).

Los compuestos que han empezado a tomar interés desde la sugerencia de ingerir bebidas que contengan estos compuestos, tales como té verde y vino tinto puede curar ó prevenir enfermedades, son los taninos que se pueden encontrar en casi todas las partes de la planta, se dividen en dos grupos taninos hidrolizables y condensados (Muphy M. C. 1999). Una de sus acciones moleculares es la de formar complejos con proteínas mediante puentes hidrógeno, uniones hidrofóbicas y covalentes, un ejemplo de actividad antibiótica de los taninos es la presente en la planta *Treminalia alata* en extractos metanólicos contra bacterias gram positivas y gram negativas (Taylor R. S. et al. 1996).

Otros compuestos fenólicos que poseen propiedades interesantes como antimicrobianas son las coumarinas; tienen efecto antibiótico contra candidiasis vaginal debido a la afinidad que poseen para adherirse a la DNA-girasa de los microorganismos (Lafitte D., et al 2002).

Por otro lado los alcaloides, conocidos por su primer compuesto útil para la industria médica, la morfina que proviene de la planta *Papaver somniferum*, reporta actividad antiprotozoarios (Omulokoli E, et al 1997), antibacterial y antifungica. (Kariba RM, et al 2002).

Otros compuestos de plantas con actividad biológica interesante son los péptidos, tienen actividad antimicrobiana debido a que producen canales de iones en la membrana, o por inhibición competitiva de los receptores para péptido del hospedero, las lectinas son un ejemplo de péptido que están presentes en animales, bacterias y virus, tienen la capacidad de adherirse a carbohidratos específicos. (Sharon N. y Ofek I. 2002).

Por su parte plantas como *Plantago brasiliensi* y *Plantago major* mostraron actividad antiviral contra la cepa RC/79 del virus del herpes. (Zanon SM, et al 1999.)

Asimismo *Ocimum basilicum*, también tiene efectos inhibitorios sobre *Fusarium spp.* (Rai M. K., et al 1999) y *Aspergillus ochraceus* (Basilico M. Z., y Basilico J. C. 1999), así como propiedades antibióticas contra patógenos comunes de alimentos como, *Lactobacillus curvatus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Lachowicz K. J., et al 1998).

Otra planta con actividad antimicrobiana es *Rosa canina*, ya que en extractos acuosos, etanólicos y de petróleo mostraron actividad antibiótica contra cepas de *Candida albicans*, el compuesto activo encontrado fue un flavonoide (Trovato A, et al 2000).

También *Larrea tridentata* tiene actividad antimicrobiana, antifúngica (Verastegui M. A., et al 1996) y antiviral contra el HIV-tipo I (Gnabre J. N., et al 1995.) Es una planta hepatotóxica pero que en dosis pequeñas puede ser administrada (Heron S. y Yarnell E. 2001).

3. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos y acuosos de las hojas de *Ocimum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata* tienen efecto sobre parámetros biológicos tales como funciones *in vitro* de los linfocitos T, crecimiento tumoral *in vitro* y actividad antibiótica de *Candida albicans*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los extractos metanólicos y acuosos de algunas plantas del noreste de México sobre las funciones *in vitro* de linfocitos de rata, efecto citotóxico sobre las líneas celulares L1210, L5178-Y, U937, L929 y el efecto antibiótico contra *Candida albicans*.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de los extractos metanólicos y acuosos de *Ocimum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata en presencia o ausencia del mitógeno Concanavalina A (Con A) *in vitro*.
- Evaluar el efecto de los extractos metanólicos y acuosos de *Ocimum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata* sobre el crecimiento tumoral *in vitro* de una serie de líneas celulares: L1210, L5178-Y, U937 y L929.
- Determinar la actividad antibiótica de los extractos metanólicos y acuosos de *Ocimum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata* en el crecimiento de *Candida albicans*.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 ORIGEN DEL MATERIAL.

5.1.1 REACTIVOS.

La solución de penicilina-estreptomicina, L-glutamina, Fungizone y medios RPMI 1640 se obtuvo de Life Technologies (Grand Island, NY). El suero fetal bovino (SFB), metanol, buffer de lisis para eritrocitos, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), Concanavalina A (CON A), filtros millipore de 0.22 μm se compraron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El ácido acético, hidróxido de sodio, el medio YMB (Yeast Medium Broth) y el agar bacteriológico se obtuvieron de CTR Scientific (Monterrey, N. L.). El ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, de J.T Baker (Monterrey, N. L.) Las líneas celulares y *Candida albicans* cepa 32354 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD).

5.1.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratas macho Sprague-Dawley de 6 a 8 semanas (200-220 g) para la determinación de proliferación de linfocitos tímicos se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24° C, bajo un ciclo de luz-oscuridad (fase lumínica 07:00-19:00 horas), y se les proporcionó agua y alimento *ad limitum*. Se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, IN).

5.1.3 LINEAS CELULARES

La líneas celulares se obtuvieron de la ATCC y se utilizó RPMI completo (10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 0.5 % de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de Fungizone) como medio de propagación.

La línea celular L1210 es un linfoblasto murino, el cultivo fue establecido a partir de un tumor inducido con metilcolantreno de una hembra *Mus musculus* de 8 semanas, crece en forma de suspensión (ATCC, 1994).

La línea celular L5178Y-R es un linfoblastoma murino, se obtuvo a partir de un tumor tímico inducido en un ratón DBA/2 con metilcolantreno. Se adaptó el tumor a una suspensión de líneas celulares llamada L5178Y (ATCC, 1994).

La línea L929 es un fibrosarcoma murino, fue una de las primeras cadenas establecidas con cultivos continuos, la clona 929 fue la primera línea clonada, la clona madre L se derivó de un tejido adiposo areolar subcutáneo de cultivos de ratón macho de 100 días, crece en cultivo de forma adherente. (ATCC, 1994).

La línea U937 es un linfoma histiocítico humano, se estableció a partir de células malignas de una efusión pleural de un hombre caucásico de 37 años con un linfoma histiocítico difuso; crece en cultivo en forma de suspensión, es una de las pocas líneas celulares que expresan muchas de las características monocíticas exhibidas por células de origen histiocítico. (ATCC, 1994).

5.2 VIABILIDAD CELULAR

El empleo de MTT ha mostrado que es posible medir tanto la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad sobre células normales. La reducción de sales de tetrazolio por microorganismos se ha descrito anteriormente (Thom S. M., et al). Mosmann describió un método basado sobre la descomposición de la sal de tetrazolium (MTT) por la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas; el anillo de tetrazolium de MTT es abierto y es reducido azul formazán. Dando como resultado un cambio de color, la intensidad de este refleja la actividad enzimática de las células vivas la cual puede ser medida espectrofotométricamente (Huissain, R. F., et al 1993).

5.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se colectaron hojas de *Ocimum basilicum*, *Rosa sp.*, *Plantago virginica*, *Persea americana* y *Larrea tridentata*, se secaron en una incubadora a 37° C, durante 24- 48 h, las hojas secas fueron pulverizadas.

5.3.1 EXTRACTOS METANOLICOS

Se tomaron 4.3 g del pulverizado en una tela tipo gasa, se colocó en un vaso de precipitado con 80 ml de metanol absoluto y se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Se centrifugó el extracto metanólico a 2 800 rpm durante 15 min, para la obtención de un sobrenadante, el cual fue depositado en 1 ml en tubos epcendorff previamente pesados y fueron secados al vacío, se pesaron los epcendorff, para obtener el peso seco, el extracto seco se disolvió en 300 µl de metanol y 700 µl medio de cultivo RPMI completo, posteriormente fueron filtrados. Se preparó una solución stock y se ajustó el tratamiento a una concentración de 0.5 mg/ml en medio RPMI completo y 1 mg/ml en caldo YM.

5.3.2 EXTRACTOS ACUOSOS

Se extrajeron tipo infusiones de la siguiente manera: se tomó 1g del pulverizado, se vertió sobre 50 ml de agua a 100° C, se dejó reposar 10 min tapados con papel aluminio posterior a esto, se coló para eliminar el pulverizado y se centrifugó a 2 800 rpm durante 15 min para obtener el sobrenadante, el cual se colocó en alícuotas de 1 ml en viales de vidrio previamente pesados para liofilizarlos, después se pesó para obtener peso seco, y se resuspendió en 300 µl de agua y 700 µl RPMI completo, se filtraron para preparar una solución stock y se ajustó a una concentración de 0.5 mg/ml en medio RPMI completo y 1 mg/ml en caldo YM .

5.4 PRUEBAS QUÍMICAS

5.4.1 PRUEBAS PARA FLAVONOIDES.

- Prueba del amoniacaco acuoso. Se resuspendieron 2-3 mg del extracto seco en 1 ml de amoniacaco acuoso. La prueba se consideró positiva con una variación en el color:

- a) Flavonas y/o flavonoles viran a amarillo
- b) Chalconas y/o auronas viran a rojo o amarillo
- c) Antocianinas viran a rojo intenso

- Prueba del hidróxido de sodio. Se disolvieron 2-3 mg del extracto seco en 0.5 ml de agua y se añadió 0.5 ml de hidróxido de sodio acuoso en solución. Prueba positiva:

- a) Flavonas y flavonoles viran a amarillo
- b) Isoflavonas viran a rojo
- c) Chalconas viran a púrpura o rojizo
- d) Antocianinas viran a azul

- Prueba de Shinoda. Se disolvieron 2-3 mg del extracto seco en 1 ml de metanol, se añadió 30-35 mg de magnesio y 50 µl de ácido clorhídrico concentrado. Prueba positiva:

- a) Flavonas viran a color naranja
- b) Flavononas viran a color rojo
- c) Flavonoles viran a color rojo azulado
- d) Flavonoles o xantonas viran a color violeta

- Prueba del ácido sulfúrico. Se disolvió una muestra de 2-3 mg del extracto seco en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Prueba positiva:

- a) Flavonas viran a color amarillo, naranja o guinda
- b) Chalconas y auronas viran a color guinda o rojo azulado

5.4.2 PRUEBAS PARA SESQUITERPENLACTONAS

- Prueba del clorhidrato de hidroxilamina. Se disolvieron 2-3 mg del extracto seco en 1 ml de etanol. Se añadieron 50 µl de solución 2N de clorhidrato de hidroxilamina en metanol y 50 µl de hidróxido de potasio 2N en metanol. La mezcla se calentó a ebullición (baño de agua a 100° C) por 1-2 min, se enfrió, con hielo durante 15 min y se aciduló con 50 µl de ácido clorhídrico 0.5 N, y se añadieron 100 µl de cloruro férrico al 1%. La prueba se consideró positiva con la presencia de coloración violácea.

- Prueba de Baljet. Solución A: 1g de ácido pícrico en 100 ml de alcohol etílico. Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua destilada, las dos soluciones se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. A 2-3 mg del extracto seco se le añadieron 100 µl del reactivo. La prueba fue considerada positiva con la aparición de color naranja ó rojo oscuro.

5.4.3 PRUEBAS PARA COUMARINAS

- Prueba de Emmerson. Solución A: carbonato de sodio al 0.5% en agua destilada. Solución B: 4-amino-antipirina al 0.9% en agua destilada. Solución C: Ferrocianuro de potasio al 5.4% en agua destilada. Se mezclaron las 3 soluciones en volúmenes iguales y se agregaron 0.5 ml del reactivo final a la muestra previamente disuelta en 0.5 ml de agua. La prueba fue considerada positiva con la aparición de color intenso.

- Prueba del ácido clorhídrico. Se disolvieron 2-3 mg del extracto seco en hidróxido de sodio, lo cual de un color amarillo el cual desaparece con la adición de 100 µl de ácido clorhídrico concentrado.

5.4.4 PRUEBA PARA LIGNANOS

- Prueba del cloruro férrico. Se disolvieron 2-3 mg del extracto seco en 1 ml de una solución de cloruro férrico al 2.5% en etanol. La prueba fue considerada positiva con la aparición de colores intensos.

5.4.5 PRUEBAS PARA ESTEROLES.

- Prueba de Liberman-Burchard. Se mezclaron 1ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfriaron a 0° C durante 15 min y se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico. 1 ml de este reactivo se puso en contacto con 2-3 mg del extracto seco. La prueba fue considerada positiva con la aparición de color (azul, verde, rojo ó naranja).
- Prueba de Rosenheim. Se disolvió el extracto seco en 1 ml cloroformo y se le agregó 0.5 ml de ácido tricloroacético al 90% en agua. La prueba fue considerada positiva con la aparición de color violeta.

5.4.6 PRUEBAS PARA SAPONINAS Y SAPOGENINAS

- Prueba de Libermann-Burchard. Se disolvió el extracto seco en 1ml de cloroformo para añadir el reactivo que consta de 50 µl de ácido sulfúrico en una mezcla de 1ml de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo; la aparición de cualquier color en el lapso de 1h fue considerada positiva.
- Prueba de Salkowski. A 2-3 mg del extracto seco se le agregaron 100 µl de cloroformo más 100 µl de ácido sulfúrico concentrado; la prueba fue considerada positiva con la aparición de color café rojizo.

5.4.7 PRUEBAS PARA CARBOHIDRATOS

- Prueba de Molish. Se disolvieron 5 mg de α -naftol en 0.5 ml de etanol, de 2-5 mg del extracto seco se le agregaron 200 µl de la solución de α -naftol y por la pared del tubo se agregó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un anillo violeta fue considerada como positiva.

5.4.8 PRUEBAS PARA ALCALOIDES.

- Prueba de Mayer. Se disolvieron 1.36g de cloruro de mercurio (II) en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua. Se mezclan ambas soluciones y se aforaron a 100 ml, 2-3 mg del extracto seco se disolvieron en 1ml de agua (para

los extractos acuosos) o 1 ml de metanol (para los extractos metanólicos) y se aciduló con 50 µl ácido clorhídrico 3.7 %. Se añadieron 50 µl del reactivo. La prueba fue considerada positiva con la aparición de un precipitado.

5.5 DETERMINACIÓN DE PARAMETROS INMUNES *IN VITRO*

5.5.1 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATA

Las ratas se mataron por asfixia con CO₂, inmediatamente después se extrajo el timo de las ratas el cual se maceró con medio RPMI 1640 obteniéndose una suspensión celular la cual se lavó por medio de centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, dos veces con RPMI 1640 (Coll J. M. 1993).

5.5.2 PRUEBA DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS.

La suspensión de linfocitos de timo se disolvió en medio RPMI completo y se ajustó a 1.25×10^7 células/ml y se depositó en alícuotas de 80 µl en placas de 96 pozos de fondo plano (COSTAR, Corning Inc, NY) las cuales contenían cultivos por triplicado, donde previamente se agregó 100 µl del tratamiento ó 100 µl de medio RPMI completo (el cual sirvió como control) y se agregaron 20 µl del mitógeno Con A a una concentración óptima de 2.4 µg/ml o 20 µl de medio (el cual sirvió como control no estimulado)teniendo un volumen final de 200 µl. Se incubaron por 44 h a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire. Posteriormente se adicionaron 20 µl a cada pozo de MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml y se incubó el cultivo por 4 h, y posteriormente se le agregaron 100 µl de amortiguador de lisis celular (SDS al 20% en 50% de DMF) a todos los pozos y se incubó por 16 h. Se leyeron las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540 nm en un lector de microplacas (BIO TEK Instruments Inc. Modelo EL311).

5.6 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL *IN VITRO*

De los cultivos de las líneas celulares se tomó una alícuota y se lavó una vez con RPMI 1640 por medio de centrifugación a 1 800 rpm por 10 min y esto se resuspendió en medio RPMI completo y se ajustó a 5×10^4 células/ml, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano en alícuotas de 100 μ l donde previamente se colocarán 100 μ l de los tratamientos ó 100 μ l de medio RPMI completo (como control de crecimiento), posterior a esto se incubaron los cultivos durante 44 h a 37° C en una atmósfera de CO₂ y 95% de aire, a cabo de este tiempo se colocaron 20 μ l de MTT a una concentración de 0.5 mg/ml y se incubaron 4 h adicionales y se añadió 100 μ l de amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incubó por 16 h y se determinaron las densidades ópticas a 540 nm en el lector de microplacas.

5.7 DETERMINACION DEL EFECTO ANTIMICOTICO SOBRE *Candida albicans*

Se cultivó *Cándida albicans* en agar YM, se incubó 24 h a 37° C, se tomó una colonia y se resuspendió en caldo YM, se ajustó la cantidad de levaduras a 1×10^3 células/ml en una cámara de Neubauer. La suspensión de levaduras se depositó en alícuotas de 50 μ l en placas de 96 pozos de fondo plano donde previamente se agregaron 50 μ l del tratamiento ó 50 μ l de caldo YM y se incubaron por 21- 24 h a 37° C. Posteriormente se adicionaron 10 μ l a cada pozo de MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml, y se incubó el cultivo por 4 h, y posteriormente se le agregaron 50 μ l de amortiguador de lisis celular a todos los pozos y se incubó por 16 - 21 h. Se leyeron las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 540 nm en el lector de microplacas (Gómez-Flores R., et al 1995).

5.8 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm S. E. M. de triplicados por tratamiento de un experimento representativo. El nivel de significancia de la diferencia entre el tratamiento será evaluado mediante la prueba de *t* de Student *($P \leq 0.005$) y ANNOVA.

6. RESULTADOS

6.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE RATA *IN VITRO*.

Para la evaluación del efecto de los extractos acuosos y metanólicos sobre la proliferación de linfocitos, se empleó el diseño experimental antes descrito (capítulo 5.5), de esta manera se obtuvo la respuesta de linfocitos residentes y linfocitos activados con Con A utilizando varias concentraciones del extracto.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto metanólico de *Ocimum basilicum* estimuló la proliferación de linfocitos tímicos residentes y preactivados con Con A a la concentración subóptima de 2.4 µg/ml. Las concentraciones a las que se observó un efecto significativo de proliferación de linfocitos activados con Con A fueron, 62.3, 125 y 250 µg/ml con índices de proliferación (IP) de 1.128 ($p>0.05$), 1.175 ($p>0.01$) y 1.423 ($p<0.05$) (Fig. 6, Tabla 2).

Con el extracto acuoso de *Ocimum basilicum* se observó un efecto de estimulación de la proliferación a un mayor grado sobre los linfocitos estimulados con Con A y residentes. En los linfocitos estimulados se observó linfoproliferación significativa en las concentraciones de 62.5, 125 y 250 µg/ml con IP de 1.223 ($p<0.01$), 1.348 ($p<0.001$) y 1.789 ($p<0.05$) respectivamente. (Fig. 7, Tabla 3)

Con el extracto metanólico de *Plantago virginica* se observó una linfoproliferación mayor en los linfocitos residentes que en los estimulados por Con A. Las concentraciones 62.5, 125 y 250 µg/ml del extracto estimularon significativamente la proliferación de linfocitos activados, con IP de 1.088($p<0.05$), 1.267 ($p<0.05$) y 1.501 ($p<0.05$). (Fig. 6, Tabla 4).

Por el contrario se observó que el extracto acuoso de *Plantago virginica* inhibió la proliferación de linfocitos activados y con Con A, mientras que dicho

extracto activó la proliferación de los residentes en las últimas 2 concentraciones probadas. Este extracto a las concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5 y 1.215 mostró una inhibición significativa de la proliferación de linfocitos activados con IP 0.919 ($p < 0.05$), 0.895 ($p < 0.05$), 0.884 ($p < 0.05$), 0.878 ($p < 0.05$), 0.908 ($p < 0.001$) y 1.215 ($p < 0.05$) respectivamente mientras que a la máxima concentración probada 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hubo una estimulación de la proliferación con un IP de 1.215 ($p < 0.05$). (Fig. 7 Tabla 5).

El extracto metanólico de *Rosa sp.* no tuvo efecto de estimulación significativa de la proliferación sobre linfocitos activados con Con A, comparado con el control, por el contrario este extracto activó la linfoproliferación de célula residentes a concentraciones altas. (Fig. 6, Tabla 6).

Además se observó que el extracto acuoso de *Rosa sp.* activó la linfoproliferación de células activadas con Con A, en forma similar a la de linfocitos residentes. Este extracto a la concentración de 3.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibió significativamente la proliferación de linfocitos activados con IP de 0.940 ($p < 0.05$) y a concentraciones altas de 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con IP de 1.010 ($p < 0.05$), 1.388 ($p < 0.01$) y 1.790 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 7, Tabla 7).

El extracto metanólico de *Persea americana* no tuvo efecto significativo sobre la proliferación de linfocitos activados con Con A ni sobre los linfocitos residentes (Fig. 8, Tabla 6).

Sin embargo el extracto acuoso de *Persea americana* si fue capaz de activar la proliferación de linfocitos activados y residentes. Las concentraciones de 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de este extracto estimuló la proliferación de linfocitos activados con IP de 1.080 ($p < 0.01$), 1.194 ($p < 0.01$), 1.382 ($p < 0.05$), respectivamente en cambio a la concentración de 3.91 mostró una inhibición significativa de la proliferación con IP de 0.930 ($p < 0.001$). (Fig. 7, Tabla 9).

El extracto acuoso de *Larrea tridentata* no mostró efecto significativo sobre la proliferación de linfocitos activados, solo a la concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ activó la proliferación de linfocitos residentes. (Fig. 7, Tabla 10).

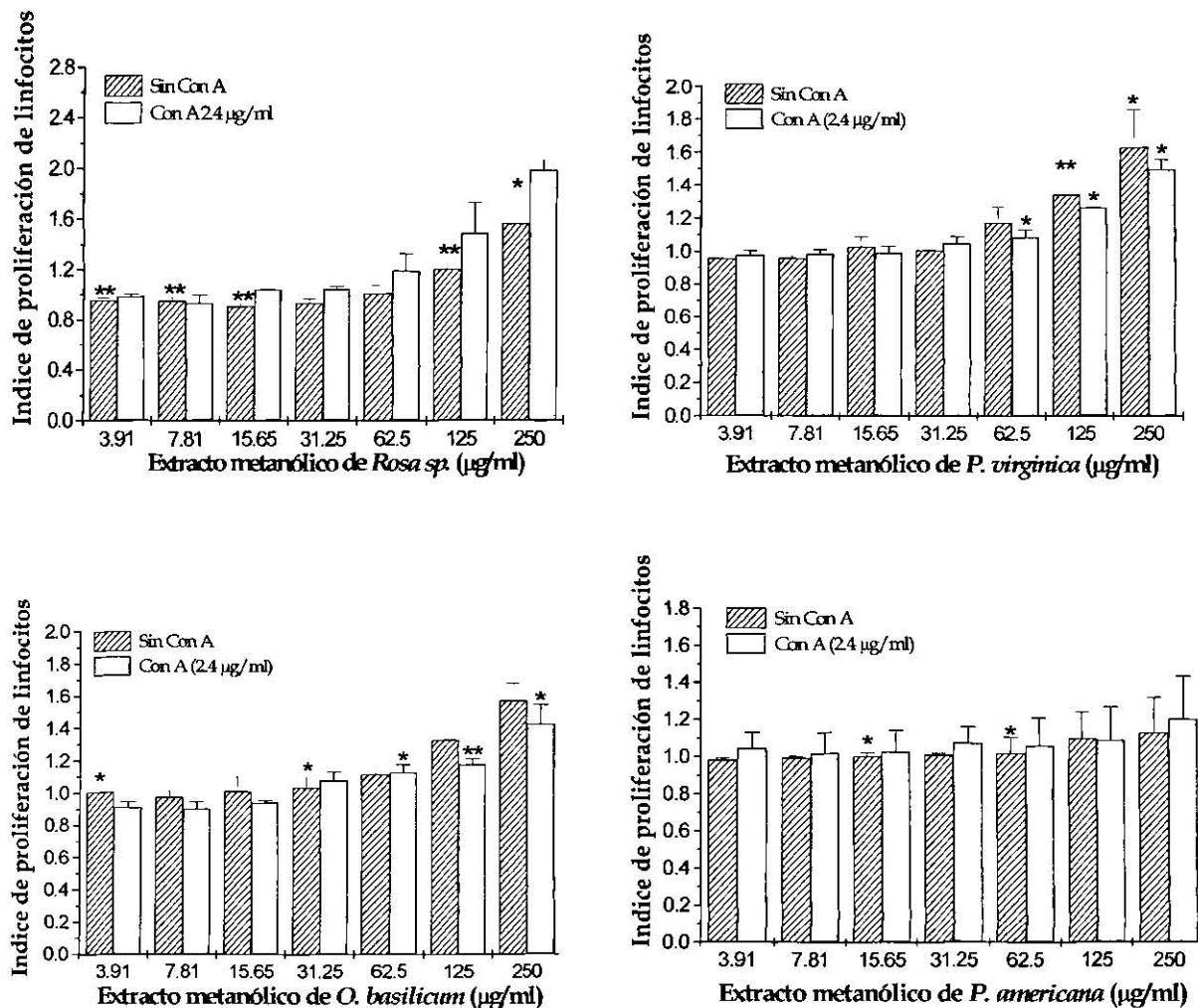


Figura 6. Efecto de los extractos metanólicos sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata estimulados con Con A. Después de matar a la rata por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se preparó una suspensión unicelular al disgregar el timo en RPMI 1649, las células se ajustaron a una concentración de 1.25x10⁷ cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas. *p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el control no tratado.

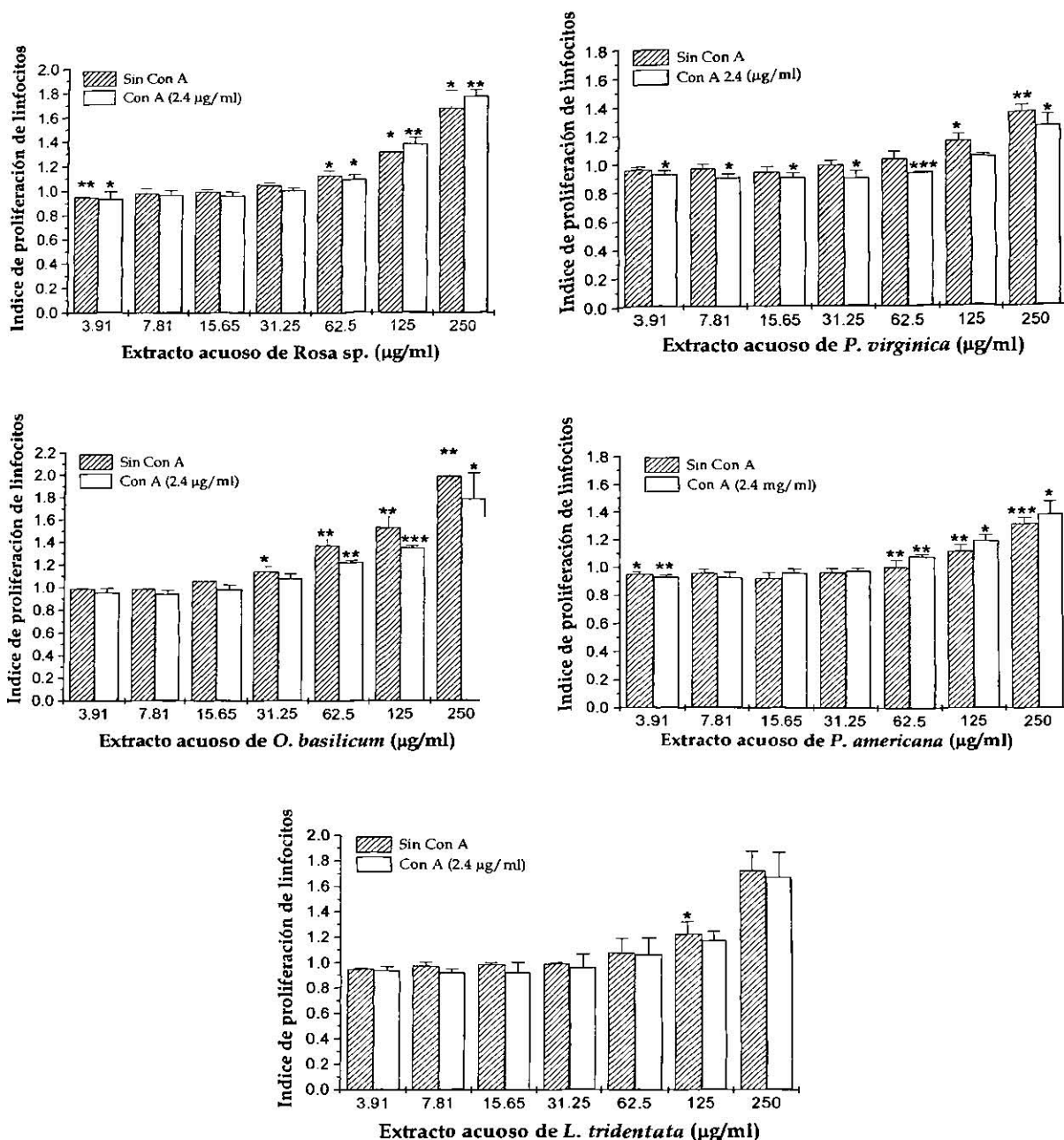


Figura 7. Efecto de los extractos acuosos sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata. Después de matar a la rata por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se preparó una suspensión unicelular al disgregar el timo en RPMI 1640, las células se ajustaron a una concentración de 1.25x10⁷ cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el control no tratado.

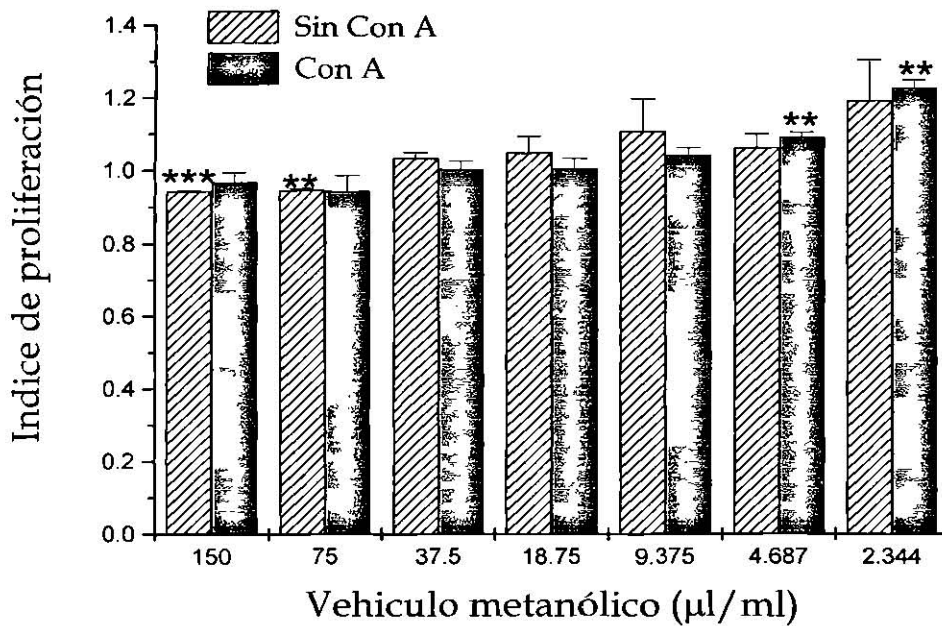


Figura 8. Efecto del vehículo metanólico sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo de rata. Después de matar a la rata por asfixia con CO₂, el timo se removió inmediatamente. Se preparó una suspensión unicelular al disgregar el timo en RPMI 1640, las células se ajustaron a una concentración de 1.25x10⁷ cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de metanol disuelto en medio RPMI 1640 a concentraciones de 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.687, 2.344 µl/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los valores obtenidos se ajustaron con respecto a los tratamientos de extractos metanólicos para obtener el efecto neto sobre la proliferación de linfocitos. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas. El valor de absorbancia (540) del grupo control fue de 0.586, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control). ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparado con el control no tratado.

Tabla 2. Efecto del extracto metanólico de *Ocimum basilicum* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	----	0.941 ± 0.013	0.952 ± 0.003	0.928 ± 0.028	
	2.4	0.892 ± 0.021	1.012 ± 0.030	0.962 ± 0.032	
3.91	----	0.848 ± 0.014	1.000 ± 0.010	0.965 ± 0.047	1.008 *
	2.4	0.784 ± 0.016	1.126 ± 0.043	0.948 ± 0.033	0.913
7.81	----	0.848 ± 0.042	0.972 ± 0.006	0.933 ± 0.031	0.977
	2.4	0.770 ± 0.035	1.132 ± 0.033	0.944 ± 0.024	0.904
15.65	----	0.928 ± 0.029	1.066 ± 0.008	0.904 ± 0.011	1.012
	2.4	0.850 ± 0.054	1.212 ± 0.008	0.931 ± 0.049	0.942
31.25	----	1.001 ± 0.054	1.062 ± 0.004	0.950 ± 0.023	1.033 *
	2.4	1.010 ± 0.002	0.995 ± 0.002	1.028 ± 0.008	1.080
62.5	----	1.025 ± 0.070	1.188 ± 0.020	0.985 ± 0.017	1.116
	2.4	1.050 ± 0.027	1.176 ± 0.019	1.079 ± 0.036	1.128 *
125	----	1.248 ± 0.165	1.344 ± 0.034	1.244 ± 0.012	1.328
	2.4	1.016 ± 0.013	1.129 ± 0.006	1.213 ± 0.041	1.175 **
250	----	1.807 ± 0.084	1.479 ± 0.000	1.657 ± 0.019	1.570
	2.4	1.287 ± 0.012	1.163 ± 0.030	1.683 ± 0.011	1.423 *

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 3. Efecto del extracto acuoso de *Ocimum basilicum* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	-----	1.134 ± 0.005	0.968 ± 0.020	1.003 ± 0.042	
	2.4	1.187 ± 0.053	0.915 ± 0.004	1.112 ± 0.017	
3.91	-----	1.118 ± 0.011	0.946 ± 0.020	1.008 ± 0.034	0.990
	2.4	1.118 ± 0.035	0.826 ± 0.006	1.146 ± 0.004	0.958
7.81	-----	1.058 ± 0.037	0.966 ± 0.037	1.035 ± 0.012	0.988
	2.4	1.098 ± 0.039	0.818 ± 0.006	1.123 ± 0.007	0.943
15.65	-----	1.144 ± 0.05	1.012 ± 0.027	1.120 ± 0.018	1.058
	2.4	1.114 ± 0.044	0.879 ± 0.000	1.178 ± 0.051	0.986
31.25	-----	1.258 ± 0.011	1.049 ± 0.058	1.234 ± 0.039	1.142 *
	2.4	1.281 ± 0.068	0.930 ± 0.015	1.286 ± 0.006	1.083
62.5	-----	1.467 ± 0.025	1.312 ± 0.045	1.467 ± 0.033	1.371 **
	2.4	1.452 ± 0.040	1.095 ± 0.016	1.392 ± 0.020	1.223 **
125	-----	1.515 ± 0.063	1.539 ± 0.052	1.661 ± 0.027	1.528 **
	2.4	1.568 ± 0.048	1.233 ± 0.013	1.532 ± 0.036	1.348 ***
250	-----	2.102 ± 0.044	2.251 ± 0.046	1.786 ± 0.057	1.987 **
	2.4	2.036 ± 0.058	2.026 ± 0.016	1.602 ± 0.040	1.789 *

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

***p< 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 4. Efecto del extracto metanólico de *Plantago virginica* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de Proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	-----	1.111 ± 0.001	0.507 ± 0.001	0.896 ± 0.009	
	2.4	1.073 ± 0.004	0.664 ± 0.006	0.827 ± 0.012	
3.91	-----	1.111 ± 0.008	0.995 ± 0.001	0.961 ± 0.014	0.961
	2.4	0.947 ± 0.008	1.042 ± 0.014	1.014 ± 0.005	0.980
7.81	-----	1.030 ± 0.033	0.983 ± 0.014	0.957 ± 0.017	0.961
	2.4	0.956 ± 0.004	1.040 ± 0.042	1.019 ± 0.003	0.987
15.65	-----	1.050 ± 0.010	1.148 ± 0.048	0.996 ± 0.019	1.032
	2.4	0.950 ± 0.005	1.211 ± 0.033	1.041 ± 0.004	0.995
31.25	-----	1.059 ± 0.012	0.997 ± 0.026	1.016 ± 0.015	1.007
	2.4	1.001 ± 0.013	1.022 ± 0.031	1.102 ± 0.003	1.051
62.5	-----	1.122 ± 0.030	1.362 ± 0.024	1.091 ± 0.021	1.175
	2.4	1.034 ± 0.049	1.111 ± 0.026	1.142 ± 0.005	1.088*
125	-----	1.191 ± 0.019	1.597 ± 0.042	1.222 ± 0.023	1.345**
	2.4	1.264 ± 0.036	1.129 ± 0.003	1.270 ± 0.020	1.267*
250	-----	1.353 ± 0.015	2.225 ± 0.026	1.502 ± 0.015	1.630*
	2.4	1.641 ± 0.028	1.115 ± 0.011	1.527 ± 0.032	1.501*

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 5. Efecto del extracto acuoso de *Plantago virginica* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	-----	0.772 ± 0.012	0.525 ± 0.003	0.499 ± 0.006	
	2.4	0.791 ± 0.009	0.658 ± 0.030	0.578 ± 0.021	
3.91	-----	0.981 ± 0.010	0.943 ± 0.007	0.932 ± 0.004	0.952
	2.4	0.962 ± 0.015	0.876 ± 0.001	0.920 ± 0.024	0.919*
7.81	-----	0.933 ± 0.008	1.012 ± 0.005	0.926 ± 0.012	0.957
	2.4	0.940 ± 0.018	0.851 ± 0.014	0.895 ± 0.026	0.895*
15.65	-----	0.898 ± 0.006	0.876 ± 0.019	0.991 ± 0.014	0.922
	2.4	0.868 ± 0.017	0.843 ± 0.041	0.942 ± 0.027	0.884*
31.25	-----	0.923 ± 0.017	1.017 ± 0.043	0.954 ± 0.006	0.965
	2.4	0.865 ± 0.009	0.808 ± 0.024	0.961 ± 0.014	0.878*
62.5	-----	0.933 ± 0.026	1.095 ± 0.004	0.975 ± 0.002	1.001
	2.4	0.911 ± 0.014	0.902 ± 0.032	0.911 ± 0.020	0.908***
125	-----	1.044 ± 0.036	1.193 ± 0.004	1.109 ± 0.017	1.115*
	2.4	1.040 ± 0.019	1.004 ± 0.031	1.003 ± 0.024	1.015
250	-----	1.255 ± 0.023	1.397 ± 0.008	1.292 ± 0.009	1.314**
	2.4	1.360 ± 0.008	1.121 ± 0.014	1.165 ± 0.006	1.215*

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p<0.01 comparado con el control no tratado

***p<0.0001 comparado con el control no tratado

Tabla 6. Efecto del extracto metanólico de *Rosa sp.* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de Proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	-----	1.009 ± 0	0.799 ± 0.027	0.965 ± 0.026	
	2.4	0.953 ± 0.002	0.672 ± 0.004	0.925 ± 0.001	
3.91	-----	0.995 ± 0.044	0.924 ± 0.015	0.940 ± 0.045	0.953**
	2.4	1.017 ± 0.052	0.98 ± 0	0.961 ± 0	0.988
7.81	-----	0.944 ± 0.025	1.002 ± 0.034	0.911 ± 0.016	0.952**
	2.4	0.0998 ± 0	0.998 ± 0.007	0.801 ± 0.023	0.932
15.65	-----	0.933 ± 0.044	0.924 ± 0.035	0.863 ± 0.017	0.906**
	2.4	1.036 ± 0.003	1.038 ± 0.011	0.868 ± 0.027	1.037
31.25	-----	0.921 ± 0.005	0.996 ± 0.018	0.886 ± 0.031	0.934
	2.4	1.026 ± 0.012	1.067 ± 0.019	0.833 ± 0.026	1.047
62.5	-----	0.967 ± 0.013	1.143 ± 0.044	0.913 ± 0.003	1.008
	2.4	1.050 ± 0.031	1.325 ± 0.019	0.897 ± 0.007	1.188
125	-----	1.211 ± 0.048	1.372 ± 0.040	1.023 ± 0.014	1.202**
	2.4	1.241 ± 0.015	1.735 ± 0.018	0.952 ± 0.055	1.488
250	-----	1.475 ± 0.030	1.943 ± 0.026	1.153 ± 0.020	1.569*
	2.4	1.259 ± 0.048	2.721 ± 0.047	1.055 ± 0.016	1.995

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 7. Efecto del extracto acuoso de *Rosa sp.* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de Proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	—	0.776 ± 0.017	0.970 ± 0.001	0.700 ± 0.013	
	2.4	0.770 ± 0.041	0.740 ± 0.038	0.715 ± 0.027	
3.91	—	0.959 ± 0.002	0.945 ± 0.027	0.945 ± 0.008	0.950**
	2.4	0.911 ± 0.022	0.948 ± 0.022	0.961 ± 0.012	0.940*
7.81	—	0.954 ± 0.015	0.994 ± 0.004	0.991 ± 0.003	0.980
	2.4	1.012 ± 0.063	0.999 ± 0.05	0.894 ± 0.037	0.968
15.65	—	1.009 ± 0.021	1.020 ± 0.007	0.967 ± 0.027	0.998
	2.4	0.965 ± 0.027	1.004 ± 0.027	0.927 ± 0.042	0.966
31.25	—	1.075 ± 0.010	1.075 ± 0.001	1.010 ± 0.041	1.053
	2.4	0.983 ± 0.016	1.022 ± 0.017	1.033 ± 0.015	1.013
62.5	—	1.131 ± 0.018	1.057 ± 0.017	1.199 ± 0.050	1.129
	2.4	1.026 ± 0.006	1.126 ± 0.043	1.137 ± 0.037	1.010*
125	—	1.306 ± 0.013	1.160 ± 0.005	1.493 ± 0.051	1.132*
	2.4	1.312 ± 0.024	1.365 ± 0.024	1.487 ± 0.016	1.388*
250	—	1.822 ± 0.004	1.402 ± 0.030	1.844 ± 0.008	1.690*
	2.4	1.800 ± 0.054	1.873 ± 0.054	1.699 ± 0.020	1.790*

^a Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de proliferación expresa el crecimiento observado encada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p<0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 8. Efecto del extracto metanólico de *Persea americana* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de Proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	----	0.833 ± 0.014	0.911 ± 0.001	0.530 ± 0.044	
	2.4	0.882 ± 0.002	0.882 ± 0.002	0.437 ± 0.003	
3.91	----	0.873 ± 0.030	1.049 ± 0.028	0.892 ± 0.049	0.983
	2.4	1.001 ± 0	0.935 ± 0.047	1.206 ± 0	1.047
7.81	----	0.987 ± 0.024	1.069 ± 0.023	1.000 ± 0.018	0.994
	2.4	0.905 ± 0	0.905 ± 0	1.239 ± 0.006	1.016
15.65	----	0.983 ± 0.029	1.068 ± 0	1.016 ± 0.012	0.999*
	2.4	0.912 ± 0.001	0.912 ± 0.001	1.250 ± 0.005	1.025
31.25	----	1.001 ± 0.044	1.260 ± 0.011	1.014 ± 0.013	1.008
	2.4	1.029 ± 0.021	0.956 ± 0.070	1.240 ± 0.015	1.075
62.5	----	0.931 ± 0.022	1.074 ± 0.003	1.105 ± 0.024	1.018*
	2.4	0.906 ± 0	0.906 ± 0	1.355 ± 0.013	1.056
125	----	0.952 ± 0.022	1.010 ± 0.005	1.237 ± 0.014	1.094
	2.4	0.918 ± 0	0.896 ± 0.014	1.445 ± 0.010	1.087
250	----	1.076 ± 0.009	0.897 ± 0.012	1.459 ± 0.027	1.128
	2.4	1.111 ± 0.028	1.111 ± 0.027	1.803 ± 0.014	1.201

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado encada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 9. Efecto del extracto acuoso de *Persea americana* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de Proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	----	1.077 ± 0.005	1.124 ± 0.046	0.982 ± 0.014	
	2.4	1.076 ± 0.020	1.044 ± 0.034	1.214 ± 0.021	
3.91	----	0.975 ± 0.024	0.935 ± 0.024	0.962 ± 0.028	0.957*
	2.4	0.925 ± 0.028	0.953 ± 0.028	0.916 ± 0	0.930**
7.81	----	0.981 ± 0.053	0.897 ± 0.040	1.031 ± 0.023	0.970
	2.4	0.949 ± 0.009	0.978 ± 0.009	0.861 ± 0.003	0.928
15.65	----	0.999 ± 0.012	0.958 ± 0.012	0.981 ± 0.076	0.979
	2.4	0.920 ± 0.008	0.980 ± 0.008	1.020 ± 0.033	0.961
31.25	----	1.077 ± 0.012	1.033 ± 0.012	0.957 ± 0.068	1.023
	2.4	1.013 ± 0.044	0.972 ± 0.031	0.953 ± 0.065	0.978
62.5	----	1.123 ± 0.006	1.077 ± 0.006	1.158 ± 0.009	1.119**
	2.4	1.076 ± 0.012	1.109 ± 0.012	1.058 ± 0.014	1.080**
125	----	1.160 ± 0.010	1.201 ± 0.012	1.235 ± 0.043	1.199**
	2.4	1.215 ± 0.055	1.251 ± 0.055	1.120 ± 0.030	1.194*
250	----	1.508 ± 0.010	1.446 ± 0.010	1.500 ± 0.010	1.485***
	2.4	1.450 ± 0.030	1.494 ± 0.030	1.188 ± 0.020	1.382*

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p<0.01 comparado con el control no tratado

***p<0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 10. Efecto del extracto acuoso de *Larrea tridentata* sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata

Índice de Proliferación ^a					
Concentración (µg/ml)	Con A (µg/ml)	Exp1 ^b	Exp2 ^b	Exp3 ^b	Media ^c
Control (D.O) ^d	-----	1.020 ± 0.024	0.723 ± 0.006	0.897 ± 0.018	
	2.4	1.044 ± 0.039	0.815 ± 0.023	0.835 ± 0.012	
3.91	-----	0.956 ± 0.008	0.947 ± 0.003	1.017 ± 0.019	0.973
	2.4	0.970 ± 0.037	0.912 ± 0.017	0.974 ± 0.033	0.952
7.81	-----	0.949 ± 0.026	1.002 ± 0.006	0.959 ± 0.008	0.970
	2.4	0.950 ± 0.042	0.894 ± 0.021	1.006 ± 0.011	0.950
15.65	-----	0.999 ± 0.011	0.980 ± 0.014	1.012 ± 0.024	0.997
	2.4	1.003 ± 0.018	0.844 ± 0.012	0.964 ± 0.005	0.937
31.25	-----	0.997 ± 0.045	0.982 ± 0.013	0.938 ± 0.031	0.972
	2.4	1.061 ± 0.047	0.855 ± 0.012	0.978 ± 0.019	0.965
62.5	-----	1.184 ± 0.020	0.963 ± 0.009	1.001 ± 0.020	1.049
	2.4	1.190 ± 0.036	0.930 ± 0.008	0.950 ± 0.017	1.024
125	-----	1.313 ± 0.030	1.126 ± 0.016	1.145 ± 0.021	1.195*
	2.4	1.335 ± 0.050	1.001 ± 0.017	1.203 ± 0.049	1.180
250	-----	1.866 ± 0.018	1.568 ± 0.014	0.735 ± 0.014	1.390
	2.4	1.863 ± 0.041	1.474 ± 0.029	0.811 ± 0.014	1.383

^a El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de proliferación por lo tanto es igual a 1

^b Representan la media ± el error estándar de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^c Representa la media de 3 experimentos representativos con 3 repeticiones cada uno.

^d Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

6.2 EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LINEAS CELULARES

Se determinó el efecto directo de los extractos acuosos y metanólicos sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas y murinas *in vitro*, con la metodología que se describió anteriormente (capítulo 5.6).

El extracto metanólico de *O. basilicum* inhibió el crecimiento *in vitro* de líneas celulares U937, L1210 y L929. Por el contrario, este extracto a concentraciones de 31.25, 62.5, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incrementó la proliferación de las células L5178Y con índices de crecimiento de 1.091 ($p < 0.05$), 1.213 ($p < 0.01$), 1.188 ($p < 0.001$) y 1.258 ($p < 0.01$) respectivamente. (Fig. 11, Tabla 11). Con respecto a la línea celular U937 inhibió el crecimiento a concentraciones bajas 3.91, 7.81, 15.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cuyos IC fueron de 0.896 ($p < 0.05$), 0.893 ($p < 0.01$) y 0.916 ($p < 0.05$) respectivamente, sin embargo se observó un efecto contrario a concentraciones de 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con IC de 1.056 ($p < 0.05$), 1.213 ($p < 0.05$), 1.730 (0.01) respectivamente (Fig. 9, Tabla 11). Este extracto a concentraciones 7.81 y 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostró inhibición del crecimiento de células L1210 con IC de 0.883 ($p < 0.01$) y 0.937 ($p < 0.01$) respectivamente, pero a la concentración de 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estimuló el crecimiento con IC de 1.019 ($p < 0.01$) y 1.485 ($p < 0.05$) (Fig. 10, Tabla 11). El extracto tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de la línea celular L929 a la mayoría de las concentraciones 3.91, 7.81, 15.65, 31.25 y 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con IC de 0.952 ($p < 0.05$), 0.926 ($p < 0.05$), 0.909 ($p < 0.01$), 0.911 ($p < 0.001$), 0.941 ($p < 0.05$), pero a la concentración más alta de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ el extracto estimuló el crecimiento con un IC de 1.129 ($p < 0.05$) (Fig. 12, Tabla 11).

También el extracto acuoso de *O. basilicum* inhibió el crecimiento de la línea celular U937 a la concentración de 7.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con un IC de 0.889 ($p < 0.01$), por el contrario a las concentraciones de 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incrementó el IC a 1.367 ($p < 0.05$) y 1.848 ($p < 0.05$) respectivamente (Fig. 9, Tabla 12). Por otro lado estimuló el crecimiento de células L1210 a la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con IC de 1.834

($p < 0.05$) (Fig. 10, Tabla 12). También incrementó el crecimiento de células L5178Y a concentraciones de 31.25, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ con los siguientes IC 1.216 ($p < 0.05$) 1.460 ($p < 0.001$), 1.798 ($p < 0.01$) y 2.416 ($p < 0.01$) (Fig. 11, Tabla 12).

Por su parte el extracto metanólico de *Plantago virginica* inhibió el crecimiento de las líneas celulares U937, L929 y L5178Y. A la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$ inhibió el crecimiento de la línea celular U937 con un IC de 0.949 ($p < 0.05$), mientras que a las concentraciones de 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ aumentó el crecimiento con IC de 1.097 ($p < 0.05$), 1.125 ($p < 0.05$) y 1.540 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 9, Tabla 13). Respecto a las células L929 el extracto tuvo un efecto citotóxico a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25 y 62.5 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 0.935 ($p < 0.001$), 0.920 (0.01), 0.903 ($p < 0.05$), 0.881 ($p < 0.001$) y 0.887 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 12, Tabla 13). En cambio sobre la línea celular L1210 a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ estimuló el crecimiento con IC de 1.417 ($p < 0.05$) (Fig. 10, Tabla 13). Este extracto aumentó el crecimiento de células L5178Y, a la concentración de 125 con un IC de 1.050 ($p < 0.001$), pero a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ inhibió el crecimiento teniendo un IC de 0.980 ($p < 0.001$) (Fig. 11, Tabla 13).

El extracto acuoso de *P. virginica* inhibió el crecimiento de células U937 a las concentraciones de 7.81 y 31.25 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 0.901 ($p < 0.05$) y 0.905 ($p < 0.05$) respectivamente, mientras que a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ tuvo el efecto contrario, ya que incrementó el IC a 1.295 ($p < 0.05$) (Fig. 9, Tabla 14). Con la línea celular L5178Y este extracto aumentó el crecimiento a concentraciones altas de 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.260 ($p < 0.01$) y 1.485 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 11, Tabla 14).

De acuerdo a los resultados, el extracto metanólico de *Rosa sp.* inhibió el crecimiento de las líneas tumorales U937, L1210 y L929. Pero frente a la línea L5178Y estimuló el crecimiento, dependiente a la concentración del extracto a partir de 31.25 hasta 250 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.093, 1.235, 1.330 y 1.390 respectivamente ($p < 0.05$ para todos los casos) (Fig. 11, Tabla 15). A la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$ este extracto inhibió el crecimiento de células U937

con un IC de 0.976 ($p < 0.05$) y por el contrario a concentraciones mayores de 31.25 hasta la máxima probada de 250 $\mu\text{g/ml}$ estimuló el crecimiento con IC altos de 1.157 ($p < 0.05$), 1.364 ($p < 0.01$), 1.596 ($p < 0.01$), 2.185 ($p < 0.001$) respectivamente (Fig.9, Tabla 15). Este extracto se comportó de manera similar con la línea celular L1210, ya que inhibió el crecimiento a la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$, con un IC de 0.879 ($p < 0.05$), pero a la concentración más alta 250 $\mu\text{g/ml}$, estimuló el crecimiento con un IC de 1.777 ($p < 0.05$) (Fig. 10 Tabla 15). Sobre las células L929 el extracto inhibió el crecimiento a las concentraciones menores de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 0.908, 0.895, 0.912, 0.915 ($p < 0.05$ para todos los casos) respectivamente, sólo a la concentración máxima de 250 $\mu\text{g/ml}$ estimuló el crecimiento, con un IC de 1.251 ($p < 0.05$) (Fig. 12, Tabla 15).

De igual modo el extracto acuoso de *Rosa sp.* mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de las líneas U937 (IC= 0.887), L1210 (IC=0.979) y L929 (IC=0.943) en la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$ para los tres casos), a la concentración de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ también tuvo efecto de inhibición significativa de la línea celular U937 con un IC de 0.927 ($p < 0.01$), pero a concentraciones altas de 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ mostró la capacidad de estimular el crecimiento de estas células con IC de 1.130 y 1.472 respectivamente ($p < 0.05$ para ambos) (Fig. 9, Tabla 16). Comportamiento similar con las células L5178Y (Fig. 11) y L1210 (Fig. 10), que a la concentración máxima de 250 $\mu\text{g/ml}$ estimuló el crecimiento con un IC de 1.078 y 1.598 respectivamente ($p < 0.05$) (Tabla 16).

El extracto metanólico de *P. americana* mostró actividad inhibitoria del crecimiento sobre las línea celular U937, L1210 y L929. Sobre la línea celular U937 fue citotóxico este extracto a la concentración de 3.91 hasta 125 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 0.920, 0.904, 0.882, 0.891, 0.898, 0.940, respectivamente ($p < 0.05$ para todos los casos) (Fig. 9 Tabla 17). Sobre la línea L1210 a la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$ presentó inhibición con un IC de 0.980 ($p < 0.005$). También, éste extracto a las concentraciones de 7.81 y 31.25 $\mu\text{g/ml}$ mostró inhibición de crecimiento sobre células L929 con IC de 0.861 y 0.875 respectivamente (para ambos $p < 0.01$) (Fig. 12

Tabla 17). En cambio con la línea celular L5178Y tuvo actividad estimulante del crecimiento a concentraciones altas de 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.079 ($p < 0.05$), 1.000, 1.000 ($p < 0.01$ para ambos) (Fig. 11, Tabla 17).

Por otro lado el extracto acuoso de *P. americana* presentó actividad antitumoral con las líneas celulares U937 y L1210. A la concentración de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ el extracto acuoso mostró inhibición significativa del crecimiento de células U937 con IC de 0.960 ($p < 0.01$) y un efecto contrario a las concentraciones más elevadas de 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.130 y 1.472 ($p < 0.01$ para ambos) respectivamente (Fig. 9, Tabla 18). El extracto a la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$ inhibió el crecimiento de células L1210 con un IC de 0.948 ($p < 0.05$) y un efecto de estimulación del crecimiento a concentración alta, 250 $\mu\text{g/ml}$, con un IC de 1.318 ($p < 0.05$) (Fig. 10 Tabla 18). Por otro lado el extracto estimuló el crecimiento de células L5178Y a concentraciones altas a partir de 31.25 hasta 250 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.123, 1.261, 1.573, 1.981 ($p < 0.01$ para todos los casos) respectivamente (Fig. 11 Tabla 18). Con la línea L929 también tuvo efecto de estimulación del crecimiento a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ IC de 1.178 ($p < 0.05$) (Fig. 12 Tabla 18).

El extracto acuoso de *L. tridentata* mostró actividad antitumoral frente a la línea U937 solamente a la concentración de 3.91 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 0.955 ($p < 0.05$), en cambio a la concentraciones de 31.25 y 250 $\mu\text{g/ml}$ se observó estimulación del crecimiento con IC de 1.012 ($p < 0.005$) y 1.584 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 9 Tabla 19). Este extracto también presentó actividad dual sobre las células L1210 a concentraciones bajas de 31.21 $\mu\text{g/ml}$ presentó inhibición marginal del crecimiento con IC de 0.980 ($p < 0.05$) y a la concentración alta de 250 $\mu\text{g/ml}$ se observó proliferación de células L1210 con un IC de 1.534 ($p < 0.01$) (Fig. 10 Tabla 19). El extracto estimuló el crecimiento de la línea L5178Y en las concentraciones altas a partir de 31.25 hasta 250 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.127 ($p < 0.01$), 1.334 ($p < 0.01$), 1.756 ($p < 0.001$) y 2.266 ($p < 0.01$) (Fig. 11 Tabla 19). También estimuló el crecimiento de la línea L929 a la concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ con IC de 1.147 ($p < 0.005$) (Fig. 12 Tabla 19).

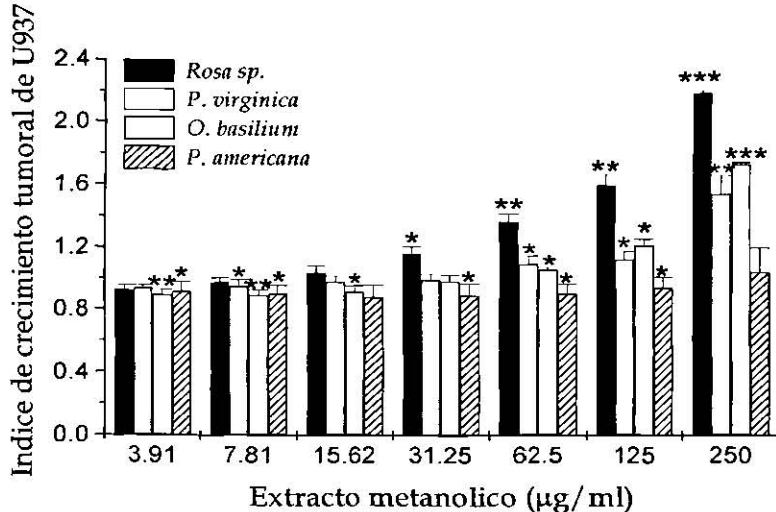
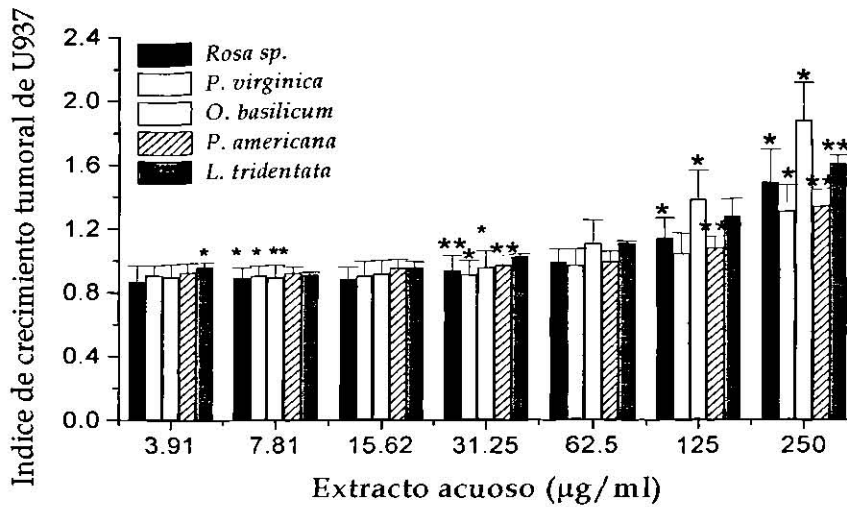


Figura 9. Efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular U937. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 comparado con el control no tratado

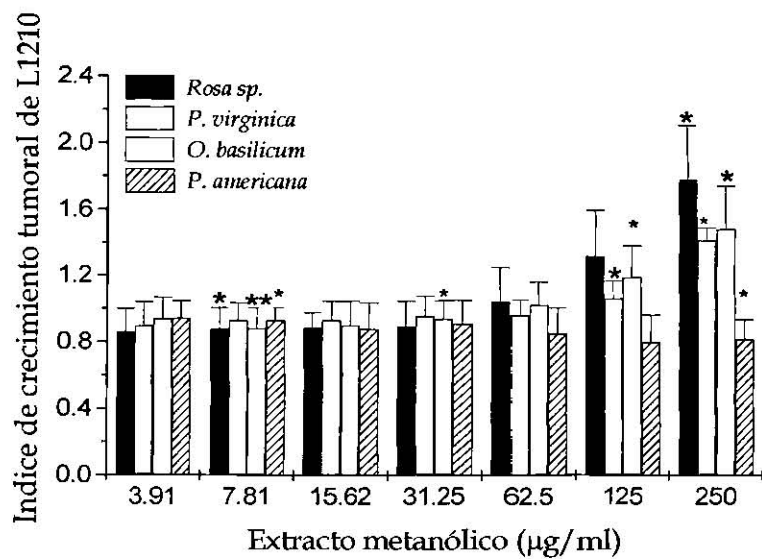
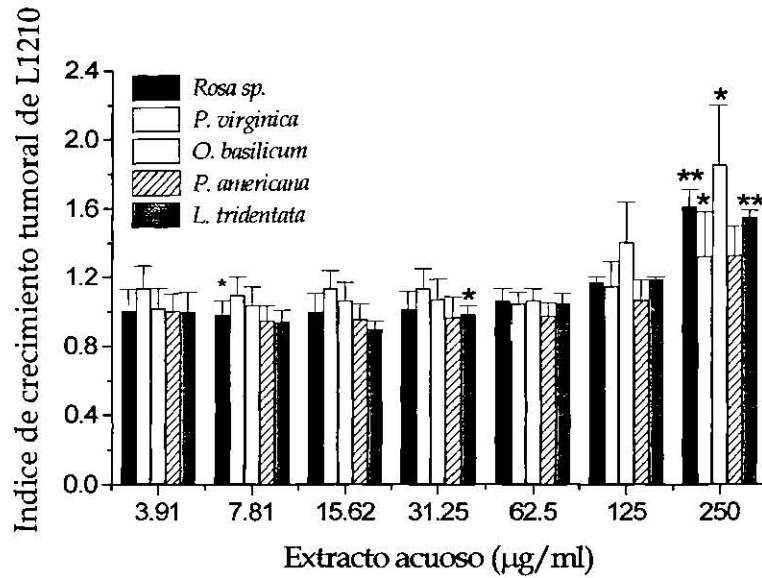


Figura 10. Efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular L1210. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, ** p < 0.01 comparado con el control no tratado.

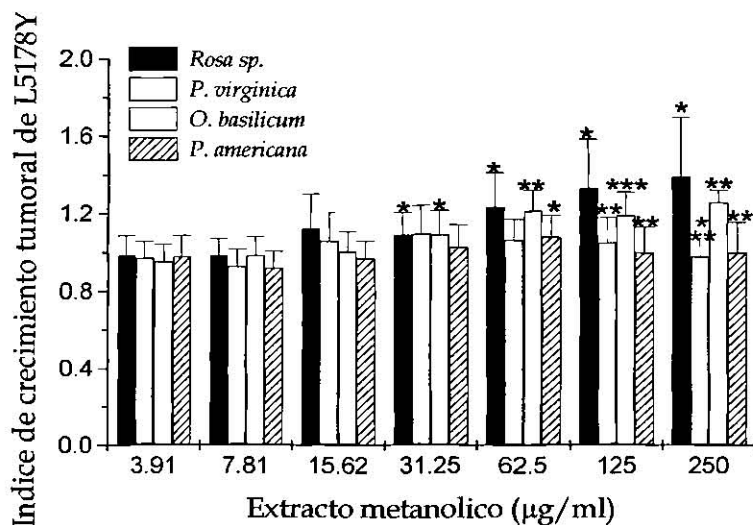
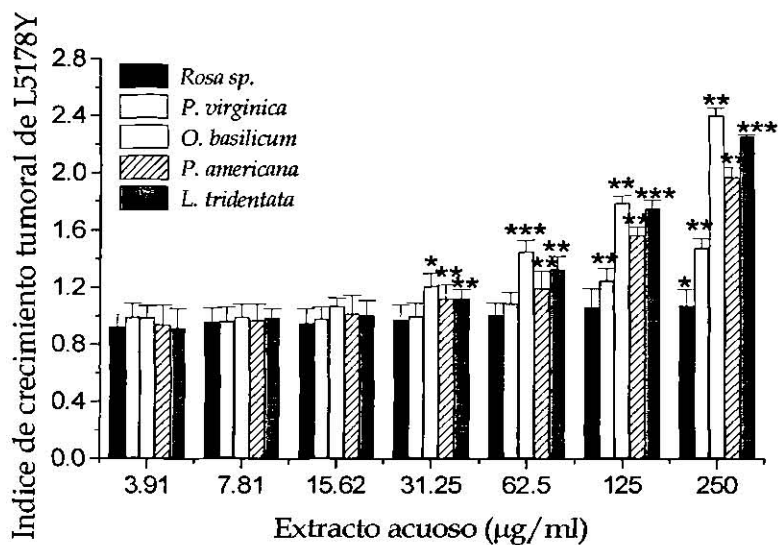


Figura 11. Efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular L5178Y. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, ** p < 0.01. ***p < 0.001 comparado con el control no tratado.

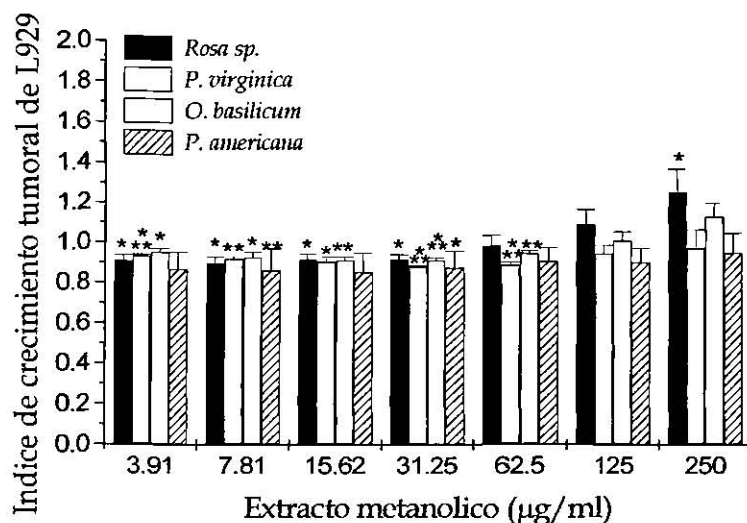
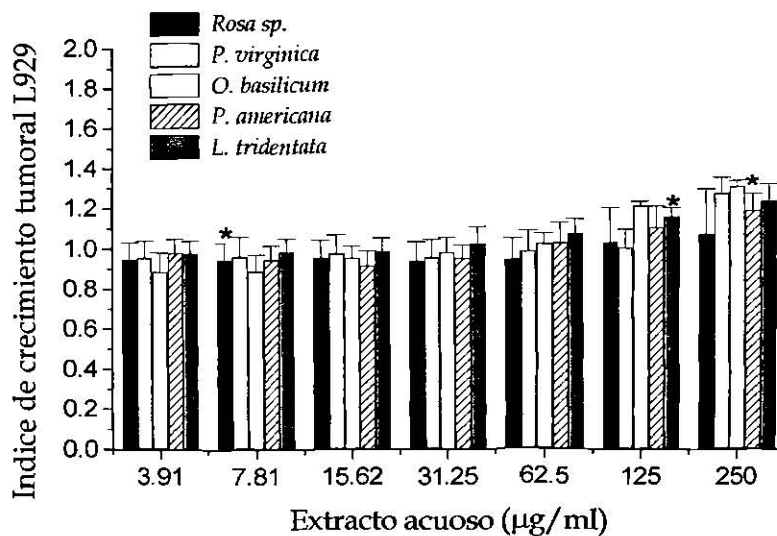


Figura 12. Efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular L929. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 3.91, 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16-21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas.

Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparado con el control no tratado

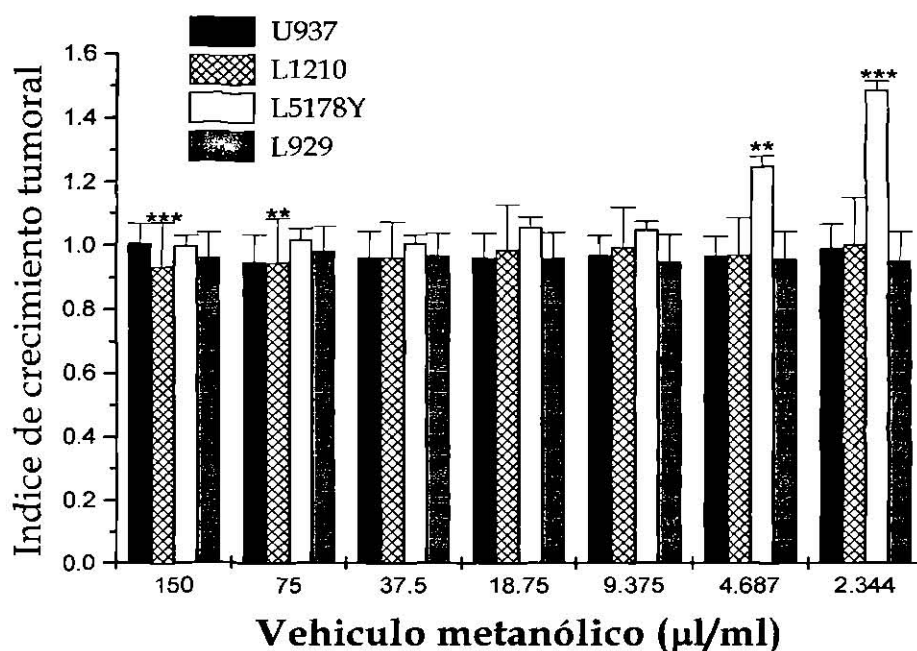


Figura 13. Efecto del vehículo metanólico sobre la viabilidad de líneas celulares. Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^4 cels/ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100 µl/pozo de metanol disuelto en RPMI 1640 a concentraciones de 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.687, 2.344 µl/ml. Se incubaron 44h a 37° C y 5% de CO₂. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 20µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 80µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C y 5% de CO₂. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los valores obtenidos se ajustaron con respecto a los tratamientos de extractos metanólicos para obtener el efecto neto sobre la proliferación de linfocitos. El valor de absorbancia del grupo control se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación (del grupo control) U937=0.877, L1210= 0.829, L5178Y=0.309, L929=0.896. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

** p < 0.01, *** p < 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 11. Efecto del extracto metanólico de *Ocimum basilicum* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	1.013 ± 0.003	0.753 ± 0.015	0.265 ± 0.001	0.868 ± 0.007
	Exp2	0.948 ± 0.007	0.789 ± 0.023	0.355 ± 0.005	0.832 ± 0.001
	Exp3	0.939 ± 0.018	1.051 ± 0.005	0.385 ± 0.002	0.867 ± 0.001
3.91	Exp1	0.938 ± 0.003	0.712 ± 0.014	0.266 ± 0.000	0.845 ± 0.009
	Exp2	0.834 ± 0.002	0.690 ± 0.010	0.369 ± 0.003	0.808 ± 0.002
	Exp3	0.828 ± 0.015	1.031 ± 0.023	0.324 ± 0.005	0.792 ± 0.002
	IC ^b	0.896*	0.939	0.953	0.952*
7.81	Exp1	0.933 ± 0.001	0.665 ± 0.012	0.265 ± 0.002	0.834 ± 0.001
	Exp2	0.818 ± 0.002	0.650 ± 0.001	0.368 ± 0.005	0.774 ± 0.002
	Exp3	0.839 ± 0.004	0.975 ± 0.006	0.356 ± 0.002	0.770 ± 0.006
	IC ^b	0.893**	0.883**	0.984	0.926*
15.65	Exp1	0.955 ± 0.002	0.665 ± 0.012	0.267 ± 0.003	0.802 ± 0.001
	Exp2	0.819 ± 0.002	0.638 ± 0.005	0.368 ± 0.002	0.749 ± 0.001
	Exp3	0.882 ± 0.002	1.026 ± 0.014	0.374 ± 0.003	0.783 ± 0.001
	IC ^b	0.916*	0.898	1.003	0.909**
31.25	Exp1	1.006 ± 0.001	0.745 ± 0.007	0.282 ± 0.001	0.792 ± 0.002
	Exp2	0.961 ± 0.000	0.687 ± 0.003	0.412 ± 0.002	0.763 ± 0.008
	Exp3	0.873 ± 0.007	0.996 ± 0.004	0.403 ± 0.002	0.785 ± 0.004
	IC ^b	0.979	0.937**	1.091*	0.911***
62.5	Exp1	1.041 ± 0.008	0.753 ± 0.006	0.335 ± 0.001	0.830 ± 0.007
	Exp2	0.993 ± 0.002	0.777 ± 0.006	0.441 ± 0.004	0.792 ± 0.001
	Exp3	1.030 ± 0.002	1.118 ± 0.007	0.444 ± 0.002	0.794 ± 0.004
	IC ^b	1.056*	1.021	1.213**	0.941*
125	Exp1	1.126 ± 0.024	0.829 ± 0.005	0.401 ± 0.006	0.934 ± 0.002
	Exp2	1.141 ± 0.003	0.888 ± 0.006	0.526 ± 0.001	0.847 ± 0.005
	Exp3	1.251 ± 0.004	1.359 ± 0.014	0.519 ± 0.001	0.809 ± 0.005
	IC ^b	1.213*	1.019**	1.188***	1.008
250	Exp1	1.677 ± 0.005	0.925 ± 0.023	0.541 ± 0.010	1.014 ± 0.005
	Exp2	1.649 ± 0.008	1.236 ± 0.020	0.596 ± 0.003	0.849 ± 0.009
	Exp3	1.690 ± 0.014	1.689 ± 0.001	0.611 ± 0.001	1.037 ± 0.005
	IC ^b	1.730**	1.485*	1.258**	1.129*

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

***p< 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 12. Efecto del extracto acuoso de *Ocimum basilicum* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.973 ± 0.001	0.684 ± 0.013	0.270 ± 0.002	0.901 ± 0.022
	Exp2	0.782 ± 0.008	0.714 ± 0.003	0.373 ± 0.001	0.889 ± 0.002
	Exp3	1.048 ± 0.004	1.045 ± 0.003	0.347 ± 0.002	1.366 ± 0.009
3.91	Exp1	0.851 ± 0.000	0.769 ± 0.005	0.271 ± 0.001	0.755 ± 0.009
	Exp2	0.701 ± 0.003	0.707 ± 0.005	0.363 ± 0.001	0.887 ± 0.003
	Exp3	0.965 ± 0.004	1.011 ± 0.007	0.343 ± 0.001	1.094 ± 0.042
	IC ^b	0.898	1.018	0.987	0.867
7.81	Exp1	0.860 ± 0.004	0.836 ± 0.010	0.268 ± 0.001	0.843 ± 0.006
	Exp2	0.694 ± 0.007	0.701 ± 0.003	0.362 ± 0.004	0.901 ± 0.003
	Exp3	0.938 ± 0.008	0.997 ± 0.002	0.355 ± 0.001	0.985 ± 0.023
	IC ^b	0.889**	1.037	0.996	0.865
15.65	Exp1	0.860 ± 0.005	0.875 ± 0.007	0.315 ± 0.002	0.910 ± 0.002
	Exp2	0.704 ± 0.004	0.708 ± 0.003	0.367 ± 0.004	0.972 ± 0.003
	Exp3	0.979 ± 0.002	1.004 ± 0.010	0.380 ± 0.004	1.123 ± 0.001
	IC ^b	0.907	1.059	1.073	0.952
31.25	Exp1	0.892 ± 0.005	0.926 ± 0.011	0.347 ± 0.003	0.913 ± 0.022
	Exp2	0.714 ± 0.003	0.682 ± 0.011	0.408 ± 0.005	1.002 ± 0.001
	Exp3	1.052 ± 0.019	0.998 ± 0.010	0.449 ± 0.003	1.170 ± 0.041
	IC ^b	0.948	1.067	1.216*	0.977
62.5	Exp1	0.994 ± 0.004	0.960 ± 0.014	0.430 ± 0.004	0.992 ± 0.004
	Exp2	0.806 ± 0.001	0.770 ± 0.003	0.507 ± 0.001	1.035 ± 0.015
	Exp3	1.269 ± 0.002	0.860 ± 0.018	0.508 ± 0.002	1.170 ± 0.041
	IC ^b	1.094	1.060	1.460***	1.013
125	Exp1	1.209 ± 0.006	1.239 ± 0.010	0.578 ± 0.011	1.310 ± 0.004
	Exp2	1.025 ± 0.002	0.782 ± 0.005	0.576 ± 0.002	1.236 ± 0.003
	Exp3	1.599 ± 0.001	1.399 ± 0.035	0.626 ± 0.013	1.248 ± 0.010
	IC ^b	1.367*	1.400	1.798**	1.202
250	Exp1	1.526 ± 0.035	1.560 ± 0.021	0.798 ± 0.007	1.399 ± 0.024
	Exp2	1.488 ± 0.008	0.972 ± 0.00	0.767 ± 0.007	1.388 ± 0.009
	Exp3	2.168 ± 0.016	1.948 ± 0.035	0.827 ± 0.008	1.303 ± 0.018
	IC ^b	1.848*	1.834*	2.416**	1.296

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

***p< 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 13. Efecto del extracto metanólico de *Plantago virginica* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	1.002 ± 0.004	0.779 ± 0.019	0.269 ± 0.001	0.849 ± 0.002
	Exp2	0.839 ± 0.002	0.653 ± 0.004	0.361 ± 0.006	0.867 ± 0.002
	Exp3	0.837 ± 0.002	1.033 ± 0.012	0.353 ± 0.003	0.861 ± 0.003
3.91	Exp1	0.868 ± 0.004	0.713 ± 0.008	0.263 ± 0.001	0.813 ± 0.001
	Exp2	0.827 ± 0.004	0.655 ± 0.001	0.333 ± 0.005	0.793 ± 0.008
	Exp3	0.824 ± 0.005	0.845 ± 0.011	0.358 ± 0.002	0.806 ± 0.002
	IC ^b	0.940	0.898	0.970	0.935***
7.81	Exp1	0.925 ± 0.004	0.674 ± 0.003	0.264 ± 0.001	0.794 ± 0.003
	Exp2	0.810 ± 0.002	0.684 ± 0.001	0.359 ± 0.003	0.804 ± 0.024
	Exp3	0.806 ± 0.005	0.935 ± 0.003	0.291 ± 0.006	0.775 ± 0.007
	IC ^b	0.949*	0.930	0.930	0.920**
15.65	Exp1	0.942 ± 0.005	0.662 ± 0.031	0.259 ± 0.002	0.743 ± 0.002
	Exp2	0.844 ± 0.005	0.680 ± 0.004	0.421 ± 0.017	0.815 ± 0.014
	Exp3	0.844 ± 0.001	0.951 ± 0.012	0.362 ± 0.009	0.771 ± 0.001
	IC ^b	0.982	0.930	1.060	0.903*
31.25	Exp1	0.950 ± 0.008	0.685 ± 0.003	0.269 ± 0.001	0.753 ± 0.005
	Exp2	0.848 ± 0.001	0.688 ± 0.004	0.430 ± 0.011	0.762 ± 0.006
	Exp3	0.852 ± 0.007	0.983 ± 0.001	0.379 ± 0.001	0.757 ± 0.003
	IC ^b	0.990	0.956	1.097	0.881***
62.5	Exp1	1.064 ± 0.002	0.704 ± 0.007	0.285 ± 0.004	0.753 ± 0.005
	Exp2	0.963 ± 0.001	0.731 ± 0.002	0.368 ± 0.001	0.762 ± 0.007
	Exp3	0.911 ± 0.005	0.939 ± 0.004	0.397 ± 0.002	0.757 ± 0.003
	IC ^b	1.097*	0.963	1.067	0.887**
125	Exp1	1.079 ± 0.028	0.779 ± 0.011	0.346 ± 0.003	0.851 ± 0.002
	Exp2	1.014 ± 0.017	0.792 ± 0.006	0.451 ± 0.003	0.844 ± 0.005
	Exp3	0.922 ± 0.004	1.045 ± 0.005	0.486 ± 0.005	0.743 ± 0.002
	IC ^b	1.125*	1.061*	1.050**	0.946
250	Exp1	1.500 ± 0.020	1.038 ± 0.019	0.403 ± 0.005	0.984 ± 0.005
	Exp2	1.462 ± 0.006	1.202 ± 0.011	0.502 ± 0.001	0.806 ± 0.004
	Exp3	1.162 ± 0.009	1.253 ± 0.008	0.481 ± 0.001	0.715 ± 0.005
	IC ^b	1.540**	1.417*	0.980***	0.972

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

***p< 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 14. Efecto del extracto acuoso de *Plantgo virginica* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.897 ± 0.004	0.844 ± 0.006	0.260 ± 0.001	0.805 ± 0.023
	Exp2	0.734 ± 0.004	0.689 ± 0.006	0.364 ± 0.001	0.969 ± 0.006
	Exp3	0.963 ± 0.002	0.684 ± 0.015	0.342 ± 0.001	0.760 ± 0.007
3.91	Exp1	0.832 ± 0.003	0.826 ± 0.006	0.258 ± 0.001	0.744 ± 0.006
	Exp2	0.678 ± 0.004	0.677 ± 0.007	0.356 ± 0.001	0.947 ± 0.003
	Exp3	0.848 ± 0.010	1.013 ± 0.012	0.344 ± 0.004	0.739 ± 0.004
	IC ^b	0.909	1.135	0.992	0.959
7.81	Exp1	0.028 ± 0.001	0.770 ± 0.019	0.248 ± 0.001	0.792 ± 0.025
	Exp2	0.674 ± 0.001	0.700 ± 0.004	0.347 ± 0.001	0.965 ± 0.003
	Exp3	0.836 ± 0.003	0.959 ± 0.010	0.342 ± 0.001	0.679 ± 0.004
	IC ^b	0.901*	1.095	0.969	0.962
15.65	Exp1	0.828 ± 0.002	0.833 ± 0.011	0.264 ± 0.001	0.838 ± 0.002
	Exp2	0.620 ± 0.008	0.707 ± 0.004	0.335 ± 0.002	0.950 ± 0.005
	Exp3	0.872 ± 0.002	0.967 ± 0.009	0.351 ± 0.001	0.679 ± 0.004
	IC ^b	0.895	1.131	0.983	0.977
31.25	Exp1	0.778 ± 0.005	0.888 ± 0.008	0.265 ± 0.001	0.851 ± 0.005
	Exp2	0.656 ± 0.004	0.674 ± 0.017	0.344 ± 0.001	0.901 ± 0.005
	Exp3	0.914 ± 0.003	0.949 ± 0.001	0.360 ± 0.002	0.664 ± 0.011
	IC ^b	0.905*	1.133	1.004	0.954
62.5	Exp1	0.849 ± 0.008	0.779 ± 0.006	0.307 ± 0.002	0.886 ± 0.003
	Exp2	0.672 ± 0.004	0.687 ± 0.007	0.364 ± 0.001	0.932 ± 0.007
	Exp3	0.971 ± 0.008	0.847 ± 0.008	0.388 ± 0.001	0.657 ± 0.003
	IC ^b	0.961	1.043	1.096	0.977
125	Exp1	0.873 ± 0.006	0.857 ± 0.004	0.353 ± 0.002	0.879 ± 0.013
	Exp2	0.721 ± 0.010	0.656 ± 0.001	0.427 ± 0.002	0.948 ± 0.001
	Exp3	1.0391 ± 0.011	1.019 ± 0.008	0.438 ± 0.004	0.696 ± 0.005
	IC ^b	1.035	1.142	1.260**	0.996
250	Exp1	1.047 ± 0.004	1.024 ± 0.013	0.451 ± 0.004	1.186 ± 0.015
	Exp2	0.926 ± 0.002	0.623 ± 0.005	0.466 ± 0.002	0.951 ± 0.001
	Exp3	1.387 ± 0.004	1.264 ± 0.002	0.519 ± 0.001	1.058 ± 0.009
	IC ^b	1.295*	1.313	1.485**	1.260

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 15. Efecto del extracto metanólico de *Rosa sp.* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.872 ± 0.003	0.750 ± 0.009	0.276 ± 0.005	0.952 ± 0.036
	Exp2	0.863 ± 0.001	0.787 ± 0.011	0.365 ± 0.001	0.931 ± 0.011
	Exp3	0.913 ± 0.009	1.019 ± 0.002	0.378 ± 0.006	0.855 ± 0.006
3.91	Exp1	0.859 ± 0.011	0.671 ± 0.007	0.271 ± 0.001	0.844 ± 0.005
	Exp2	0.759 ± 0.013	0.617 ± 0.003	0.339 ± 0.001	0.866 ± 0.001
	Exp3	0.834 ± 0.016	0.804 ± 0.040	0.393 ± 0.001	0.777 ± 0.004
	IC ^b	0.926	0.858	0.983	0.908*
7.81	Exp1	0.915 ± 0.008	0.652 ± 0.014	0.275 ± 0.002	0.807 ± 0.005
	Exp2	0.834 ± 0.023	0.634 ± 0.006	0.354 ± 0.001	0.872 ± 0.005
	Exp3	0.835 ± 0.007	0.962 ± 0.007	0.372 ± 0.004	0.772 ± 0.001
	IC ^b	0.976*	0.879*	0.982	0.895*
15.65	Exp1	0.989 ± 0.020	0.672 ± 0.009	0.272 ± 0.004	0.814 ± 0.001
	Exp2	0.851 ± 0.000	0.684 ± 0.006	0.483 ± 0.014	0.884 ± 0.001
	Exp3	0.915 ± 0.001	0.908 ± 0.015	0.389 ± 0.002	0.800 ± 0.001
	IC ^b	1.040	0.885	1.122	0.912*
31.25	Exp1	1.083 ± 0.003	0.616 ± 0.004	0.294 ± 0.001	0.876 ± 0.012
	Exp2	0.945 ± 0.018	0.655 ± 0.001	0.402 ± 0.008	0.807 ± 0.002
	Exp3	1.034 ± 0.006	1.016 ± 0.009	0.418 ± 0.001	0.823 ± 0.004
	IC ^b	1.157*	0.894	1.093*	0.915*
62.5	Exp1	1.115 ± 0.013	0.663 ± 0.002	0.300 ± 0.002	0.992 ± 0.005
	Exp2	1.240 ± 0.012	0.769 ± 0.003	0.471 ± 0.001	0.859 ± 0.005
	Exp3	1.258 ± 0.015	1.230 ± 0.016	0.487 ± 0.001	0.823 ± 0.004
	IC ^b	1.364**	1.041	1.235*	0.981
125	Exp1	1.323 ± 0.002	0.769 ± 0.001	0.364 ± 0.002	1.126 ± 0.004
	Exp2	1.375 ± 0.049	1.023 ± 0.016	0.612 ± 0.013	0.958 ± 0.005
	Exp3	1.528 ± 0.006	1.573 ± 0.025	0.636 ± 0.002	0.902 ± 0.006
	IC ^b	1.596**	1.316	1.330*	1.090
250	Exp1	1.855 ± 0.034	1.041 ± 0.013	0.435 ± 0.004	1.350 ± 0.007
	Exp2	1.986 ± 0.008	1.494 ± 0.006	0.691 ± 0.013	1.045 ± 0.014
	Exp3	1.945 ± 0.021	2.009 ± 0.005	0.786 ± 0.004	1.031 ± 0.013
	IC ^b	2.185***	1.777*	1.390*	1.251*

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

***p< 0.001 comparado con el control no tratado

Tabla 16. Efecto del extracto acuoso de *Rosa sp.* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.940 ± 0.004	0.888 ± 0.016	0.262 ± 0.001	0.924 ± 0.018
	Exp2	0.738 ± 0.003	0.715 ± 0.012	0.378 ± 0.002	0.930 ± 0.008
	Exp3	0.968 ± 0.006	1.026 ± 0.06	0.365 ± 0.002	0.752 ± 0.010
3.91	Exp1	0.853 ± 0.001	0.946 ± 0.035	0.260 ± 0.002	0.825 ± 0.022
	Exp2	0.581 ± 0.040	0.665 ± 0.012	0.307 ± 0.016	0.948 ± 0.006
	Exp3	0.857 ± 0.005	1.032 ± 0.004	0.361 ± 0.001	0.702 ± 0.001
	IC ^b	0.866	1.005	0.923	0.950
7.81	Exp1	0.849 ± 0.007	0.855 ± 0.008	0.255 ± 0.001	0.889 ± 0.005
	Exp2	0.671 ± 0.007	0.733 ± 0.004	0.345 ± 0.001	0.897 ± 0.011
	Exp3	0.827 ± 0.010	0.987 ± 0.004	0.365 ± 0.003	0.670 ± 0.002
	IC ^b	0.887*	0.979*	0.960	0.943*
15.65	Exp1	0.853 ± 0.002	0.846 ± 0.003	0.255 ± 0.001	0.906 ± 0.010
	Exp2	0.635 ± 0.007	0.715 ± 0.002	0.345 ± 0.001	0.899 ± 0.006
	Exp3	0.825 ± 0.010	1.048 ± 0.007	0.373 ± 0.004	0.679 ± 0.002
	IC ^b	0.874	0.992	0.953	0.953
31.25	Exp1	0.885 ± 0.006	0.838 ± 0.023	0.260 ± 0.001	0.934 ± 0.001
	Exp2	0.652 ± 0.001	0.767 ± 0.004	0.346 ± 0.002	0.845 ± 0.006
	Exp3	0.915 ± 0.012	1.057 ± 0.004	0.376 ± 0.001	0.653 ± 0.009
	IC ^b	0.927**	1.013	0.976	0.934
62.5	Exp1	0.884 ± 0.004	0.963 ± 0.010	0.283 ± 0.001	0.970 ± 0.006
	Exp2	0.718 ± 0.004	0.807 ± 0.007	0.352 ± 0.004	0.814 ± 0.014
	Exp3	0.979 ± 0.008	1.008 ± 0.006	0.380 ± 0.001	0.655 ± 0.002
	IC ^b	0.975	1.057	1.010	0.936
125	Exp1	1.048 ± 0.003	1.021 ± 0.017	0.269 ± 0.01	1.178 ± 0.002
	Exp2	0.790 ± 0.008	0.972 ± 0.010	0.387 ± 0.001	0.779 ± 0.002
	Exp3	1.153 ± 0.015	1.069 ± 0.012	0.415 ± 0.001	0.706 ± 0.001
	IC ^b	1.130*	1.165	1.067	1.022
250	Exp1	1.264 ± 0.010	1.340 ± 0.030	0.284 ± 0.004	1.300 ± 0.018
	Exp2	1.009 ± 0.009	1.289 ± 0.015	0.391 ± 0.008	0.671 ± 0.007
	Exp3	1.623 ± 0.020	1.573 ± 0.013	0.408 ± 0.003	0.792 ± 0.002
	IC ^b	1.472*	1.598*	1.078*	1.060

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 17. Efecto del extracto metanólico de *Persea americana* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.914 ± 0.007	0.873 ± 0.031	0.262 ± 0.001	0.750 ± 0.008
	Exp2	0.893 ± 0.031	0.718 ± 0.018	0.364 ± 0.004	1.127 ± 0.004
	Exp3	1.048 ± 0.017	1.139 ± 0.001	0.363 ± 0.001	0.850 ± 0.008
3.91	Exp1	0.879 ± 0.011	0.824 ± 0.010	0.253 ± 0.004	0.684 ± 0.007
	Exp2	0.772 ± 0.028	0.593 ± 0.012	0.353 ± 0.004	0.934 ± 0.001
	Exp3	0.975 ± 0.005	1.073 ± 0.012	0.299 ± 0.017	0.749 ± 0.008
	IC ^b	0.920*	0.943	0.979	0.869
7.81	Exp1	0.876 ± 0.015	0.842 ± 0.010	0.257 ± 0.003	0.639 ± 0.003
	Exp2	0.764 ± 0.021	0.699 ± 0.013	0.353 ± 0.002	0.969 ± 0.006
	Exp3	0.940 ± 0.006	1.029 ± 0.012	0.299 ± 0.016	0.740 ± 0.005
	IC ^b	0.904*	0.930*	0.919	0.861**
15.65	Exp1	0.876 ± 0.014	0.687 ± 0.008	0.260 ± 0.001	0.649 ± 0.007
	Exp2	0.696 ± 0.007	0.699 ± 0.009	0.350 ± 0.005	0.939 ± 0.005
	Exp3	0.948 ± 0.001	1.075 ± 0.015	0.349 ± 0.006	0.734 ± 0.014
	IC ^b	0.882*	0.876	0.970	0.851
31.25	Exp1	0.852 ± 0.008	0.742 ± 0.012	0.263 ± 0.001	0.711 ± 0.008
	Exp2	0.723 ± 0.001	0.682 ± 0.009	0.370 ± 0.001	0.939 ± 0.005
	Exp3	0.970 ± 0.002	1.086 ± 0.023	0.382 ± 0.001	0.734 ± 0.014
	IC ^b	0.891*	0.909	1.027	0.875*
62.5	Exp1	0.847 ± 0.010	0.671 ± 0.004	0.282 ± 0.003	0.809 ± 0.001
	Exp2	0.751 ± 0.002	0.703 ± 0.006	0.385 ± 0.003	0.935 ± 0.004
	Exp3	0.966 ± 0.015	1.047 ± 0.012	0.400 ± 0.001	0.727 ± 0.007
	IC ^b	0.898*	0.854	1.079*	0.906
125	Exp1	0.824 ± 0.001	0.605 ± 0.016	0.300 ± 0.004	0.801 ± 0.004
	Exp2	0.832 ± 0.001	0.729 ± 0.010	0.418 ± 0.001	0.937 ± 0.004
	Exp3	1.029 ± 0.005	1.002 ± 0.019	0.436 ± 0.004	0.720 ± 0.008
	IC ^b	0.940*	0.799	1.000**	0.902
250	Exp1	0.776 ± 0.021	0.678 ± 0.006	0.357 ± 0.004	0.834 ± 0.002
	Exp2	0.913 ± 0.001	0.778 ± 0.010	0.493 ± 0.005	1.026 ± 0.005
	Exp3	1.282 ± 0.066	0.964 ± 0.005	0.522 ± 0.004	0.725 ± 0.003
	IC ^b	1.040*	0.816	1.000**	0.948

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 18. Efecto del extracto acuoso de *Persea americana* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.784 ± 0.002	0.719 ± 0.011	0.268 ± 0.003	0.814 ± 0.014
	Exp2	0.906 ± 0.022	0.873 ± 0.004	0.405 ± 0.001	1.015 ± 0.017
	Exp3	0.975 ± 0.022	1.020 ± 0.008	0.364 ± 0.003	0.821 ± 0.001
3.91	Exp1	0.738 ± 0.006	0.709 ± 0.006	0.230 ± 0.002	0.851 ± 0.004
	Exp2	0.819 ± 0.012	0.914 ± 0.005	0.371 ± 0.002	0.978 ± 0.001
	Exp3	0.914 ± 0.009	0.999 ± 0.002	0.373 ± 0.004	0.777 ± 0.002
	IC ^b	0.927	1.003	0.939	0.983
7.81	Exp1	0.745 ± 0.004	0.704 ± 0.013	0.258 ± 0.002	0.816 ± 0.006
	Exp2	0.858 ± 0.032	0.914 ± 0.005	0.385 ± 0.004	0.947 ± 0.012
	Exp3	0.834 ± 0.006	0.999 ± 0.002	0.365 ± 0.001	0.742 ± 0.001
	IC ^b	0.914	0.948*	0.972	0.945
15.65	Exp1	0.747 ± 0.004	0.711 ± 0.008	0.266 ± 0.005	0.752 ± 0.008
	Exp2	0.883 ± 0.028	0.797 ± 0.004	0.416 ± 0.003	0.932 ± 0.006
	Exp3	0.885 ± 0.001	0.980 ± 0.016	0.377 ± 0.004	0.741 ± 0.002
	IC ^b	0.944	0.952	1.021	0.915
31.25	Exp1	0.745 ± 0.005	0.718 ± 0.008	0.322 ± 0.001	0.829 ± 0.004
	Exp2	0.884 ± 0.009	0.751 ± 0.007	0.433 ± 0.005	0.941 ± 0.015
	Exp3	0.931 ± 0.007	1.044 ± 0.004	0.410 ± 0.001	0.743 ± 0.008
	IC ^b	0.960**	0.962	1.123**	0.948
62.5	Exp1	0.775 ± 0.005	0.779 ± 0.015	0.361 ± 0.005	0.889 ± 0.002
	Exp2	0.867 ± 0.017	0.751 ± 0.007	0.470 ± 0.001	1.057 ± 0.004
	Exp3	0.0975 ± 0.005	0.974 ± 0.014	0.478 ± 0.025	0.753 ± 0.013
	IC ^b	0.982	0.973	1.261**	1.018
125	Exp1	0.837 ± 0.004	0.786 ± 0.008	0.506 ± 0.004	1.035 ± 0.007
	Exp2	0.967 ± 0.003	0.862 ± 0.008	0.564 ± 0.001	1.081 ± 0.002
	Exp3	1.046 ± 0.014	1.124 ± 0.014	0.563 ± 0.004	0.785 ± 0.017
	IC ^b	1.070**	1.061	1.573**	1.095
250	Exp1	1.035 ± 0.003	0.953 ± 0.002	0.727 ± 0.013	1.050 ± 0.001
	Exp2	1.134 ± 0.007	1.053 ± 0.016	0.647 ± 0.001	1.159 ± 0.001
	Exp3	1.357 ± 0.007	1.437 ± 0.013	0.682 ± 0.009	0.913 ± 0.004
	IC ^b	1.323**	1.318*	1.981**	1.178*

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 19. Efecto del extracto acuoso de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento *in vitro* de líneas celulares

Concentración (µg/ml)	Exp ^a	U937	L1210	L5178Y	L929
Control (D.O) ^c	Exp1	0.975 ± 0.015	0.917 ± 0.022	0.275 ± 0.001	0.825 ± 0.018
	Exp2	0.831 ± 0.042	0.675 ± 0.001	0.351 ± 0.004	0.981 ± 0.001
	Exp3	0.928 ± 0.001	1.012 ± 0.007	0.369 ± 0.006	0.782 ± 0.002
3.91	Exp1	0.914 ± 0.004	0.932 ± 0.013	0.211 ± 0.002	0.826 ± 0.010
	Exp2	0.828 ± 0.016	0.665 ± 0.011	0.342 ± 0.001	0.943 ± 0.004
	Exp3	0.870 ± 0.008	0.993 ± 0.013	0.356 ± 0.001	0.762 ± 0.050
	IC ^b	0.955*	0.994	0.913	0.978
7.81	Exp1	0.834 ± 0.001	0.793 ± 0.007	0.285 ± 0.001	0.851 ± 0.035
	Exp2	0.790 ± 0.001	0.730 ± 0.001	0.337 ± 0.005	0.943 ± 0.002
	Exp3	0.843 ± 0.008	0.922 ± 0.004	0.362 ± 0.004	0.746 ± 0.004
	IC ^b	0.903	0.939	0.989	0.981
15.65	Exp1	0.885 ± 0.004	0.760 ± 0.015	0.265 ± 0.006	0.838 ± 0.005
	Exp2	0.792 ± 0.006	0.716 ± 0.002	0.363 ± 0.001	0.953 ± 0.006
	Exp3	0.906 ± 0.004	0.859 ± 0.002	0.374 ± 0.004	0.749 ± 0.004
	IC ^b	0.945	0.897	1.006	0.981
31.25	Exp1	0.931 ± 0.001	0.924 ± 0.002	0.332 ± 0.001	0.872 ± 0.011
	Exp2	0.890 ± 0.015	0.770 ± 0.002	0.391 ± 0.001	1.005 ± 0.008
	Exp3	0.945 ± 0.008	0.856 ± 0.005	0.400 ± 0.001	0.757 ± 0.008
	IC ^b	1.012*	0.980*	1.127**	1.018
62.5	Exp1	0.975 ± 0.016	0.969 ± 0.014	0.387 ± 0.001	0.927 ± 0.013
	Exp2	0.890 ± 0.015	0.800 ± 0.004	0.449 ± 0.001	1.021 ± 0.003
	Exp3	0.945 ± 0.008	0.940 ± 0.002	0.493 ± 0.003	0.920 ± 0.007
	IC ^b	1.097	1.040	1.334**	1.063
125	Exp1	1.046 ± 0.008	1.020 ± 0.023	0.544 ± 0.001	0.993 ± 0.003
	Exp2	1.060 ± 0.002	0.995 ± 0.005	0.593 ± 0.005	1.058 ± 0.010
	Exp3	1.346 ±	1.050 ± 0.005	0.612 ± 0.013	0.920 ± 0.007
	IC ^b	0.0017 1.262	1.177	1.756***	1.147*
250	Exp1	1.357 ± 0.008	1.378 ± 0.038	0.757 ± 0.004	1.177 ± 0.017
	Exp2	1.518 ± 0.001	1.264 ± 0.008	0.744 ± 0.003	1.062 ± 0.001
	Exp3	1.456 ± 0.019	1.353 ± 0.005	0.756 ± 0.004	0.922 ± 0.003
	IC ^b	1.584**	1.534**	2.266**	1.221

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

***p< 0.001 comparado con el control no tratado

6.3 EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida albicans*

Se determinó el efecto directo de los extractos acuosos y metanólicos sobre el crecimiento en cultivo de *Candida albicans*, con la metodología que se describió anteriormente (capítulo 5.7).

El extracto metanólico de *O. basilicum* presentó un efecto de inhibición del crecimiento de la levadura a concentraciones de 31.25, 62.5 y 125 µg/ml con IC de 0.865, 0.887, 0.868 respectivamente ($p < 0.05$ para todos los casos) (Fig. 14, Tabla 21).

Por otro lado el extracto acuoso de *O. basilicum* a las concentraciones de 15.65 y 250 µg/ml mostró inhibición del crecimiento de la levadura con IC de 0.944 ($p < 0.005$) y 0.878 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 14, Tabla 22).

Pero los extractos de *P. virginica* (metanólico y acuoso) no mostraron efecto significativo sobre el crecimiento de la levadura *in vitro* (Fig. 14, Tabla 23 y 24).

Mientras que el extracto metanólico de *Rosa sp.* inhibió el crecimiento de la levadura a concentraciones de 15.65 y 250 µg/ml con IC de 0.827 y 0.870 respectivamente ($p < 0.05$ para ambos) (Fig. 14, Tabla 25).

Por su parte el extracto acuoso de *Rosa sp.* a las concentraciones de 15.65, 62.5 y 125 µg/ml mostró gran capacidad de inhibir el crecimiento de la levadura con IC de 0.801 ($p < 0.05$), 0.823 ($p < 0.01$), 0.796 ($p < 0.01$) y 0.737 ($p < 0.05$) respectivamente (Fig. 14, tabla 26).

De manera semejante el extracto metanólico de *P. americana* mostró inhibición del crecimiento a concentraciones de 31.25 y 250 µg/ml, con IC de 0.847 ($p < 0.05$), y 0.864 ($p < 0.01$) respectivamente (Fig. 14, Tabla 27).

También el extracto acuoso *P. americana* tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de la levadura a concentraciones de 15.65, 250 y 500 µg/ml con IC de 0.898 ($p < 0.01$), 0.751 ($p < 0.05$) y 0.714 ($p < 0.05$) respectivamente (Fig. 14, Tabla 28).

Por su parte el extracto acuoso de *L. tridentata* fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento de la levadura a las concentraciones de 15.65, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$, con IC de 0.888, 0.868 ($p < 0.01$ para ambos) y 0.844 ($p < 0.005$) (Fig. 14, Tabla 29).

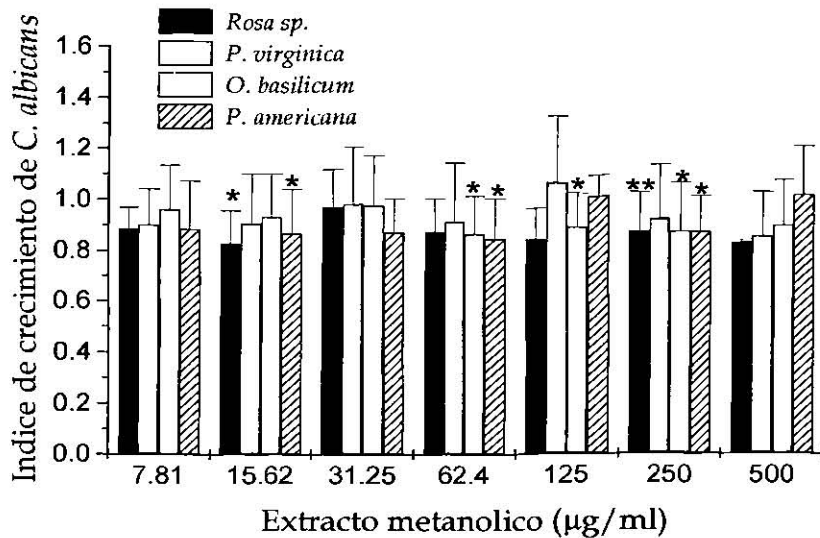
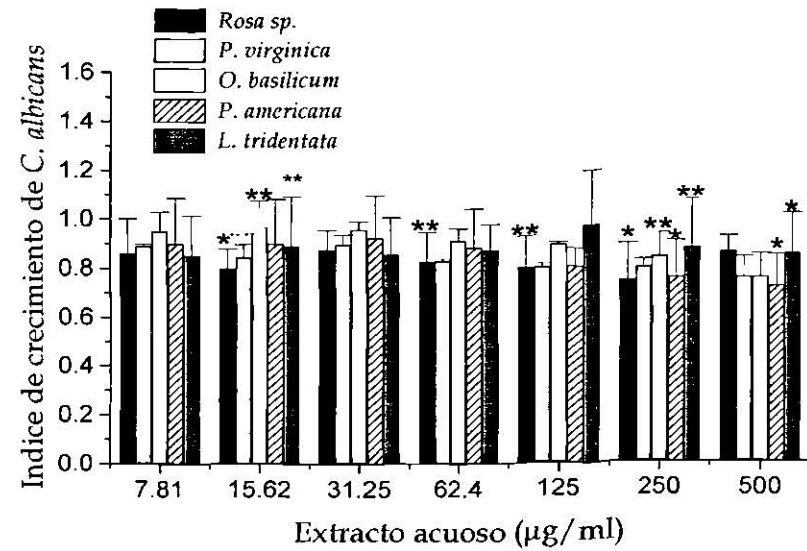


Figura 14. Efecto de los extractos sobre la viabilidad de *Candida albicans*. Las levaduras se ajustaron a una concentración de 1×10^3 cels/ml en caldo YM. Se añadieron 50 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/ml y 500 µg/ml. Se incubaron 21h a 37° C. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media ± el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, **p < 0.01 comparado con el control no tratado.

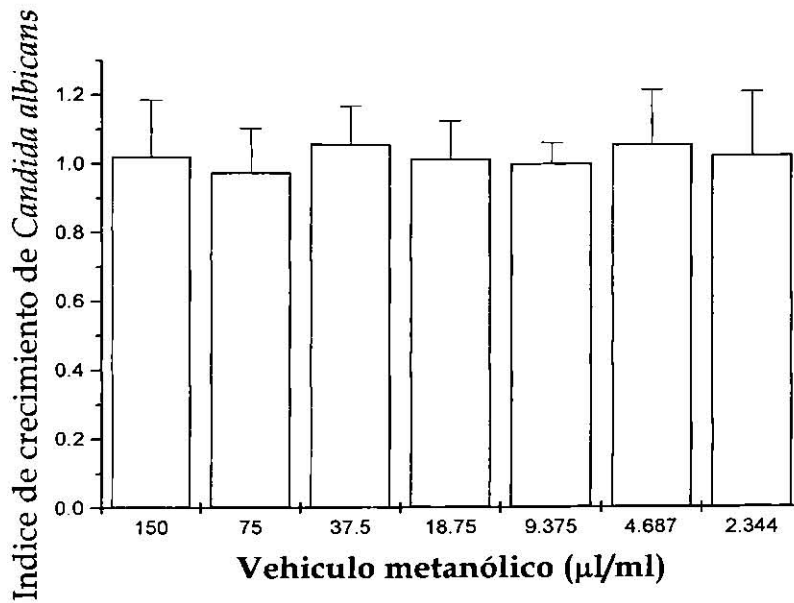


Figura 15. Efecto del vehículo metanólico sobre la viabilidad de *Candida albicans*. Las levaduras se ajustaron a una concentración de 1×10^3 cels/ml en caldo YM. Se añadieron 50 µl/pozo de los extractos a concentraciones de 7.81, 15.65, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/ml y 500 µg/ml. Se incubaron 21h a 37° C. Para la determinación de la viabilidad *in vitro* se añadieron 10 µl/pozo de MTT (5mg/ml) a cada placa y se incubaron 4 h adicionales. Se agregaron 50 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos y las placas se incubaron toda la noche (16 - 21 h) a 37° C. Las densidades ópticas se leyeron a 540 nm en un lector de microplacas. Los valores obtenidos se ajustaron con respecto a los tratamientos de extractos metanólicos para obtener el efecto neto sobre la proliferación de linfocitos. El valor de absorbancia del grupo control se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación (del grupo control) fue de 1.107. Los datos representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos representativos con 3 replicas.

*p < 0.05, **p < 0.01 comparado con el control no tratado.

Tabla 21. Efecto del extracto metanólico de *Ocimum basilicum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.556 ± 0.046	0.981 ± 0.014	1.039 ± 0.021	
7.81	1.558 ± 0.009	0.920 ± 0.019	0.955 ± 0.018	0.960
15.65	1.494 ± 0.043	1.014 ± 0.010	0.822 ± 0.002	0.931
31.25	1.447 ± 0.022	0.882 ± 0.033	1.018 ± 0.037	0.977
62.5	1.364 ± 0.006	0.777 ± 0.001	0.955 ± 0.008	0.865*
125	1.361 ± 0.002	0.834 ± 0.004	0.976 ± 0.004	0.887*
250	1.476 ± 0.021	0.728 ± 0.015	0.900 ± 0.027	0.868*
500	1.457 ± 0.058	0.749 ± 0.006	0.986 ± 0.005	0.892

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 22. Efecto del extracto acuoso de *Ocimum basilicum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.516 ± 0.046	1.053 ± 0.025	0.889 ± 0.005	
7.81	1.292 ± 0.009	1.014 ± 0.016	0.831 ± 0.025	0.907
15.65	1.368 ± 0.043	1.066 ± 0.002	0.807 ± 0.012	0.937
31.25	1.415 ± 0.022	0.888 ± 0.016	0.963 ± 0.016	0.944*
62.5	1.406 ± 0.006	0.826 ± 0.005	0.940 ± 0.005	0.917
125	1.230 ± 0.002	0.871 ± 0.002	0.853 ± 0.012	0.854
250	1.419 ± 0.021	0.920 ± 0.004	0.696 ± 0.006	0.878**
500	1.614 ± 0.021	0.841 ± 0.003	0.615 ± 0.002	0.888

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 23. Efecto del extracto metanólico de *Plantago virginica* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.644 ± 0.025	1.138 ± 0.038	0.735 ± 0.001	
7.81	1.376 ± 0.006	0.935 ± 0.001	0.857 ± 0.047	0.901
15.65	1.515 ± 0.027	0.836 ± 0.018	0.828 ± 0.004	0.904
31.25	1.662 ± 0.010	0.822 ± 0.020	0.973 ± 0.010	0.983
62.5	1.603 ± 0.015	0.753 ± 0.014	0.860 ± 0.005	0.915
125	1.851 ± 0.009	0.947 ± 0.005	0.928 ± 0.040	1.060
250	1.559 ± 0.047	0.907 ± 0.014	0.760 ± 0.009	0.917
500	1.387 ± 0.012	0.880 ± 0.006	0.720 ± 0.003	0.849

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

Tabla 24. Efecto del extracto acuoso de *Plantago virginica* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.363 ± 0.053	1.250 ± 0.025	1.031 ± 0.041	0.884
7.81	1.192 ± 0.007	1.024 ± 0.021	1.006 ± 0	0.956
15.65	1.556 ± 0.001	1.037 ± 0.003	0.893 ± 0.006	1.020
31.25	1.677 ± 0	0.965 ± 0.013	1.075 ± 0.004	0.911
62.5	1.430 ± 0.024	0.955 ± 0.005	0.933 ± 0.021	0.909
125	1.496 ± 0.070	0.891 ± 0.019	0.927 ± 0.021	0.864
250	1.344 ± 0.015	0.948 ± 0.001	0.857 ± 0.016	0.854
500	1.402 ± 0	0.971 ± 0.014	0.741 ± 0.037	0.884

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 25. Efecto del extracto metanólico de *Rosa sp.* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.489 ± 0.081	1.114 ± 0.001	0.891 ± 0.024	
7.81	1.172 ± 0.026	1.071 ± 0.004	0.844 ± 0.010	0.883
15.65	1.253 ± 0.018	0.864 ± 0.008	0.773 ± 0.007	0.827*
31.25	1.465 ± 0.035	0.906 ± 0.038	1.021 ± 0.015	0.971
62.5	1.321 ± 0.021	0.880 ± 0.025	0.854 ± 0.020	0.874
125	1.180 ± 0.004	0.922 ± 0.027	0.833 ± 0.007	0.840
250	1.357 ± 0.015	0.910 ± 0.019	0.773 ± 0.023	0.870**
500	1.972 ± 0.033	0.951 ± 0.002	0.974 ± 0.036	0.826

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 26. Efecto del extracto acuoso de *Rosa sp.* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.662 ± 0.023	1.321 ± 0.071	1.067 ± 0.001	
7.81	1.524 ± 0.031	1.075 ± 0.004	0.882 ± 0.014	0.859
15.65	1.285 ± 0.045	1.028 ± 0.005	0.931 ± 0.005	0.801*
31.25	1.389 ± 0.008	1.076 ± 0.002	1.067 ± 0.012	0.872
62.5	1.432 ± 0.049	1.002 ± 0.032	0.902 ± 0.012	0.823**
125	1.411 ± 0.092	0.965 ± 0.022	0.848 ± 0.004	0.796**
250	1.402 ± 0.034	0.783 ± 0.006	0.800 ± 0.030	0.737*
500	1.445 ± 0.108	1.153 ± 0.016	1.241 ± 0.001	0.948

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 27. Efecto del extracto metanólico de *Persea americana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.714 ± 0.052	1.211 ± 0.032	0.922 ± 0.029	
7.81	1.609 ± 0.015	0.927 ± 0.025	0.859 ± 0.030	0.882
15.65	1.551 ± 0.082	0.924 ± 0.011	0.859 ± 0.016	0.867*
31.25	1.450 ± 0.041	0.990 ± 0.027	0.915 ± 0.007	0.872
62.5	1.476 ± 0.018	0.954 ± 0.007	0.828 ± 0.007	0.847*
125	1.418 ± 0.007	1.163 ± 0.023	1.015 ± 0.013	1.006
250	1.457 ± 0.006	0.993 ± 0.006	0.875 ± 0.044	0.864*
500	1.593 ± 0.021	0.997 ± 0.007	1.114 ± 0.004	1.010

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

Tabla 28. Efecto del extracto acuoso de *Persea americana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.798 ± 0.117	1.354 ± 0.040	0.962 ± 0.008	
7.81	1.718 ± 0.094	1.107 ± 0.004	0.870 ± 0.031	0.898
15.65	1.690 ± 0	1.164 ± 0.009	0.842 ± 0.074	0.898**
31.25	1.725 ± 0	1.080 ± 0	0.981 ± 0.062	0.920
62.5	1.630 ± 0.092	1.056 ± 0.002	0.941 ± 0.027	0.882
125	1.293 ± 0.035	1.024 ± 0.015	0.980 ± 0.031	0.801
250	1.426 ± 0.019	0.856 ± 0.001	0.805 ± 0.034	0.751*
500	1.331 ± 0.009	0.829 ± 0.008	0.780 ± 0.020	0.714*

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

Tabla 29. Efecto del extracto acuoso de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*

Concentración (µg/ml)	Exp1 ^a	Exp2 ^a	Exp3 ^a	IC ^b
Control (D.O) ^c	1.884 ± 0.189	1.155 ± 0.013	1.006 ± 0.025	
7.81	1.332 ± 0.001	1.074 ± 0.007	1.038 ± 0	0.851
15.65	1.737 ± 0.062	0.950 ± 0.007	0.904 ± 0.068	0.888**
31.25	1.551 ± 0.027	0.990 ± 0.004	0.915 ± 0.044	0.854
62.5	1.429 ± 0.121	1.153 ± 0.001	0.946 ± 0.013	0.872
125	1.878 ± 0.024	1.159 ± 0	0.872 ± 0.007	0.966
250	1.699 ± 0.012	0.948 ± 0.004	0.866 ± 0.066	0.868**
500	1.581 ± 0.039	0.951 ± 0.005	0.883 ± 0.001	0.844*

^a Representan la media ± el error estándar en valores de absorbancia (540nm) de un experimento representativo con 3 repeticiones cada uno.

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con extractos) cuyo índice de crecimiento por lo tanto es igual a 1. Representa la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 repeticiones cada uno

^c Valores e absorbancia (540 nm) del grupo control, se emplea como referencia de las densidades ópticas obtenidas en la proliferación basal (grupo control).

*p<0.05 comparado con el control no tratado

**p< 0.01 comparado con el control no tratado

6.4 PRUEBAS QUIMICAS DE LOS EXTRACTOS

Se realizaron algunas pruebas bioquímicas (capítulo 5.4) para identificar los principales grupos de productos químicos de las plantas, fueron pruebas muy generales que nos dan una idea de los compuestos presentes en los extractos acuosos y metanólicos.

6.4.1 PRUEBAS QUIMICAS DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS

Todos los extractos acuosos (*Ocimum basilicum*, *Plantago virginica*, *Rosa sp.*, *Persea americana* y *Larrea tridentata*) resultaron positivos para las pruebas de flavonoides, carbohidratos y coumarinas (Tablas 30, 31, 32, 33 y 34).

Mientras que los extractos acuosos de *P. virginica*, *Rosa sp.*, *P. americana* y *L. tridentata* resultaron positivos para saponinas (Tablas 31, 32, 33 y 34).

Pero solo el extracto acuoso de *P. americana* resultó positivo para lignanos (Tabla 33).

6.4.2 PRUEBAS QUIMICAS DE LOS EXTRACTOS METANOLICOS

Todos los extractos metanólicos (*Ocimum basilicum*, *Plantago virginica*, *Rosa sp.* y *Persea americana*) resultaron positivos para lignanos, carbohidratos y alcaloides (Tablas 35, 36, 37 y 38).

Mientras que los extractos metanólicos de *O. basilicum*, *P. virginica*, *Rosa sp.* fueron positivos para flavonoides y esteroides (Tablas 35, 36 y 37).

Por otro lado los extractos metanólicos de *O. basilicum*, *P. virginica* y *P. americana* resultaron positivos para saponinas (Tablas 35, 36 y 38).

Pero solo el extracto metanólico de *Rosa sp.* resultó positivo para sequiterpenlactonas y coumarinas (Tabla 37).

Tabla 30. Extracto acuoso *Ocimum basilicum*

PRUEBA QUÍMICA	VARIACIÓN DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	no	-
Prueba del ácido sulfúrico	naranja	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	café	+
Prueba del ácido clorhídrico	desapareció el color amarillo	+
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	no	-
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	no	-
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	no	-
Prueba de Salkowski	no	-
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	no hubo precipitado	-

Tabla 31. Extracto acuoso *Plantago virginica*

PRUEBA QUIMICA	VARIACIÓN DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	no	-
Prueba del ácido sulfúrico	amarillo	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	no	-
Prueba del ácido clorhídrico	desapareció el color	+
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	no	-
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	rojo	+
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	amarillo oscuro	+/-
Prueba de Salkowski	rojo	+
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	no hubo precipitado	-

Tabla 32. Extracto acuoso *Rosa sp.*

PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	naranja	+
Prueba del hidróxido de sodio	naranja	+
Prueba de Shinoda.	no	-
Prueba del ácido sulfúrico	naranja	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	no	-
Prueba del ácido clorhídrico	desapareció el color	+
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	azul tenue	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	no	-
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	no	-
Prueba de Salkowski	café-rojizo	+
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	no hubo precipitado	-

Tabla 33. Extracto acuoso *Persea americana*

PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	rojo	+
Prueba del ácido sulfúrico	naranja	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	amarillo oscuro	+
Prueba del ácido clorhídrico	no desapareció el color	-
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	verde	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	rojo	+
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	rojo	+
Prueba de Salkowski	no	-
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	no hubo precipitado	-

Tabla 34. Extracto acuoso *Larrea tridentata*

PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	rojo	+
Prueba del ácido sulfúrico	rojo	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	rojo	+
Prueba del ácido clorhídrico	no desapareció el color	-
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	verde	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	no	-
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	no	-
Prueba de Salkowski	rojo	+
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	no hubo reacción	-

Tabla 35. Extracto metanólico <i>Ocimum basilicum</i>		
PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	no	-
Prueba del ácido sulfúrico	no	-
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	no	-
Prueba del ácido clorhídrico	no desapareció el color	-
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	verde	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	azul	+
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	azul	+
Prueba de Salkowski	no	-
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	precipitado	+

Tabla 36. Extracto metanólico *Plantago virginica*

PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniacu acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	no	-
Prueba del ácido sulfúrico	rojo	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	no	-
Prueba del ácido clorhídrico	no desapareció el color	-
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	azul	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	azul	+
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	azul	+
Prueba de Salkowski	café-rojizo	+
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	precipitado	+

Tabla 37. Extracto metanólico de *Rosa sp.*

PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	amarillo	+
Prueba del hidróxido de sodio	amarillo	+
Prueba de Shinoda.	no	-
Prueba del ácido sulfúrico	naranja	+
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	azul	+
Prueba de Baljet	naranja	+
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	marrón	+
Prueba del ácido clorhídrico	no desapareció el color	-
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	azul	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	azul	+
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	azul	+
Prueba de Salkowski	no	-
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	turbio	+/-

Tabla 38. Extracto metanólico de <i>Persea americana</i>		
PRUEBA QUIMICA	VARIACION DE COLOR	PRUEBA POSITIVA + Ó NEGATIVA -
FLAVONOIDES		
Prueba del amoniaco acuoso	no	-
Prueba del hidróxido de sodio	no	-
Prueba de Shinoda.	rojo	+
Prueba del ácido sulfúrico	no	-
SESQUITERPENLACTONAS		
Prueba del clorhidrato de hidroxilamina	no	-
Prueba de Baljet	no	-
COUMARINAS		
Prueba de Emmerson	no	-
Prueba del ácido clorhídrico	no	-
LIGNANOS		
Prueba del cloruro férrico	verde	+
ESTEROIDES		
Prueba de Liberman-Burchard	azul	+
Prueba de Rosenheim	no	-
SAPONINAS Y SAPOGENINAS		
Prueba de Libermann-Burchard	azul	+
Prueba de Salkowski	no	-
CARBOHIDRATOS		
Prueba de Molish	anillo violeta	+
ALCALOIDES		
Prueba de Mayer.	precipitado	+

7. DISCUSIÓN

Las plantas tienen una gran capacidad de producir compuestos orgánicos los cuales pueden modular funciones del ciclo celular (Kaufman P. B. et al 1999). Los fitoquímicos pueden intervenir en las respuestas biológicas, como potenciar la respuesta inmunológica, actividad anticancerígena, antimicrobiana, reparación de heridas, y muchos efectos benéficos para los cuales se han estado utilizando las plantas en la medicina tradicional (Domínguez X. A. 1973). Por todo esto el estudio de los extractos de plantas se considera con gran potencial de investigación y desarrollo farmacológico, para terapia de pacientes con compromiso inmunológico.

El estudio de los extractos de plantas tiene innumerables aplicaciones como la inmunoterapia, que se enfoca en el desarrollo de compuestos de plantas capaces de modular la respuesta inmune de pacientes inmunocomprometidos, y para ello es necesario investigar el efecto de estos sobre parámetros inmunológicos, especialmente sobre sus células efectoras, que son los macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Existen productos de plantas que pueden actuar como potenciadores del sistema inmune, por ejemplo las lectinas (Ferrante A. et al 1999). Por todo esto se están utilizando medicamentos derivados de plantas para terapia de pacientes con compromiso inmunológico.

Los extractos de plantas como *Echinacea* y *Aloe vera*, sólo por mencionar algunos, se utilizan en conjunto con otros tratamientos para estimular el sistema inmune (Kaufman P. B. et al 1999). En la actualidad se estudia gran cantidad de plantas para desarrollar compuestos naturales capaces de modular la respuesta inmune de pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo cabe destacar que se requiere el aislamiento del compuesto activo de toda la mezcla de compuestos químicos del extracto vegetal, para obtener el efecto deseado y así evitar algún efecto secundario.

El presente trabajo se enfocó en probar extractos acuosos y metanólicos de varias plantas sobre la proliferación de linfocitos de rata, lo que nos da una idea de su potencial inmunológico para posterior uso clínico. Se utilizó a la rata como modelo animal, ya que es uno de los animales más ampliamente usados en la investigación farmacológica, como herramienta para la identificación de compuestos potencialmente útiles y por su cercanía filogenética.

Como el cáncer es una de las enfermedades predominantes que afectan a la gente causando alta mortalidad, y debido a que los tratamientos convencionales causan muchos efectos colaterales, es importante evaluar terapias alternativas inocuas como el utilizar medicamentos basados en plantas.

Los fitoquímicos pueden interactuar en varias partes del ciclo celular de manera que el entendimiento de los mecanismos que regulan la transformación celular a células cancerosas podría facilitar su tratamiento (Kaufman P, B. et al 1999).

Además del potencial inmunológico de los extractos, se analizó el efecto sobre la proliferación de líneas celulares tumorales murinas y humanas *in vitro*, para tener una información más amplia sobre su actividad biológica y potencial de uso como terapia conjunta en pacientes con cáncer.

Quizás el más amplio campo de investigación de los extractos de plantas es el efecto sobre los microorganismos, ya que se conoce una vasta cantidad de compuestos vegetales que tienen actividad antimicrobiana, empezando con la producción de estos como parte de la defensa de las plantas al ataque de patógenos como virus, bacterias, hongos y protozoarios. Son compuestos que la planta sintetiza como parte normal de su ciclo celular o al ser atacada por patógenos (Murphy M. C. 1999).

En base a lo mencionado y como complemento del estudio, se analizó el efecto citotóxico de los extractos sobre la levadura *Candida albicans*, que representa un problema importante principalmente en pacientes inmunocomprometidos, esto como base para tener un perfil del potencial de uso

clínico como terapia conjunta en pacientes con este tipo de desórdenes inmunológicos.

Se ha estudiado a la planta *Ocimum basilicum* y se reporta la presencia de un terpenoide llamado eugenol como el mayor compuesto activo (Miele M. et al 2001) de la planta con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria comparada con ibuprofeno, naproxeno y aspirina. (Kelm M. A., et al 2000) en este estudio se encontró la presencia de flavonoides, lignanos, esteroides, saponinas, carbohidratos y alcaloides en el extracto acuoso (Tabla 30), mientras que en el extracto metanólico se encontraron flavonoides, coumarinas y carbohidratos (Tabla 35). Como se sabe los carbohidratos son los compuestos orgánicos más comunes en las plantas ya que funcionan como fuente de energía (Domínguez X.A 1973), y de hecho en este estudio todos los extractos resultaron positivos para la prueba de carbohidratos. En las hojas de *O. basilicum* se reportan fenilpropanoides, flavonoides, terpenos y seaquiterpenos (Grayer R. J., et al 1996, Lemberkovics E. et al 1998), las coumarinas, flavonoides y lignanos son fenilpropanoides, que fueron los compuestos encontrados en este estudio.

Los extractos acuosos y metanólicos de *O. basilicum* mostraron capacidad de estimular la proliferación (hasta un 78%) de linfocitos tímicos de rata a concentraciones altas (a partir de 62.5 µg/ml) (Tabla 2 y 3), contrario a lo reportado Courreges M. C. y Benencia F. (2002) donde el aceite de *Ocimum* no produjo ningún efecto sobre la proliferación de macrófagos peritoneales de ratón estimulados con lipopolisacárido y Con A. Asimismo se encontró que el ácido romérico presente en plantas de la familia Lamiaceas, donde se incluye el albahaca y el romero, también tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células fagocíticas murinas de riñón (Makino T., et al 2000). Pero la principal actividad que se reporta es antiinflamatoria, ya que el aceite esencial de *Ocimum* puede inhibir el aumento de la permeabilidad vascular/capilar y la migración celular después del estímulo inflamatorio (Singh S. y D. K. Majumdar 1999), y actividad inhibitoria de ciclooxigenasa (Kelm M. A., et al 2000). Posiblemente el efecto de

estimulación de la proliferación de linfocitos de rata se deba a otro compuesto presente en el extracto, por ejemplo las saponinas, como las asiladas de la planta *Quillaza saponina* se reporta que potencian la inmunidad celular medida por células T, además aumentan la producción de citocinas y la actividad citotóxica de los linfocitos T. (Behboudi S. et al 1999). Otros compuestos como los flavonoides reportan actividad inmunológica interesante, como los presentes en la planta *Epimedium hunanense* pueden potenciar la proliferación de linfocitos murinos (Liang H. R., et al 1997).

En cuanto a la actividad antitumoral de los extractos de *O. basilicum* no se puede decir que los extractos presenten absoluta toxicidad sobre las líneas celulares estudiadas, ya que tuvo efecto dual; a concentraciones bajas (< 15.65 µg/ml) el extracto metanólico (Tabla 11) presentó inhibición de la línea de origen humano U937 en un rango de 4-11%, y sobre las células de origen murino L1210 6-5% de inhibición, pero a concentraciones altas (>31.25 µg/ml) estimuló el crecimiento de las mismas, en cambio sobre la línea L929 presentó efecto inhibitorio de 1 hasta un 6%, caso aparte el de la línea linfoblástica murina L5178Y que sólo se observó un efecto de proliferación a pesar que la línea L1210 es semejante, se puede atribuir al estado de diferenciación de cada célula ya que presentan diferentes receptores de superficie. El extracto acuoso (Tabla 12) presentó un comportamiento dual sobre la línea de origen humano U937 a la concentraciones menores de 15.62 µg/ml inhibió el crecimiento (9-11% de inhibición) pero a la concentraciones más altas (125 y 250 µg/ml) estimuló el crecimiento (37-85% respectivamente) pero sobre las líneas celulares de origen murino L1210 (83% de de crecimiento) y L5178Y (que va desde 22 al 142% de crecimiento) presentó gran efecto de estimulación de crecimiento. Resultados semejantes se publicaron en un estudio sobre la capacidad de varias plantas entre ellas *O. basilicum*, para inhibir enzimas involucradas en cáncer de hígado inducido por químicos en ratas, encontraron que tenía comportamiento dual ya que

estimulaba tanto la vía de inhibición como la de promoción de cáncer (Kusamran W. R., et al 1998), lo que nos propone que los extractos pueden no ser específicos en la proliferación de células inmunológicas normales ya que estimulan la proliferación de ambas a concentraciones altas. Aunque se reporta al eugenol presente en plantas del género *Ocimum* como compuesto anticancerígeno y antioxidante (Kelm M. A., et al 2000), el eugenol puede inhibir la peroxidación de lípidos (Ogata M., et al 2000) y se encontró que el extracto acuoso de *Ocimum* protege contra la peroxidación de lípidos inducida por radiación *in vivo* en ratones (Devi P. U. y A. Ganasoundari 1999). Los polifenoles y flavonoides son los principales compuestos derivados de plantas con actividad antioxidantes y anticancerígena, los presentes en infusiones acuosas de la planta *Aspalathus linearis* presentan actividad antioxidante *in vivo* sobre ratones (Shimoi K., et al 1996), también el flavonoide genistein mostró capacidad inhibitoria sobre células cancerígenas de cáncer de mama humano *in vitro* (Zava D. T. y G. Duwe 1997).

Respecto a la actividad sobre *Candida albicans*, *O. basilicum* mostró actividad de inhibición del crecimiento a concentraciones altas (>15.62 µg/ml) con el extracto metanólico (11-25%) y acuoso (12%), destacando el extracto metanólico con una mayor actividad (Tabla 21 y 22). La actividad antimicrobiana de los compuestos de plantas es probablemente la más documentada. Se reporta que los extractos acuosos y metanólicos de *O. sanctum* presentan actividad inhibitoria sobre bacterias enteropatógenas (*Klebsiella*, *E. coli*, *S. aureus* y *V. cholerae*) y *Candida albicans* (Geeta, et al 2001), reforzando los resultados mostrados en el presente estudio.

Los compuestos encontrados en el extracto metanólico de *Plantago virginica* fueron flavonoides, lignanos, esteroides, carbohidratos, saponinas, alcaloides (Tabla 36), mientras que en el acuoso se encontraron flavonoides, coumarinas, saponinas y carbohidratos (Tabla 31), la presencia de estos componentes en *P. major* se reportó anteriormente por Samuelsen A. B (2000). Se

reportó la presencia de flavonoides en las hojas de especies de *Plantago* (Bakker M. I., et al 2001).

Con respecto a la actividad inmunológica de *Plantago major* existen reportes sobre su capacidad inmunopotenciadora (Samuelsen A. B 2000), en el cual el extracto tuvo la capacidad de incrementar la proliferación de linfocitos de ratas Sprague-Dawley activados con Con A (Gómez-Flores R. et al 2000), en este trabajo se refuerza lo antes descrito, ya que el extracto metanólico de *Plantago virginica* tuvo la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos tímicos de rata (un 5–20%) a las concentraciones ($>31.25 \mu\text{g/ml}$) (Tabla 5), aunque el extracto acuoso tuvo efecto dual sobre los linfocitos de rata; una actividad de inhibición de la proliferación a concentraciones menores de $62.5 \mu\text{g/ml}$ (Tabla 4) y a la concentración más alta de $250 \mu\text{g/ml}$ un estímulo del 22% de la proliferación. Aunque se reporta que el extracto acuoso de otra especie, *P. ovata* inhibe la respuesta inmune humoral de ratones y conejos, también presenta otro efecto benéfico sobre células del sistema inmune, su actividad aninflamatoria. Shipochliev T., et al (1981) encontraron que *P. lanceolata* y *P. major* tenían la capacidad de suprimir la inflamación y la infiltración leucocitaria. *P. major* también presenta propiedades de cicatrización de heridas esto quizás se deba a la capacidad de activar las vías alterna y clásica del complemento (Michaelsen T. E. et al 2000).

Se ha reportado actividad anticáncer de *P. major*, una actividad profiláctica sobre cáncer mamario en ratones del extracto acuoso, aunque no mostró actividad antileucémica sobre ratones *in vivo* (Samuelsen A. B. 2000), como lo encontrado en el presente estudio (Tabla 13 y 14) sobre las líneas L1210 y L5178Y, que son linfoblastos murinos, sobre los cuales el extracto acuoso y el metanólico de *P. virginica* no tuvieron efecto inhibitorio, por el contrario sobre la línea L5178Y presentó actividad estimulante del crecimiento a concentraciones altas ($>125 \mu\text{g/ml}$) por parte de ambos extractos en un rango que va desde un 5 al 7% para el extracto metanólico y para el acuoso un 26–48% de estímulo de

crecimiento; y con la línea L1210 el extracto metanólico incremento el crecimiento de la línea hasta un 42% en la concentración mayor (250 µg/ml). En cambio con la línea celular L929 (que es un fibrosarcoma murino) el extracto metanólico, pero no el acuoso, tuvo una actividad citotóxica de un 3-8% de inhibición de crecimiento, pero sí se ha reportado actividad anticancerígena de *P. major* sobre el cáncer mamario de ratones *in vivo* como medida profiláctica (Lithander A. 1992). Mientras que con la línea de origen humano U937, tanto el extracto acuoso como el metanólico presentaron actividad dual; a concentraciones bajas (7.81 µg/ml) la actividad resultó de inhibición hasta en un 10% y a altas (>62.5 µg/ml) estimulación del crecimiento hasta en un 55%. Por lo que no se puede decir que tenga un efecto citotóxico relevante frente a las líneas U937, L1210 ni L5178Y, sólo para la línea L929 el extracto metanólico. En este caso no se puede decir que la proliferación producida para linfocitos de rata no es específica ya que estimuló a todas las concentraciones probadas exceptuando la de 250 µg/ml del extracto acuoso, mientras que en la línea L5178Y la estimuló precisamente a las concentraciones más altas.

El extracto metanólico y el acuoso de *P. virginica* no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *Candida albicans* (Tabla 23 y 24), como lo reportado por Samuelsen A. B. (2000) de una actividad de inhibición marginal del extracto metanólico de *P. major* sobre *C. albicans*. En otros estudios se ha reportado actividad antibacteriana y anticandida de esta planta (Holetz FB, et al 2002), aunque se reporta actividad antibiótica contra *Streptococcus pneumoniae* en ratones infectados, esto es, debido a una estimulación de la inmunidad innata (Hetland G. et al. 2000).

En el extracto metanólico de *Rosa sp.* se encontró flavonoides, sesquiterpenlactonas, coumarinas, lignanos, esteroides, carbohidratos y posiblemente alcaloides ya que el resultado de la prueba no fue contundente (Tabla 37); mientras que en el extracto acuoso se encontraron flavonoides, coumarinas, saponinas y carbohidratos (Tabla 32). Sobre los reportes de los

compuestos presentes, en la amplia gama de especies de rosa se enfocan en los componentes de la flor y en este estudio se utilizaron las hojas de la planta. Se ha reportado la presencia de polifenoles y esteroides en las hojas de plantas del género *Rosa* (Swiezewska E, et al. 1992), y de sesquiterpenlactonas en las hojas de *Rosa rugosa* (Hashidoko Y. et al 2001).

Respecto a la actividad de los extractos de *Rosa sp.*, el metanólico no tuvo efecto significativo sobre la proliferación de los linfocitos de rata (Tabla 6), en cambio el extracto acuoso tuvo actividad bimodal (Tabla 7). A la concentración más baja probada (3.91 µg/ml) provocó un 6% de inhibición del crecimiento y a las concentraciones mayores de 62.5 µg/ml un estímulo de la proliferación en un rango de 10-80%. A este respecto no existen reportes de plantas del género *Rosa* sobre el sistema inmune por lo que este trabajo amplía los estudios sobre el posible efecto benéfico sobre las células inmunológicas, aunque cabe destacar que se requiere un estudio más amplio para poder obtener datos más completos. Un estudio reportó una actividad antialérgica ya que tiene la capacidad de inhibir la degranulación de mastocitos de rata (Kim H. M. et al 1999).

Sobre la actividad antitumoral de especies del género *Rosa*, existen varios reportes aunque no se refieren a extractos de las hojas sino de los frutos o pétalos. Por ejemplo, los frutos de *Rosa rugosa* mostraron actividad anticancerígenos sobre un número de líneas celulares sin tener efecto citotóxico sobre células humanas normales (Yoshizawa Y. et al 2000). En un estudio posterior se encontró que polifenoles de este fruto tienen actividad antioxidante sobre modelos celulares y sobre polimorfonucleares durante un proceso inflamatorio sin alterar el metabolismo de la célula (Daels-Rakotoarison D. A. et al 2002). Pero en el presente estudio los extractos no mostraron una actividad definitiva sobre el crecimiento de las líneas celulares probadas. Por parte del extracto metanólico de *Rosa sp.* (Tabla 15) sobre la línea de origen humano U937 y sobre linfoblastoma murino L5178Y, provocó estimulación del crecimiento en

un rango de 3% hasta un 119% a concentraciones mayores de 31.25 $\mu\text{g/ml}$; presentó un comportamiento bimodal con las líneas de origen murino L1210 y L929, ya que a concentraciones menores de 31.25 $\mu\text{g/ml}$ provocó una inhibición del crecimiento en un rango de 6 hasta un 12%, pero a la concentración más alta (250 $\mu\text{g/ml}$) estimuló el crecimiento de estas líneas en un 78 y 30% respectivamente. Por su parte el extracto acuoso de *Rosa sp.* (Tabla 16) también estimuló el crecimiento (7%) de la línea celular L5178Y pero sólo a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$, comportamiento semejante sobre la línea celular L1210 ya que a concentraciones mayores de 125 $\mu\text{g/ml}$ estimuló el crecimiento en un 16 y 60%; por otro lado este extracto presentó un efecto dual sobre la línea U937 de inhibición de 7-13% a concentraciones bajas ($>31.25 \mu\text{g/ml}$) y de estímulo de crecimiento de 13 y 47% a concentraciones altas ($<125 \mu\text{g/ml}$), mientras que la línea de origen murino con propiedades adherentes L929 resultó ser más susceptible al extracto acuoso ya que inhibió su crecimiento en un 6%, a la concentración de 7.81 $\mu\text{g/ml}$, por estos resultados podemos deducir que el efecto mitogénico del extracto acuoso sobre la proliferación de células cancerosas y normales no es específica, ya que existen compuestos de plantas que actúan como mitógenos (Fernandez T. et al 2002).

El efecto observado sobre el crecimiento de *C. albicans* del extracto metanólico y acuoso de *Rosa sp.* (Tabla 25 y 26) mostraron actividad inhibitoria, especialmente el extracto acuoso en un rango de 14 a 26%, un efecto como este se observó sobre *Rosa canina* que mostró actividad antimicótica *in vitro* sobre una cepa de *C. albicans* aislada de una paciente con vaginitis aguda (Trovato A. et al 2000), también actividad antibacterial sobre *S. aureus* (Aridogan B. C., et al 2002).

El extracto metanólico de *Persea americana* contiene lignanos, saponinas, carbohidratos y alcaloides (Tabla 38), mientras que el extracto acuoso presenta flavonoides, coumarinas, lignanos, saponinas y carbohidratos (Tabla 33).

El extracto metanólico de *P. americana* no tuvo efecto significativo sobre la proliferación de linfocitos tímicos de rata (Tabla 8), mientras que el acuoso (Tabla 9) mostró actividad dual, a la concentración 3.91 µg/ml causó inhibición en un 7%, como en el estudio de Meade N. A., et al (1980) donde se encontró un efecto de lectinas de las hojas de *P. americana* era el de una ligera inhibición de la proliferación de linfocitos activados con Con A o con lipopolisacárido bacteriano, al contrario de la mayoría de las lectinas presentes en las plantas. Sin embargo a concentraciones altas (> 62.5), el extracto acuoso de *P. americana* causó estimulación de la proliferación (rango de 8-38%). También se reporta actividad analgésica y antiinflamatoria de *P. americana* sobre ratones con edema cancerígeno y disminución del dolor (Adeyemi O., et al 2002).

Por su parte los extractos de *P. americana* mostraron un incremento en el crecimiento de la línea celular L5178Y (en un rango de 12-98% de estimulación) a concentraciones altas (>31.25 µg/ml) en ambos extractos (Tablas 17 y 18). En un estudio sobre el efecto tóxico de las hojas de *P. americana* sobre animales, se encontró que causan necrosis sobre glándulas mamarias en periodo de lactancia y sobre miocardio de ratones (Oelrichs P. B., et al 1995). Con respecto al efecto del extracto metanólico de *P. americana* sobre las otras líneas celulares, este presentó un rango de 3-9% de citotoxicidad sobre la línea tumoral humana U937 a todas sus concentraciones utilizadas, excepto la máxima evaluada, también un efecto citotóxico (9-12%) sobre la línea del fibrosarcoma murino (L929) a concentraciones menores de 31.25 µg/ml, y un efecto citotóxico del 2 y 7% de inhibición sobre las células murinas L1210 a las concentraciones de 3.91 y 7.81 µg/ml, mientras que a la concentración de 250 µg/ml un 18% de estimulación de crecimiento. Estos resultados nos muestran al extracto con mayor efecto citotóxico aunque no tuvo efecto sobre la proliferación de linfocitos de rata. Esto podría ser de utilidad para estudiar su efecto sobre células inmunológicas humanas y determinar su uso como terapia sobre cáncer. Por otro lado el extracto acuoso mostró una actividad dual frente a las líneas U937, L1210 donde a

concentraciones bajas (<31.25 µg/ml) inhibía el crecimiento hasta un 8%, y a altas (>125 µg/ml) incrementaba el crecimiento hasta un 32%, mientras que sobre la línea L5178Y tuvo un efecto de proliferación en un rango de 12-98% en concentraciones mayores a 31.25 µg/ml. Resultados semejantes a los obtenidos sobre los linfocitos de rata por lo que este extracto definitivamente no tiene selección de entre células cancerosas y normales.

Sobre la actividad de *C. albicans* ambos extractos de *P. americana* mostraron una actividad anticandida significativa en un rango de 10 a 28% (Tabla 27 y 28). A este respecto Oelrichs P. B., et al (1995) reportaron que las hojas de aguacate tenían actividad anticandida.

De las hojas de *Larrea tridentata* sólo se evaluó el extracto acuoso debido que con el extracto metanólico se producía una goma que era imposible de disolver para ajustar la concentración, como se sabe esta planta produce una goma de donde de ha aislado el ácido nordihidro guayarético, que es un lignano (Romo de Vivar 1985). Se encontraron flavonoides, coumarinas, saponinas y carbohidratos en el extracto (Tabla 34), aunque no se identificaron lignanos como se reporta (Samuelsen A. B. 2000).

El extracto acuoso de *L. tridentata* tuvo efecto de estimulación proliferación (5%) de linfocitos de rata estimulados con Con A (Tabla 10) sólo a la concentración de 3.91 µg/ml, no existen reportes sobre la actividad de esta planta sobre el sistema inmune, así este estudio deja abierta una puerta para ampliar los estudios sobre el efecto sobre las células inmunes, ya que muchas personas utilizan esta planta a pesar que es de uso delicado.

Respecto a su actividad sobre el crecimiento de líneas celulares sobre la línea de origen humano U937, esta planta tuvo un efecto dual a concentraciones bajas (3.91 µg/ml) una inhibición del 10% y a concentraciones altas inducción de proliferación en un rango de 2-58% (7.81, 31.25 y 250 µg/ml). Por otra parte este extracto tuvo un efecto de proliferación a concentraciones altas (mayores de 62.5 µg/ml) sobre las líneas de origen murino L1210 (53% de crecimiento), L929

(15% de crecimiento) y L5178Y (un rango de 13–127%), aunque este efecto fue a mayor gama de concentraciones sobre la línea L5178Y. A pesar de que existen especulaciones del posible efecto antioxidante del ácido nordihidro guayarético, un reciente estudio indica que contribuye a hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en ratones y en humanos (Lambert J. D., et al 2002), sin embargo otros estudios sostienen lo antes mencionado pues encontraron una actividad preventiva sobre tumores en piel de ratón (Gonzales M. y Bowden G. T. 2002).

Se ha reportado actividad antifúngica de *L. tridentata* en contra de *C. albicans* fue de inhibición del crecimiento, se reporta actividad antifúngica de esta planta en particular en padecimientos cutáneos, también hay un reporte sobre actividad anti-HIV de los lignanos de *Larrea tridentata* (Gnabre J. N., et al 1995). En este trabajo *L. tridentata* inhibió el crecimiento de *C. albicans* en un rango de 11 a 16%. Se habla que a dosis pequeñas o en aplicaciones tópicas los extractos de *Larrea* son seguros, pero es preferible evitar el uso de esta planta en personas con historial de daño hepático (Heron S. y E. Yarnell 2001).

Se habla de los efectos benéficos de las plantas, pero existen plantas que al contrario de inhibir el cáncer lo promueven, y el ejemplo más conocido por todo el mundo es el tabaco, sus hidrocarburos aromáticos son agentes cancerígenos que son suficientes para causar tumores sin necesidad de un promotor (Kaufman P- B., et al 1999), por lo que es necesario estudiar los efectos de las plantas sobre el sistema inmune y sobre líneas celulares para estar seguros de los medicamentos naturales no van a causar daño principalmente tisular como el que se reporta para *Larrea tridentata*. (Lambert J. D., et al 2002).

El efecto que se observó para todos los extractos sobre la línea del linfoma murino L5178Y fue de estimulación de la proliferación, esto se deba quizás a la tasa de proliferación tan alta que tiene esta línea celular y los compuestos presentes en los extractos no son lo suficientemente específicos sobre la inhibición de líneas celulares, por lo que no son capaces de impedir su rápida

proliferación; también cabe destacar que todos los extractos son una mezcla de sustancias que están en conjunto y que posiblemente interactúan entre sí o compiten para la ocupación de los receptores de las células que en algunas ocasiones son ocupados por algunos compuestos y en otras por las sustancias competentes y no se puede observar un efecto claro.

8. CONCLUSIONES

1. El extracto metanólico de *Ocinum basilicum* contiene flavonoides, lignanos, esteroides, saponinas, carbohidratos y alcaloides. Destacó por la propiedad de estimular la proliferación (7-19%) de linfocitos de rata. Presentó actividad bimodal respecto a la actividad antitumoral ya que a concentraciones altas ($>15.62 \mu\text{g/ml}$) estimulaba el crecimiento y a concentraciones bajas ($<62.5 \mu\text{g/ml}$) inhibió el crecimiento de línea murina L1210 y de la humana U937, mientras que con la línea de fibrosarcoma murino (L929) inhibió su crecimiento (rango de 4-6%) a concentraciones menores de $62.5 \mu\text{g/ml}$, por el contrario con la línea del linfoblastoma murino (L5178Y) estimuló el crecimiento (3-25%). Mostró actividad inhibitoria del crecimiento (11-25%) de *C. albicans* a partir de la concentración de $62.5 \mu\text{g/ml}$.

2. El extracto acuoso de *Ocinum basilicum* tiene flavonoides, coumarinas y carbohidratos. Presentó gran actividad estimuladora (un rango de 22-79%) de la respuesta proliferativa de linfocitos de rata. Solo presentó efecto bimodal sobre la línea linfoide humana, a concentraciones altas ($<125 \mu\text{g/ml}$) estimuló el crecimiento (37-85%), mientras a concentraciones bajas ($>15.62 \mu\text{g/ml}$) la inhibió (en un rango de 9-11%), pero con la línea linfoblastica murina (L5178Y) presentó efecto de proliferación (de un 22 hasta 142%) solo a concentraciones altas (>31.25). Se observó una actividad antimicótica (6 y 12%) contra *C. albicans* a las concentraciones de 15.65 y $62.5 \mu\text{g/ml}$.

3. El extracto metanólico de *Plantago virginica* contiene flavonoides, lignanos, esteroides, carbohidratos, saponinas y alcaloides. Respecto a la actividad inmunológica resultó ser activador (5-20%) de la proliferación de linfocitos de rata. Mostró gran capacidad antitumoral (3-8%) a todas las

concentraciones menores de 62.5 µg/ml sobre la línea de fibrosarcoma murino (L929), mientras que para las otras dos líneas linfoblásticas murinas (L1210 y L5178Y) y la humana (U937) estimuló el crecimiento (en un rango de 2 a 55%) a concentraciones altas (>62.5 µg/ml). No presentó efecto significativo sobre el crecimiento *C. albicans*.

4. El extracto acuoso de *Plantago virginica* tiene flavonoides, coumarinas, saponinas y carbohidratos. Presentó actividad bimodal sobre la proliferación de linfocitos de rata, ya que a concentraciones menores de 62.5 µg/ml presentó citotoxicidad (8-12%) y a la concentración de 250 µg/ml estimuló la proliferación (22%). De igual modo presentó actividad bimodal sobre la línea celular de origen humano (U937) a concentraciones bajas (<31.25 µg/ml) una inhibición del crecimiento (9-11%) y a concentraciones altas (250 µg/ml) estimulación (30%) del mismo; sobre una de las líneas linfoblástica murina (L5178Y) presentó un efecto de estimulación del crecimiento (10-48%) a concentraciones mayores de 62.5 µg/ml, mientras que sobre la línea del fibrosarcoma murino (L929) a la concentración de 3.91 µg/ml presentó un efecto inhibitorio (4%). No presentó efecto sobre el crecimiento de *C. albicans*.

5. El extracto metanólico de *Rosa sp.* contiene flavonoides, sesquiterpenlactonas, coumarinas, lignanos, esteroides, carbohidratos y posiblemente alcaloides. No alteró la función de los linfocitos de rata. Destacó el comportamiento bimodal sobre dos líneas murinas (L1210 y L929) a concentraciones bajas (<31.25 µg/ml) inhibición del crecimiento (en un rango de 6-12%) mientras que a concentración más alta estudiada (250 µg/ml) estimulación del crecimiento (un 78 y 30% respectivamente); mientras que sobre la línea linfoblástica murina (L5178Y) y la humana (U937) estimuló el crecimiento (en un rango de 3-119%) en concentraciones de 15.62 y 250 µg/ml. Presentó efecto inhibitorio (15 y 19%) sobre el crecimiento de *C. albicans*.

6. El extracto acuoso de *Rosa sp.* presenta flavonoides, coumarinas, saponinas y carbohidratos. Tuvo un efecto dual sobre la respuesta proliferativa de linfocitos a la concentración de 3.91 µg/ml provocó un inhibición (6%) y a concentraciones mayores de 62.5 µg/ml produjo un gran estímulo de la proliferación (de un 10 hasta un 80%). También presentó actividad bimodal sobre la línea del linfoma humano (U937) dependiendo la concentración del extracto: a concentraciones altas (>125 µg/ml) estimuló el crecimiento (13-47%) y a bajas (<31.25 µg/ml) lo inhibió (7-13%), mientras que para las líneas linfoblasticas murinas (L5178Y y L1210) estimuló el crecimiento (7-60%) a la concentraciones mayores de 125 µg/ml, pero sobre la línea del fibrosarcoma murino (L929) inhibió el crecimiento (6%) a concentración baja (7.81 µg/ml). Presentó amplia inhibición (14-26%) del crecimiento de *C. albicans* a partir de 7.81 hasta 125 µg/ml.

7. El extracto metanólico de *Persea americana* contiene lignanos, saponinas, carbohidratos y alcaloides. Pero no presentó efecto sobre la proliferación de linfocitos de rata. Destacó su gran actividad antitumoral (3-9%) sobre la línea humana (U937) a todas las concentraciones estudiadas (excepto 250 µg/ml), también presentó inhibición del crecimiento (9-12%) del fibrosarcoma murino (L929) a bajas concentraciones (<31.25 µg/ml), de igual modo un efecto citotóxico marginal (2%) sobre el linfoblastoma murino (L1210) sólo a la concentración de 3.91 µg/ml, mientras que para una de las líneas linfoblastica murina (L5178Y) estimuló el crecimiento (8-10%) a concentraciones mayores de 125 µg/ml. Presentó actividad inhibitoria del crecimiento de 10-19% de *C. albicans* .

8. El extracto acuoso de *Persea americana* tiene flavonoides, coumarinas, lignanos, saponinas y carbohidratos. Mostró un efecto bimodal frente a la respuesta proliferativa de linfocitos de rata, a concentraciones elevadas >62.5 µg/ml) la activó en un rango de 8-38%, y a la concentración de 3.91 µg/ml un efecto inhibitorio (7%). Tiene actividad bimodal dependiendo de

la concentración sobre la línea celular humana (U937), sobre una de la linfoblástica murina (L1210) y el fibrosarcoma murino (L929), a bajas concentraciones (<31.25 µg/ml) inhibición (en un rango de 4-8%) y a altas concentraciones (>125 µg/ml) estimulación (7-32%), en cambio sobre el otro linfoblasto murino (L5178Y) estimuló la capacidad proliferativa (12-98%) a concentraciones altas (>31.25 µg/ml). Tuvo efecto antimicótico (10-28%) sobre *C. albicans*.

9. El extracto acuoso de *Larrea tridentata* tiene flavonoides, coumarinas, saponinas y carbohidratos. No presento alteración sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos de rata. Sobre su actividad antitumoral presentó un patrón bimodal con la línea celular humana (U937), a concentraciones bajas (7.81 µg/ml) una inhibición (10%) del crecimiento, y a concentraciones altas (31.25 y 250 µg/ml) estimulación del crecimiento (2 y 58%), al igual que sobre las líneas de linfoblásticas murinas (L120, L5178Y y L929) estimuló el crecimiento (12-127%) a concentraciones altas (>15.65 µg/ml). Presentó inhibición del crecimiento (11-16%) de *C. albicans*.

9. RELEVANCIA DEL TRABAJO.

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiple uso para el hombre; las plantas son indispensables para la supervivencia del hombre por su participación en los ciclos biológicos. La información obtenida de la investigación de compuestos de origen vegetal ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que lo producen y lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos.

La presencia de agentes inmunopotenciadores en plantas nativas del noreste de México podrían ser utilizadas como agentes profilácticos contra el desarrollo de tumores, además de poder eliminar a patógenos mediante la estimulación de la respuesta inmune no específica. Algunos extractos pueden estimular la inmunidad humoral y celular contra virus, bacterias, hongos, protozoarios y cáncer.

Los tratamientos usados para combatir el cáncer tienen diversos efectos colaterales los cuales no ofrecen una buena calidad de vida humana; por ello es relevante buscar y utilizar sustancias con alta selectividad inhibitoria en contra del crecimiento de células cancerígenas y que posean poco o ningún efecto dañino al organismo.

10. LITERATURA CONSULTADA.

- Adeyemi O., S. Okpo, O. Ogunti. 2002 Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill Lauraceae Fitoterapia 73(5):375-385.
- Akhtar M. S., M. Munir . 1989 Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleracea* and *Ocimum basilicum* in rats. J Ethnopharmacol 27(1-2):163-76.
- Aridogan B. C., H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Ozbasar, E. Mumcu. 2002 Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch Pharm Res;25(6):860-4
- ATCC 1994 Cell lines and hybridomas, 8th edition, American Type Culture Collection, pp. 152, 167, 315, 329, 335.
- Bakker M. I., J. W. Koerselman, J. Tolls, C. Kolloffel. 2001 Localization of deposited polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of *Plantago*. Environ Toxicol Chem;20(5):1112-6
- Basilico M. Z., J. C. Basilico. 1999 Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. Lett Appl Microbiol 29(4):238-41.
- Barnes S., 1995 Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer J. Nutr., 125:777-783.
- Bell R. A., P. K. High. 1997 Alterations of immune defense mechanisms in elderly: the role of nutrition Infect Med 14(5): 415-424.
- Behboudi S, B. Morein, M. C. Villacres - Eriksson. 1999. Quillaja saponin formulations that stimulate proinflammatory cytokines elicit a potent acquired cell-mediated immunity. Scand J Immunol 50(4):371-7
- Brouwer M. A., P. J. Van den Bergh, M. R. Aengevaeren, G. Veen, H. E. Luijten, D. P. Hertzberger, A. J. Van Boven, R. P. Vromans, G. J. Uijen, F W. Verheugt. 2000 Aspirin plus coumarin versus aspirin alone in the

- prevention of reocclusion after fibrinolysis for acute myocardial infarction: results of the Antithrombotics in the Prevention of Reocclusion In Coronary Thrombolysis (APRICOT)-2 Trial. *Circulation* 6:106(6):659-65.
- Burton D. J y J. L. Routh 1977 *Química orgánica y Bioquímica* 1ª edición McGraw-Hill México. Pp. 231-249.
- Chaurasia S. C., K. K. Vyas. 1977 In vitro effects of some volatile oil against *Phytophthora parasitica var piperina* J. Res. Indian Med. Yoga Homopath. 1977:24-26.
- Chew B. P., L. W. Tjoelker, T. S. Tanaka. 1985 In vitro growth inhibition of mastitis causing bacteria by phenolics and metal chelators. *J Dairy Sci* 68(11):3037-46.
- Coll J. M. 1993 *Técnicas de Diagnóstico en Virología* editorial Días de Santos España pp. 29-32.
- Courreges M. C. y F. Benencia. 2002 In vitro antiphagocytic effect of basil oil on mouse macrophages. *Fitoterapia* 73(5):369-74
- Daels-Rakotoarison D. A., B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, M. Luyckx, T. Dine, F. Bailleul, M. Cazin, J. C. Cazin. 2002 Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst. *Phytother Res* 16(2):157-61.
- De Clercq E., 1995 Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin Microbiol. Rev* 8:200-239.
- Devi P. U. y A. Ganasoundari 1999 Modulation of glutathione and antioxidant enzymes by *Ocinum sanctum* and its role in protection against radiation injury *Indian J. Exp. Biol.* 137 (3):262-8
- Domínguez X. A. 1973 *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 1ª edición editorial LIMUSA. México
- Ebi G. C. 2001 Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. *Fitoterapia* 72(1):69-72.
- Evans S. 1982 *Plantas alucinógenas*, Ediciones científicas, La prensa mexicana S. A. p17-19.
- Fernandez T., P. Cerda Zolezzi, E. Risco, V. Martino, P. Lopez, M. Clavin, O.

- Hnatyszyn, S. Canigueral, S. Hajos, G. Ferraro, E. Alvarez. 2002 Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomedicine* 9(6):546-52
- Ferrante A., R. E. M. Staugas, B. Rowan-Kelly, S. Bresatz, L. M. Kumaratilake, C. M. Rzepczyk, G. R. Adolf. 1990 Production of tumor necrosis factors alpha and beta by human mononuclear leucocytes stimulated with mitogens, bacteria and malarial parasites. *Infection and Immunity* 58(12):3996-4003.
- García-García M., V. Rosas-Landa. 1999 *Inmunología básica para estudiantes de medicina 1ª edición* Instituto Politécnico Nacional, México. Pp. 23-101.
- Geeta, D. M. Vasudevan, R. Kedlaya, S. Deepa M. Ballal 2001 Activity of *Ocimum sanctum* (the traditional Indian medicinal plant) against the enteric pathogens. *Indian J Med Sci* 55(8):434-8, 472
- Gnabre J. N., J. N. Brady, D. J. Clanton, Y. Ito, J. Dittmer, R. B. Bates, R. C. Huang. 1995 Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DNA sequence-selective plant lignans. *Proc Natl Acad Sci USA* 21;92(24):11239-43.
- Gómez-Flores R., C. L. Calderon, L. W. Scheibel, P. Tamez-Guerra, C. Rodríguez-Padilla, R. Tamez-Guerra, R. J. Weber. 2000 Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytoter. Res.* 14: 617-622.
- Gómez-Flores R., S. Gupta, R. Tamez-Guerra, T. Mehta. 1995 Determination of MICs for *Mycobacterium avium* - *M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J Clin Microb* 33(7): 1842-1846.
- Gómez-Flores R., C. Rodríguez-Padilla, R. Tamez-Guerra. 1990 Early production of a chemotactic factor to T lymphocytes by peritoneal macrophages. *Cel. Immunol.* 126:1-15.
- Gonzales M. y G. T. Bowden. 2002 Nordihydroguaiaretic acid-mediated inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 activation in human keratinocytes. *Mol Carcinog*;34(2):102-11

- Grayer R. J., G. C. Kite, F. J. Goldstone, S. E. Bryan, A. Paton, E. Putievsky. 1996
Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil,
Ocimum basilicum. *Phytochemistry* 43(5):1033-9.
- Hashidoko Y., K. Endoh, T. Kudo, S. Tahara. 2001 Capability of wild *Rosa rugosa*
and its varieties and hybrids to produce sesquiterpene components in
leaf glandular trichomes. *Biosci Biotechnol Biochem*;65(9):2037-43
- Heinrich M., M. Robles, J. E. West, B. R. Ortiz de Montellano y E. Rodriguez. 1998
Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu Rev
Pharmacol Toxicol* 38:539-65.
- Heron S., E. Yarnell. 2001 The safety of low-dose *Larrea tridentata* (DC) Coville
(creosote bush or chaparral): a retrospective clinical study. *J Altern
Complement Med* 7(2):175-85.
- Hetland G., A. B. Samuelsen, M. Lovik, B. S. Paulsen, I. S Aaberge, E. C. Groeng,
T. E. Michaelsen. 2000 *Scand J Immunol* 52(4):348-557.
- Holetz F. B., G. L. Pessini, N. R. Sanches, D. A Cortez, C. V. Nakamura CV, B. P.
Dias-Filho. 2002 Screening of some plants used in the Brazilian folk
medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo
Cruz* 97(7):1027-31.
- Hussain R. F., A. M. E. Nouri, R. T. D. Oliver. 1993. A new approach for
measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Met* 160:
89-96.
- Isosi F., M. T. Santini, W. Malorni. 1993 Membrane and cytoskeleton are
intracellular targets of rehin in A431 cells, *Anticanc. Res* 13: 545-554.
- Kariba R. M., P. J. Houghton, A. Yenesew. 2002 Antimicrobial activities of a new
schizozygane indoline alkaloid from *Schizozygia coffaeoides* and the revised
structure of isoschizogaline. *J Nat Prod* 65(4):566-9.
- Kaufman P. B., L. J. Cseke, S. Waber, J. A. Duke, H. L. Briemann. 1999
Natural Products From Plants. CRC Press, USA pp. 88, 125, 158, 153, 159,
165.

- Kelm M. A., M. G. Nair, G. M. Strasburg, D. L. DeWitt. 2000 Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine*;7(1):7-13
- Kim H. M., Y. A. Park, E. J. Lee, T. Y. Shin. 1999 Inhibition of immediate-type allergic reaction by *Rosa davurica* Pall. In a murine model. *J Ethnopharmacol* 67(1):53-60
- Knight K. R., G. Vairo, J. A. Hamilton, D. A. Lepore. 1992 Coumarins: macrophageproteinase production and pinocytosis. *Res Exp Med (Berl)*;192(2):99-103.
- Kobayashi A., Y. Koguchi, H. Kanzaki, S. Kajiyama, K. Kawazu. 1994 A new type of antimicrobial phenolics produced by plant peroxidase and its possible role in the chemical defense systems against plant pathogens. *Z Naturforsch [C]* 49(7-8):411-4.
- Kumar S., K. Zierys, W. Wiegrebe, K. Muller. 2000 Medicinal plants from nepal: evaluation as inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J Ethnopharmacol* 70(3):191-5
- Kusamran W. R., A. Ratanavila, A. Tepsuwan 1998 Effects of neem flowers, Thai and chinese bitter gourd fruits and sweet basil leaves on hepatic monooxygenase and glutathione s-transferase activities, and in vitro metabolic activation of chemical carcinogens in rats. *Mutat. Res* 402 (1-2):247-58.
- Lachowicz K. J., G. P. Jones, D. R. Briggs, F. E. Bienvenu, J. Wan, A. Wilcock, M. J. Coventry. 1998 The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lett Appl Microbiol* 26(3):209-14.
- Lafitte D., V. Lamour, P. O. Tsvetkov, A. A. Makarov, M. Klich, P. Deprez, D. Moras, C. Briand, R. Gilli. 2002 DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* 11;41(23):7217-23.

- Lambert J. D., D. Zhao, R. O. Meyers, R. K. Kuester, B. N. Timmermann, R. T. Dorr. 2002 Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40(12):1701-8.
- Lemberkovics E., A. Kery, G. Marczal, B. Simandi, E. Szoke. 1998 Phytochemical evaluation of essential oils, medicinal plants and their preparations *Acta Pharm Hung* 68(3):141-9.
- Liang H. R., P. Vuorela, H. Vuorela, R. Hiltunen. 1997 Isolation and Immunomodulatory effect of flavonol glycosides from *Epimedium hunanense*. *Planta Med*;63(4):316-9.
- Lithander A. 1992 Intracellular fluid of waybread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. *Tumour Biol* 13(3):138-41.
- Luna A. 1987 Enciclopedia Médica Naturista Tomo I: mil plantas medicinales. Editores mexicanos unidos 1ª edición México. Pp 35-36, 222-223, 304-307.
- Madigan T. M., J. M. Martinico, J. Parker 1998 Brock Biología de los Microorganismos 8ª edición Pentice Hall España 776,794, 953-954. 984.
- Makino T., T. Ono, E. Muso, H. Yoshida, G. Honda, S. Sasayama. 2000 Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 15(8):1140-5.
- Martínez J. R. 1990 Herbario Medicinal Mexicano. editores mexicanos unidos México. 9ª edición pp. 20.
- Mazor R. L., I. Y. Menendez, M. A. Ryan, M. A. Fiedler, H. R. Wong. 2000 Sesquiterpene lactones are potent inhibitors of interleukin 8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Cytokine* 12(3):239-45.
- Meade N. A., R. H. Staat, S. D. Langley, R. J. Doyle. 1980 Lectin-like activity from *Persea americana*. *Carbohydr Res* 15;78(2):349-63
- Michaelsen T. E., A. Gilje, A. B. Samuelsen, K. Hogasen, B. S. Paulsen. 2000 Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scand J Immunol*. 52(5):483-90.

- Miele M., R. Dondero, G. Ciarallo, M. Mazzei. 2001 Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. *genovese gigante* J Agric Food Chem 49(1):517-21.
- Murphy C. M. 1999 Plant Products as Antimicrobial Agents Clinical Microb. Rev. 12(4):564-582.
- Ng T. B., F. Liu, Z. T. Wang. 2000 Antioxidative activity of natural products from Life Sci 14;66(8):709-23 plants.
- Oelrichs P. B., J. C. Ng, A. A. Seawright, A. Ward, L. Schaffeler, J. K. MacLeod. 1995 Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. Nat Toxins 3(5):344-9.
- Omulokoli E., B. Khan, S. C. Chhabra. 1997 Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. J Ethnopharmacol 56(2):133-7
- Oberlies N. H., L. L. Rogers, J. M. Martin, J. L. McLaughlin. 1998 Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. J Nat Prod 26;61(6):781-5.
- Ogata M., M. Hoshi, S. Urano, T. Endo. 2000 Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. Chem Pharm Bull 48(10):1467-9.
- Qian F., D. Hanahan I., L. Weissman. 2001 L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. PNAS 98(7): 3976-3981.
- Peterson G., 1995 Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumour cells. J. Nutr., 125:784-789.
- Pinn G. 2001 Herbal medicine in oncology. Aust Fam Physician 30(6):575-80.
- Plesca-Manea L., A. E. Parvu, M. Parvu, M. Taamas, R. Buia, M. Puia. 2002 Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. Phytother Res 16(4):3169.
- Rai M. K, S. Qureshi, A. K. Pandey. 1999 In vitro susceptibility of opportunistic

- Fusarium spp. to essential oils. *Mycoses* 42(1-2):97-101.
- Rippon J. W. 1988 *Medical Micology Tomo II tercera edición* W. B. Sauders Co. Pp 532-575.
- Roitt I., J. Brostoff, D. Male. 1998 *Inmunología. Cuarta edición*, Harcourt Brace. España. Pp. 1.1-1.5, 2.1-2.9, 3.1, 8.7 y 17.6
- Romo de Vivar A. 1985 *Productos Naturales de la flora mexicana. 1ª edición* LIMUSA. México. Pp. 7-209
- Romo J., A. Romo de Vivar. 1967 *Progress in the chemistry of organic natural products*. Pp. 25-90
- Rosen L. 2000 *Antiangiogenic estrategias and agents in clinical trials. The Oncologist*, 5(1): 20-27.
- Ruffa M. J, G. Ferraro, M. L. Wagner, M. L. Calcagno, R. H. Campos, L. Cavallaro. 2002 *Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J Ethnopharmacol* 79(3):335-339.
- Samuelsen A. B. 2000. *The trdicional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. A. review J. Ethnopharmacol* 71:1-21
- Sharon N., I. Ofek. 2002 *Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. Crit Rev Food Sci Nutr*;42(3 Suppl):267-72.
- Shimoi K., S. Masuda, B. Shen, M. Furugori, N. Kinae. 1996 *Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. Mutat Res* 19;350(1):153-61.
- Shipochliev T., A. Dimitrov, E. Aleksandrova. 1981 *Anti-inflammatory action of a group of plant extracts Vet Med Nauki* 18(6):87-94.
- Shwaireb M. H., M. M. El-Mofly, A. M. Rizk, H. A. Rasan. 1995 *Effects of green cofee and green tea on induced mammary gland tumorigenesis in rats. J. of herbs, species & medicinal plants* 3(4):59-69
- Singh S. 1998 *Comparative evaluation of antiinflammatory potential of fixed oil of different species of Ocimum and its possible mechanism of action. Indian J Exp Biol* 36(10):1028-31).
- Singh S. y D. K. Majumdar. 1999 *Effect of Ocimum sanctum fixed oil on vascular*

- permeability and leucocytes migration. *Indian J Exp Biol* 37(11):1136-8.
- Smith C. U. 1975 *Biología molecular Enfoque estructural 2ª edición* Editorial Alianza pp. 243-244
- Stites D. P., A. I. Terr, G. Tristan, Pasvslow. 1996 *Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno*, pp.13 - 17, 264, 612.
- Swiezewska E, T. Chojnacki, W. J. Jankowski, A. K. Singh, J. Olsson. 1992 The occurrence of long chain polyprenols in leaves of plants of *Rosaceae* family and their isolation by time-extended liquid chromatography. *Biochem Cell Biol* 70(6):448-54.
- Taylor R. S., F. Edel, N. P. Manandhar, G. H. Towers. 1996 Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 50:97-102.
- Tezuka Y., S. Irikawa, T. Kaneko, A. H. Banskota, T. Nagaoka, Q. Xiong, K. Hase, S. Kadota. 2001 Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Ethnopharmacol* 77(2-3):209-17.
- Thom S. M., R. W. Horobin, E. Seidler, M. R. Barer. 1993 Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *J Appl. Bacteriol.* 74:433-443
- Trovato A., M. T. Monforte, A. M. Forestieri, F. Pizzimenti. 2000 In vitro antimycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids. *Boll Chim Farm. Boll Chim Farm* 139(5):225-7.
- Verastegui M. A., C. A. Sanchez, N. L. Heredia, J. S. Garcia-Alvarado. 1996 Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *J Ethnopharmacol* 5;52(3):175-7.
- Wani M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggan, A. T. McPhail 1971 *Plant*

antitumor agents. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am Chem Soc. 93(9)2325-7

Weber R. J., A. Pert. 1989 The periaqueductal gray matter mediates opiate induced immunosuppression. Science 245:188-190.

Wong H. R., I. Y. Melendez. 1999 Sesquiterpene lactones inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 27;262(2):375-80)

Woods S. L. 1996 The Immune system - How it works National Institutes of Health Publication pp. 3- 20

Yang X., D. K. Summerhurst, S. F. Koval, C. Ficker, M. L. Smith, M. A. Bernards. 2001 Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. Phytother Res 15(8):676-80.

Yoshizawa Y., S. Kawii, M. Urashima, T. Fukase, T. Sato, R. Tanaka, Murofushi N., Nishimura H. 2000 Antiproliferative effects of small fruit juices on several cancer cell lines Anticancer Res 20(6B) 4285-9.

Zanon S. M., F. S. Ceriatti, M. Rovera, L. J. Sabini, B. A. Ramos. 1999 Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. Rev Latinoam Microbiol Apr-Jun;41(2):59-62.

Zava D. T. y G. Duwe. 1997 Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. Nutr Cancer 27(1):31-40

Zhang C., Liu X., H. Qiang, K. Li, J. Wang, D. Chen, Y. Zhuang. 2001 Inhibitory effects of *Rosa roxburghii* trutt juice on *in vitro* oxidative modification of low density lipoprotein and on the macrophage growth and cellular cholesteryl ester accumulation induced by oxidized low density lipoprotein. Clin Chim 313:37-43.

Zintzun T. 1986 Las plantas y su salud Ediciones Aguilar México. Pp 26-27.

APENDICE

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

BROMURO DE TETRAZOLIO (MTT)

Se disolvió el MTT en PBS a una concentración de 5 mg/ml a temperatura ambiente, la solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4° C con protección de la luz. Se prepararon soluciones frescas cada 15 días aproximadamente.

BUFFER DE LISIS DE LEUCOCITOS

SDS al 20%: 20g en 100 ml de agua destilada, se disolvió a 37° C a baño María.

DMF al 50%: Se adicionaron 100 ml de DMF en SDS al 20%. Se ajusta el ph a 4.7.

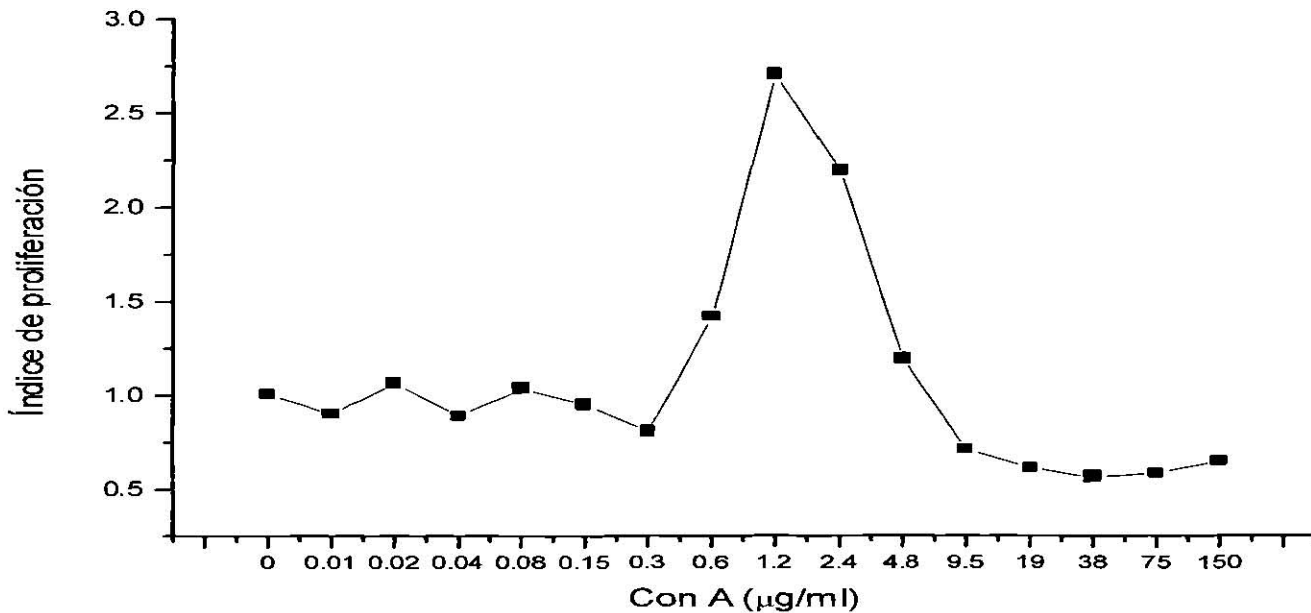
CALDO YM

Se resuspendieron 21 g del polvo base para cultivo de levaduras, hongos y otros microorganismos acidúricos, en 1 L de agua destilada. Se esteriliza por autoclave 121° C durante 5 min. Se ajusta el pH entre 3-4. Al caldo se le agregó agar bacteriológico para preparar medio sólido el cual también se esterilizó por autoclave.

2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE Con A

CURVA DOSIS-RESPUESTA: PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS DE RATA ACTIVADOS CON CONCAVALINA A.

Para seleccionar la concentración subóptima para los ensayos de proliferación se realizó una curva de calibración del efecto del mitógeno Con A sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos.



Curva dosis-respuesta de la proliferación *in vitro* de linfocitos de rata en respuesta al mitógeno Con A. Los linfocitos de timo de rata se expusieron a concentraciones de Con A en un rango de 0.009 a 150 µg/ml. Se incubaron durante 44 horas al término de las cuales se agregó 20 µl/pozo de una solución de MTT (5 mg/ml) a los cultivos y se incubaron por 4 horas adicionales. Al final se agregaron 100 µl/pozo de buffer de lisis de leucocitos para liberar los cristales de formazán formados. Las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas a 540 nm.

