

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida**

---

**Efecto de extractos herbales en la respuesta proliferativa e  
inflamatoria de células involucradas en psoriasis**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias

Presenta:

**Cecilia Yomara Madrigal García**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Cecilia Yomara Madrigal García**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**  
Codirectora de tesis

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
Codirectora de tesis

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda**

**Dr. Efraín Gómez Arias**

**Dra. Karla Evelia Cervantes Luévano**



**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Cecilia Yomara Madrigal García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida.

### **Efecto de extractos herbales en la respuesta proliferativa e inflamatoria de células involucradas en psoriasis**

Resumen aprobado por:

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**  
Codirectora de tesis

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
Codirectora de tesis

Los extractos de las plantas *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* y del preparado herbal Triphala (*Embllica officinalis*, *Terminalia chebula* y *Terminalia belerica*) son utilizadas en la medicina tradicional como tratamiento de heridas y procesos inflamatorios. Por eso en este trabajo se aborda un primer acercamiento a su efecto en la psoriasis, que es una enfermedad crónico-inflamatoria de la piel, donde se involucran células del sistema inmune como los macrófagos y los principales afectados que son los queratinocitos. La investigación se centra en evaluar posibles efectos antiinflamatorios y/o antiproliferativos en la psoriasis. Para ello se estudió en macrófagos con un perfil inflamatorio, provenientes de la línea celular THP-1, el efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos y etanólicos de estas plantas, que fue determinado por las moléculas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL-6. De todos los extractos herbales evaluados, el extracto acuoso de *Artemisia californica* y el extracto etanólico de Triphala fueron los que tuvieron un efecto antiinflamatorio más significativos en una concentración no citotóxica de 125  $\mu\text{g/ml}$ . Estos extractos fueron probados en línea celular de queratinocitos HEK estimulados con un coctel de citocinas (M5) que provocaron un perfil psoriásico en estas células. Se evaluaron los efectos de *Artemisia californica* en cinco genes importantes de la psoriasis: CXCL8, CCL20, KRT1, IL-6 y S100A7. El extracto acuoso de *Artemisia californica* mostró un notable efecto antiinflamatorio en células con perfil psoriásico, al reducir significativamente la expresión de CXCL8, CCL20, IL-6 y S100A7. El extracto etanólico de Triphala también moduló la inflamación, disminuyendo CXCL8, pero aumentando CCL20, lo que sugiere la necesidad de estudios adicionales. Los extractos de *Anemopsis californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* y Triphala presentaron actividad antiinflamatoria moderada en macrófagos M1, lo que indica su potencial como moduladores en procesos inflamatorios como en la psoriasis.

**Palabras clave: Psoriasis, extractos herbales, inflamación, queratinocitos, macrófagos**

Abstract of the thesis presented by **Cecilia Yomara Madrigal García** as a partial requirement to obtain the Master of science degree in Life Science

**Effect of herbal extracts on the proliferative and inflammatory response of cells involved in psoriasis**

Abstract approved by:

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**

Codirectora de tesis

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**

Codirectora de tesis

The extracts from the plants *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata*, and the herbal preparation Triphala (*Emblica officinalis*, *Terminalia chebula* y *Terminalia bellerica*) are traditionally used in medicine for treating wounds and inflammatory processes. Therefore, this work explores their initial effect on psoriasis, a chronic inflammatory skin disease involving immune system cells, such as macrophages, and primarily affecting keratinocytes. The research focuses on evaluating potential anti-inflammatory and/or antiproliferative effects on psoriasis. To do this, the study investigated the anti-inflammatory effects of aqueous and ethanolic extracts of these plants on macrophages with an inflammatory profile derived from the THP-1 cell line, assessing the pro-inflammatory molecules TNF $\alpha$  and IL-6. Among all the herbal extracts tested, the aqueous extract of *Artemisia californica* and the ethanolic extract of Triphala demonstrated the most significant anti-inflammatory effects at a non-cytotoxic concentration of 125  $\mu$ g/ml. These extracts were also tested on the HEK keratinocyte cell line, stimulated with a cytokine cocktail (M5) that induced a psoriatic profile in these cells. The effects of *Artemisia californica* were evaluated on five key genes in psoriasis: CXCL8, CCL20, KRT1, IL-6, and S100A7. The aqueous extract of *Artemisia californica* showed a notable anti-inflammatory effect on psoriatic-profile cells by significantly reducing the expression of CXCL8, CCL20, IL-6, and S100A7. The ethanolic extract of Triphala also modulated inflammation by decreasing CXCL8 but increasing CCL20, suggesting the need for further studies. The extracts of *Anemopsis californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata*, and Triphala exhibited moderate anti-inflammatory activity in M1 macrophages, indicating their potential as modulators in inflammatory processes such as psoriasis.

**Keywords: Psoriasis, herbal extracts, inflammation, keratinocytes, macrophages**

## Dedicatoria

A mis padres, Gema y Domingo, y a mi familia, por su amor, apoyo constante y por siempre estar a mi lado en este camino llamado *vida*.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Posgrado en Ciencias de la Vida, por aceptarme y permitirme realizar mis estudios de maestría y este proyecto.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de manutención que hizo posible la realización de mis estudios de posgrado (CVU: 1201774).

A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, por aceptarme como su estudiante, confiar en mí y transmitirme su amor por el trabajo en cultivo celular. Gracias por su disposición para aclarar mis dudas. A la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, por aceptarme, por enseñarme una nueva forma de entender la ciencia, por recordarme que preguntar es válido y necesario, por su confianza y apertura. Gracias directoras por guiar este proyecto, por su paciencia en los momentos inciertos y por dar más de lo esperado para que el trabajo fluyera y no permitirme abandonar el barco. Gracias por compartir sus conocimientos, por su orientación, por su tiempo, y por impulsarme a defender mi mejor versión de mí, por sus mejores consejos para desarrollarme personal, profesional y académicamente, y por brindarme las herramientas para concluir a este proyecto.

A mis sinodales, por sus aportaciones para mejorar el proyecto con sus observaciones, comentarios y su mejor disposición. A la Dra. Karla E. Cervantes Luévano, por sus mejores consejos, por siempre brindarme ayuda y palabras de ánimo para seguir en buen camino. Al Dr. Efraín, por siempre darme sus aportaciones en cada avance y hacerme ver otra perspectiva para mejorar el proyecto. Al Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez-Hidalgo, por aceptar ser mi sinodal y siempre mostrar su mejor disposición para ayudar.

Al laboratorio de inmunología molecular y biotoxinas, y al laboratorio de Biomateriales por abrirme las puertas, por sus aportaciones y facilitar el desarrollo el proyecto.

A la Sociedad de Alumnos del Posgrado en Ciencias de la Vida, por ser un espacio seguro y red de apoyo como estudiante, por darme la oportunidad de formar parte de los buenos y no tan buenos momentos, por trabajar en el bienestar en CICESE, y ofrecer herramientas para aportar un mejor ambiente en la ciencia.

A mi familia:

A mi mamá y mis tías Paquita y Elenita, por ser las mujeres que siempre confiaron y creyeron en mí, en inspirarme a ser mejor cada día, por siempre alentarme a seguir mis sueños y alcanzar mis metas.

A mi papá, por siempre apoyarme en cada decisión, por más inciertas que se vea, y por motivarme a explorar nuevos caminos.

A mi manito Checo, a mis primos: Gaby, Paco, Jorge, Omar, Hugo, Erick y July, a mis sobrinitos Chequito, Denisse y Saúl, a cada uno de mis sobrinos: Daniela, Cristian, Geovanni, Huicho, Hugo, Joaquín, Karla, Sara y Oscar, a mi tío Quinto y Cris, por siempre mostrarme su apoyo y cariño a distancia. Por siempre por recibirme con un gran abrazo y motivarme a seguir adelante, por siempre escucharme y estar interesados en mi trabajo.

A Ari y Jessy, por ser las más amigas que siempre me brindaron sus mejores consejos y regaños que me hicieron sentir acompañada, a pesar de la distancia. Que han disfrutado y llorado conmigo en los momentos más intensos que viví cursando la maestría y no dejarme desistir.

A las personas que conocí en la maestría, que me mostraron que *“La Tesis son los amixes que hice en la maestría”* y/o compartir los momentos más bellos y tristes en Baja California, más allá de lo académico. A Gis, por ser la confidente que me acompañó, aconsejó, me alentó a ser valiente, y que no me dejó sola con el fantasma del 4to piso. A Hugo, por escuchar mis anécdotas sin juzgarme y hacer del laboratorio un lugar de trabajo con el mejor ambiente y pasar buenos momentos. A Pol, por ser una amiga que me mostró que es posible balancear la academia y lo personal, te admiro mucho y gracias por dejarnos ser parte de la vida de Helenita. A Marco, por invitarme a reflexionar. A Oscar, Milton y Karina, por su alegría y compañía. A Claudia y Jimena por su apoyo en el laboratorio, consejos y palabras motivadoras. A Yahis, por las interminables pláticas y poder ofrecerme un lugar seguro para expresarme. A Arturo, por ser mi escucha, mi apoyo y consejero; por ayudarme a ver la mejor parte de mí, por acompañarme en mis logros y en las situaciones más complicadas, ayudarme a enfrentarlas y animarme. Sin ustedes, no habría sobrevivido en la maestría.

A mis amixes de Nuevo León, quienes, a pesar de la distancia, confiaron en mí, me animaron a seguir adelante.

A los Danielitos (Reynolds, Wayne y Platz) & Benito, a Luffy y sus *nakama*, por inspirarme en los momentos más estresantes a través de su música, creatividad y aventuras.



Gracias a todas las personas que formaron parte de esta etapa y contribuyeron a que hoy sea quien soy.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas .....	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	2
1.1.1 Irregularidades de la piel en la psoriasis .....	2
1.1.1.1 Epidermis.....	3
1.1.1.2 Dermis .....	5
1.1.2 Vías moleculares involucradas en la psoriasis.....	5
1.1.2.1 Citocinas involucradas.....	7
1.1.3 Modelos <i>in vitro</i> .....	8
1.1.4 Plantas: fuente de posibles agentes terapéuticos .....	9
1.1.4.1 <i>Anemopsis californica</i> .....	9
1.1.4.2 <i>Artemisia californica</i> .....	9
1.1.4.3 <i>Hemidesmus indicus</i> .....	10
1.1.4.4 <i>Eclipta prostrata</i> .....	10
1.1.4.5 Preparado herbal Triphala ( <i>Emblica officinalis</i> , <i>Terminalia chebula</i> y <i>Terminalia bellerica</i> ) .....	11
1.2 Justificación .....	12
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos .....	13
1.4.1 Objetivo general.....	13

1.4.2	Objetivos específicos.....	13
<b>Capítulo 2.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>14</b>
2.1	Obtención de extractos herbales.....	14
2.1.1	Obtención del material vegetal.....	14
2.1.2	Preparación de extractos acuosos .....	14
2.1.3	Preparación de extractos etanólico .....	15
2.1.3.1	Determinación de contenido fenólico de los extractos .....	16
2.2	Selección de extractos herbales mediante ensayos en macrófagos.....	17
2.2.1	Cultivo de macrófagos.....	18
2.2.1.1	Estandarización de diferenciación de monocitos a macrófagos.....	18
2.2.1.2	Establecimiento de modelo de inflamación con LPS .....	18
2.2.2	Ensayo de viabilidad celular .....	19
2.2.3	Evaluación actividad antiinflamatoria mediante RT-qPCR.....	19
2.2.3.1	Extracción de ARN .....	19
2.2.3.2	Cuantificación de genes de macrófagos M1 con tratamientos.....	20
2.3	Estandarización del modelo psoriásico en células HEK con coctel M5.....	21
2.3.1	Cultivo de queratinocitos .....	21
2.3.2	Ensayo de viabilidad celular .....	21
2.3.3	Cuantificación de expresión génica en células HEK .....	22
2.3.3.1	Tratamiento con extractos herbales en células HEK y extracción de ARN .....	22
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>24</b>
3.1	Rendimiento de extractos.....	24
3.2	Evaluación y selección de concentraciones de los extractos herbales para determinar actividad antiinflamatoria.....	26
3.2.1	Concentración fenólica y citotoxicidad de los extractos herbales.....	26
3.2.2	Diferenciación de monocitos a macrófagos.....	34
3.2.3	Efecto de los extractos herbales en macrófagos M1 .....	36

3.3	Ensayos en células HEK .....	39
3.3.1	Viabilidad de los extractos herbales.....	39
3.3.2	Efecto de los tratamientos herbales en las células HEK estimuladas con coctel M5.....	40
3.3.2.1	Efecto de los tratamientos herbales .....	42
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>.....</b>	<b>57</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1 Estructura de la piel.....	3
2 Placas psoriásicas cubiertas por escamas en los codos .....	4
3 Vías moleculares involucradas en la psoriasis.....	6
4 Tallo, hoja y semillas de <i>Artemisia californica</i> . .....	14
5 Preparación de extractos acuosos .....	15
6 Preparación de extracto etanólicos .....	16
7 Contenido fenólico de extractos de <i>Anemopsis californica</i> . .....	27
8 Viabilidad celular de extractos de <i>Anemopsis californica</i> .....	27
9 Contenido fenólico de extractos de <i>Artemisia californica</i> .....	28
10 Viabilidad celular de extracto acuoso de <i>Artemisia californica</i> .....	28
11 Contenido fenólico de extractos de <i>Hemidesmus indicus</i> .....	29
12 Viabilidad celular de <i>Hemidesmus indicus</i> . .....	29
13 Contenido fenólico de extractos de <i>Eclipsa prostrata</i> .....	30
14 Viabilidad celular de <i>E. prostrata</i> .....	30
15 Contenido fenólico de extractos de Triphala. ....	31
16 Viabilidad celular de extractos de Triphala. ....	31
17 Diagrama de los extractos que fueron seleccionados para realizar pruebas en los macrófagos. .....	334
18 Comparación de 0 h y 24 h de las células THP-1 en medio completo de RPMI-1640 a concentraciones a 50 nM y 100 nM de PMA. ....	35
19 Células THP-1 con diferentes concentraciones de LPS .....	35
20 Expresión relativa de Il-6 y TNF $\alpha$ en macrófagos con perfil inflamatorio M1 con tratamientos de extractos herbales .....	49

21 Viabilidad celular de células HEK con 125 µg/ml del extracto acuoso de <i>Artemisia californica</i> y del extracto etanólico de Triphala .....	39
22 Graficas de expresión génica de CXCL8, CCL20, IL-6, KRT1 y S100A en células HEK sin M5 y estimuladas con el coctel M5 por 48 h .....	41
23 Efecto de expresión de CXCL8 con células tratadas con los extractos herbales de Triphala y <i>Artemisia californica</i> .....	43
24 Efecto de expresión de CCL20 con células tratadas con los extractos herbales de Triphala y <i>Artemisia californica</i> .....	44
25 Efecto de expresión de KRT1, IL-6 y S100A7 en células tratadas con los extractos herbales de <i>Artemisia californica</i> . A) KRT1, B) IL-6 y C) S100A7 .....	45
26 Estructuras generales de compuestos bioactivos .....	57
27 Curva de referencia de ácido gálico para determinar el contenido de los extractos herbales.. .....	57
28 Gel de agarosa al 2% de tratamientos en macrófagos.....	58

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de macrófagos con perfil inflamatorio en respuesta a los tratamientos herbales en qPCR .....	21
2. Oligonucleótidos utilizados para la validación del modelo <i>in vitro</i> de respuesta psoriásica en HEK estimulados con el coctel M5 y con tratamientos herbales en su expresión génica. ....	22
3. Rendimiento de los extractos por tipo de extracto. <i>EtOH</i> : Extracción etanólica por 5 min, <i>EtOH*</i> : extracción etanólica por 7 días. ....	25
4. Calidad de las muestras de ARN de macrófagos M1 y tratamientos .....	47

## Capítulo 1. Introducción

---

La psoriasis es una enfermedad crónico-inflamatoria que afecta principalmente a la piel. Se caracteriza por la interacción anormal entre el sistema inmunológico y queratinocitos, disfunción que conlleva a la hiperproliferación de queratinocitos, provocando la formación de pápulas y placas escamosas (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, 2020; Yamanaka et al., 2021). Se estima que la psoriasis afecta aproximadamente a 125 millones de personas, cifra que representa entre el 2 y 3% de la población mundial y la tasa de prevalencia puede variar entre 0.33 al 2% según la etnia y/o la edad en la que inicia el desarrollo de la enfermedad (Bu et al., 2022).

Las causas de la psoriasis no están claras, pero diversos estudios han demostrado que se ven involucrados los factores ambientales y la predisposición genética (NIAMS, 2020; Das, 2021). Sin embargo, cualquier causa de la enfermedad desencadena en las células inmunitarias y no inmunes de la piel, un aumento de la producción de múltiples citocinas proinflamatorias, por lo que la psoriasis puede llegar a ser una enfermedad sistémica, producida por la interacción de las diversas citocinas proinflamatorias (Korman, 2020). Las comorbilidades con las que se asocian son: artritis psoriásica, inflamación intestinal, hígado graso no alcohólico, y algunos desordenes metabólicos como la diabetes mellitus, obesidad y aterosclerosis (Yamanaka et al., 2021).

La calidad de vida de los pacientes con psoriasis también se ve afectada, ya que se relaciona con ansiedad y depresión dependiendo del grado de severidad de la psoriasis (leve, moderada o grave). En México, según López-Mejía et al. (2022), el 57.1% de pacientes con psoriasis grave tienen una fuerte repercusión en su calidad de vida. Dependiendo de la severidad y la variante clínica de la psoriasis se designa el tratamiento, considerando las necesidades individuales de cada paciente (Bocheńska et al., 2021). Actualmente, las opciones terapéuticas se engloban en tres categorías: terapia tópica, fototerapia y tratamientos sistémicos (Das, 2021; Raharja et al., 2021). Sin embargo, derivado de las necesidades individuales de los pacientes, los tratamientos tienen diversas limitantes como edad, historial de enfermedades, embarazo, entre otras. Y efectos secundarios como inflamación, quemaduras, ardor y/o sensibilidad (Miron et al., 2020; Bocheńska et al., 2021). Además de estos factores a considerar, se suma la falta de eficacia de los tratamientos y costos elevados que los pacientes deben pagar para tener acceso a dichos tratamientos (Bocheńska et al., 2021).



Por otro lado, hay estudios que demuestran la efectividad de sustancias derivadas de plantas que pueden ser consideradas para su empleo en la formulación de nuevos tratamientos dirigidos a modular la proliferación de las células del sistema inmune, la producción de citocinas y algunas otras moléculas en la respuesta a la inflamación en diversas enfermedades de la piel, como la psoriasis (Bocheńska et al., 2021).

Para ello, primero se realizan estudios *in vitro*, donde se simulan procesos inflamatorios, como los que ocurren en la psoriasis y su interacción con diversas moléculas o compuestos para poder ser estudiado. De esta forma, se determinan las sustancias potenciales que puedan ser aplicadas como tratamiento de la enfermedad (Sarama et al., 2022). Dentro de los diferentes modelos *in vitro*, los monocultivos son óptimos para abordar inicialmente la respuesta en un tipo de célula específica. Esto permite tener un ambiente controlado, sin las interacciones entre tejidos y estructuras complejas que puedan interferir, en la respuesta de las células involucradas en la psoriasis ante un estímulo determinado (Sarama et al., 2022).

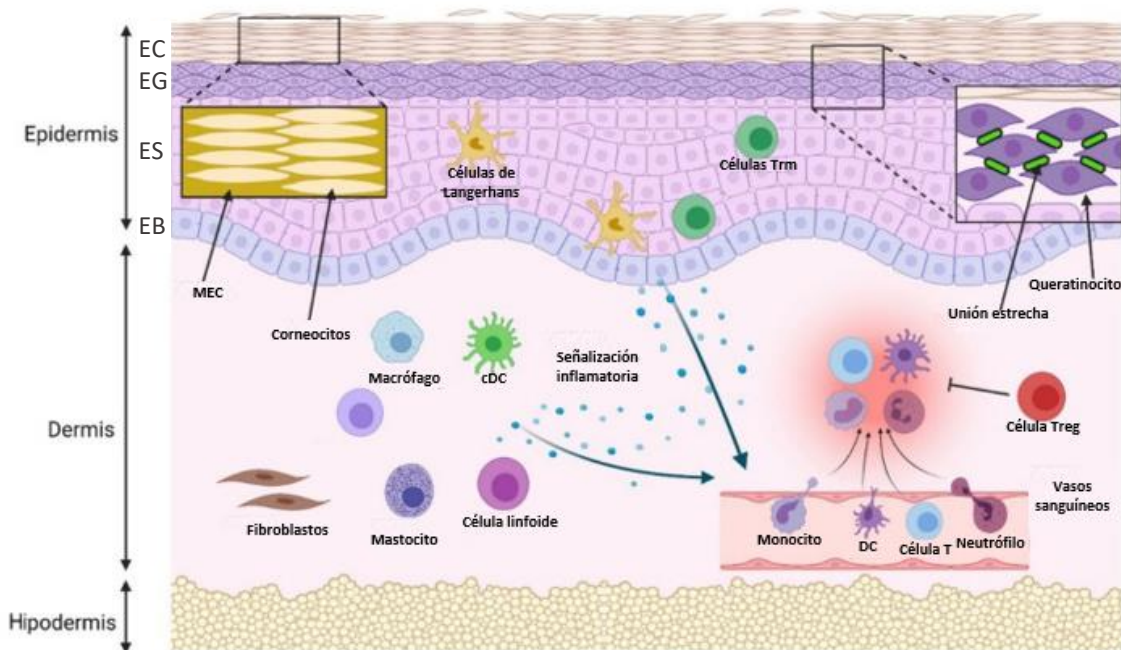
En este proyecto, se adaptaron modelos *in vitro* en monocultivos de queratinocitos y células del sistema inmune involucradas en la psoriasis para evaluar las respuestas inflamatorias y proliferativas de las plantas *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* y el preparado herbal Triphala (*Emblica officinalis*, *Terminalia chebula* y *Terminalia belerica*).

## 1.1 Antecedentes

La psoriasis es caracterizada por la inflamación en respuesta a la interacción entre queratinocitos y células del sistema inmune, sobre todo con células Langerhans, células T y macrófagos. Esto resulta en un engrosamiento profundo de la piel causado por la hiperproliferación de queratinocitos, lo que se conoce como acantosis (Grän et al., 2020; Orsmond et al., 2021). A continuación, revisaremos la composición de la piel y las vías moleculares que están implicadas en la psoriasis.

### 1.1.1 Irregularidades de la piel en la psoriasis

La piel es una barrera cutánea física e inmunitaria que provee protección al cuerpo, ésta sufre una desregulación a causa de la inflamación en la psoriasis. Comúnmente la estructura de la piel sana está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1) (Orsmond et al., 2021), en donde se detallará a continuación sola la epidermis y dermis.



**Figura 1.** Estructura de la piel. La piel está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis está compuesta de células basales en el estrato basal (EB) que se diferencian a queratinocitos, los cuales se van desplazando por el estrato espinoso (ES) y al estrato granuloso (EG), hasta llegar al estrato córneo (EC), donde llegan como corneocitos. La dermis está compuesta de fibroblastos y células inmunitarias residentes, pero también hay vasos sanguíneos que en caso de ser necesaria una respuesta de defensa, permiten el arribo de otras células inmunitarias. La hipodermis está compuesta por adipocitos. *Fuente:* Modificado de Orsmond et al., 2021.

### 1.1.1.1 Epidermis

La epidermis está conformada principalmente de queratinocitos y constituida por cuatro estratos (Figura 1). Primero, se encuentra el estrato córneo que conforma las capas de queratinocitos más superficiales, que están en contacto con el ambiente (Betts et al., 2022). Los queratinocitos se forman a partir de la diferenciación de las células basales en el estrato basal y tardan aproximadamente 30 días en llegar al estrato córneo (Betts et al., 2022; Sarama et al., 2022). En la piel psoriásica, la migración de los queratinocitos se ve acelerada debido a que llegan al estrato córneo en aproximadamente 6 ó 7 días (Raharja et al., 2021).

Cabe resaltar que el estrato córneo normalmente está compuesto por una alta concentración de queratina que es obtenida a través de la cornificación, proceso que sucede en los queratinocitos diferenciados para transformarse en células no vivas (corneocitos), que se encargan de la protección mecánica, la prevención de la introducción de microbios al organismo y evitar la deshidratación de los tejidos (Betts et al., 2022).

Los corneocitos, a su vez, están rodeados por una matriz extracelular (MEC) rica en lípidos. El lípido más común en la matriz es la ceramida que tiene correlación con la pérdida de agua y potencia la inflamación mediada por la interleucina (IL) 17, respuesta que también induce al aumento de colesterol en los queratinocitos y la disminución en los niveles de ácidos grasos de cadena corta en la psoriasis (Chiricozzi et al., 2018; Orsmond et al., 2021). También las conexiones celulares se ven afectadas, como las córnedesmosinas, proteínas asociadas a la adhesión célula-célula, que en la piel sana se degrada en el estrato córneo, pero en la psoriasis estas proteínas están intactas (Orsmond et al., 2021). Además de las IL-17, existen otras interleucinas, que son una familia de proteínas biológicamente activas dentro de las citocinas, que regulan funciones inmunitarias e inflamatorias (Meager, 2006) y que seguiremos abordando sus funciones dentro de la psoriasis.



**Figura 2. Placas psoriásicas cubiertas por escamas en los codos.** Fuente: Das, 2021

El estrato córneo presenta un engrosamiento anormal en piel psoriásica, lo que se conoce como hiperqueratosis (Orsmond et al., 2021). Este efecto ocurre cuando hay paraqueratosis, esto es cuando los queratinocitos presentan una diferenciación incompleta, pero conservan su núcleo celular. Estos sucesos conducen a la formación de escamas en la piel que visiblemente caracterizan a esta enfermedad (Figura 2). Otro rasgo distintivo, es que se disminuye o se suprime el estrato granular, causando que la epidermis se extienda y los vasos sanguíneos se ensanchen (Lowe et al., 2007).

También en la epidermis residen las células T reguladoras de memoria (T<sub>RM</sub>) y células de Langerhans (un subtipo de células dendríticas encargadas de la presentación de antígenos). Las células T<sub>RM</sub> producen IL-

17 y la IL-22. Con estas citocinas, inducen la hiperproliferación de queratinocitos que promueven y sostienen la aparición las placas psoriásicas (Grän et al., 2020; Orsmond et al., 2021).

### 1.1.1.2 Dermis

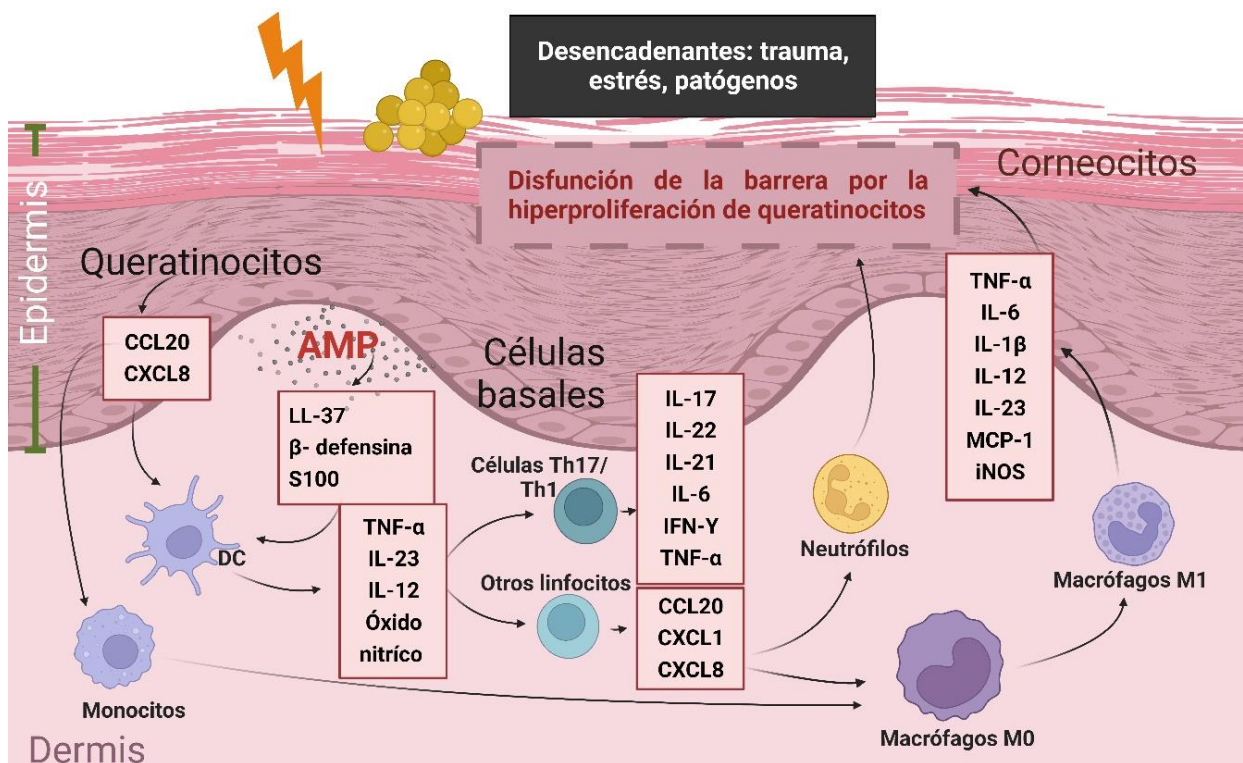
La dermis está conformada por diversas estructuras como los vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, folículos pilosos y glándulas sudoríparas. Los tejidos que constituyen a la dermis constan de dos capas de tejido conjuntivo conectadas por una malla de elastina y fibrina que son producidas por los fibroblastos (Betts et al., 2022). En la epidermis también residen macrófagos, células dendríticas (cDC), mastocitos, células T reguladoras, células linfoides; todas las células están inactivas mientras no haya inflamación, pero en la psoriasis se activan induciendo la respuesta del sistema inmune (Lowes et al., 2007; Orsmond et al., 2021). La función de los fibroblastos en el desarrollo de la psoriasis es incrementar las especies reactivas de oxígeno (ROS) por lo que decae la capacidad antioxidante, aumenta producción de IL-6 e IL-8 y promueve la proliferación de queratinocitos al estimular la proteína quinasa (MAPKs) activada por mitógeno (Wroński y Wójcik, 2022).

### 1.1.2 Vías moleculares involucradas en la psoriasis

Aunque las causas exactas de la psoriasis aún no están completamente claras, se sabe que es una enfermedad multifactorial. Diversos estudios, como la revisión de Ogawa y Okada en 2020, han señalado que la predisposición genética tiene una función importante en su desarrollo. No obstante, existen factores desencadenantes como el trauma, el estrés o la presencia de patógenos que pueden provocar una respuesta exagerada del sistema inmune y de las células de la piel (Figura 3) (Das, 2021; Sarama et al., 2022). Independientemente del factor desencadenante, los primeros en responder ante el daño tisular serán los queratinocitos, y por ende serán los responsables de producir péptidos antimicrobianos (AMPs) como el péptido LL-37,  $\beta$ -defensinas, S100A7/8/9/15 (Morizane y Gallo, 2012; Gaspari et al., 2017) y quimiocinas como CCL20, CXCL1, CXCL8 (Sarama et al., 2022), ya que éstas son importantes para el reclutamiento de células inmunológicas (Figura 3).

Estas moléculas reclutan primero a las células dendríticas las cuales se activan y liberan el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-23, IL-12 y radicales de óxido nítrico (ON) (Gaspari et al., 2017). La liberación de IL-23 provoca la diferenciación de células T vírgenes a células Th17, cuando éstas se activan

sobreproducen IL-17 e IL-22 (Gendrisch et al., 2021; Ogawa y Okada, 2020). Por otro lado, la liberación de IL-12 promueve la diferenciación de T vírgenes a células Th1 (Ogawa et al., 2018). También las células dendríticas son responsables del reclutamiento de neutrófilos (Gaspari et al., 2017).



**Figura 3.** Vías moleculares involucradas en la psoriasis. Cuando la piel recibe un daño, los queratinocitos producirán diversas moléculas (representadas en cada cuadro dependiendo de las células), en las que se encuentran AMPs y quimiocinas, las cuales desencadenarán el reclutamiento de células inmunológicas y la activación de células dendríticas (DC) como respuesta. Las moléculas producidas por las células, las residentes activadas y las reclutadas, provocan una respuesta exacerbada en los queratinocitos. De esta manera el efecto de los queratinocitos provoca la disfunción de la barrera. Fuente: Modificado de Sarama et al., 2022.

Los macrófagos residentes e infiltrantes tienen, de igual manera, una función en el desarrollo y la exacerbación de la psoriasis. Dentro de la categoría de macrófagos infiltrantes están: activados clásicamente (M1) y macrófagos activados alternativamente (M2) (Kamata y Tada, 2022). En pacientes con psoriasis se muestra un aumento de monocitos circulantes en sangre periférica y macrófagos que se polarizan principalmente a M1. Se ha demostrado que en el fenotipo M1 tienen un perfil proinflamatorio ya que producen moléculas como: IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, TNFα y especies reactivas de oxígeno (iNOS, por sus siglas en inglés) (Kamata y Tada, 2022; Kim et al., 2022).

No solo los macrófagos y neutrófilos son reclutados; también otras células inmunes innatas, como las células dendríticas plasmocitoides, desempeñan un papel importante. En las etapas tempranas de la psoriasis, estas células producen IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , lo que puede desencadenar la diferenciación y maduración de las células dendríticas (DC) y aumentar la expresión de receptores de IL-22, potenciando así la respuesta de los queratinocitos a esta interleucina (Guo et al., 2023).

### 1.1.2.1 Citocinas involucradas

De acuerdo con Grän et al. (2020) y Yamanaka et al. (2021) las citocinas y moléculas más importantes involucradas en la psoriasis son las siguientes:

- La IL-23 es producida por macrófagos y principalmente por las células dendríticas. Las vías de señalización de IL-23 está mediada por cinasas Jano (JAK). El rol de esta citocina en una respuesta inflamatoria es estimular la producción de TNF $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias, por ejemplo, la IL-23 estimula las células Th17 y promueve la producción de IL-17 (Guo et al., 2023). Cabe señalar que las células Th17, aunque no es productora de esta citocina, participan en el incremento de ésta. Esta citocina es sobre expresada en piel psoriásica. Además, es de importancia dentro de la patogenia, ya que se ha demostrado que la administración de IL-23 en ratones producen lesiones similares en psoriasis.
- Se han identificado 6 isoformas de la IL-17, provenientes principalmente de células Th17, y de menor producción en macrófagos, neutrófilos, mastocitos, las células NK y células B. Además, la IL-17 induce la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en fibroblastos y macrófagos.

Los homodímeros IL-17A e IL-17F tienen un efecto directo en los queratinocitos para estimular la producción de citocinas, péptidos antimicrobianos (S,  $\beta$ -defensinas, quimiocinas (CXCL2, CXCL8 y CCL20), que reclutan neutrófilos, macrófagos y linfocitos (Guo et al., 2023).

- Las células epiteliales y fibroblastos tienen receptores de la IL-22, su señalización se realiza a través de STAT3. Las células Th1/17/22, linfocitos CD8 y NK son las encargadas de producir estas citocinas. En la psoriasis aumenta su expresión, ya que promueven el engrosamiento y descamación de la epidermis a través de la inducción de migración y limitación de la diferenciación correcta de queratinocitos.

- Los macrófagos, monocitos, linfocitos y queratinocitos producen TNF- $\alpha$ , la cual induce la proliferación de células CD4 y la producción de quimiocinas y citocinas.

### 1.1.3 Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* son ampliamente utilizados para evaluar las respuestas celulares en el estudio de la psoriasis en un ambiente controlado y con resultados reproducibles. En el caso de la psoriasis, los primeros modelos en monocapa de queratinocitos aislados de piel psoriásica perdían su perfil característico y presentaban limitaciones en el crecimiento celular y faltaba de heterogeneidad en los resultados. En cambio, las líneas celulares como queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) o queratinocitos humanos primarios (HEK) han demostrado desarrollar un efecto psoriásico al ser estimulados con citocinas (Sarama et al., 2022).

Actualmente, hay un amplio campo de estudios donde al utilizar el coctel de citocinas (también conocido como coctel M5) integrado por IL-17A, IL-22, oncostatina M, IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$  en líneas celulares de queratinocitos HaCaT y NHEKs, se imita el entorno inflamatorio de la psoriasis y ha permitido identificar biomarcadores clave para esta patología (Bielecka et al., 2024; Caifeng Chen Li Chen y Zhang, 2023; Guilloteau et al., 2010; Sarama et al., 2022). Como la expresión genética de: BD2, CXCL8, IL-6, S100A7 (Guilloteau et al., 2010); TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 y h-BD2 (Chen et al., 2018); IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-23A, MCP-1 y proteínas de queratina (KRT) tipo II como KRT6 y KRT1 (Gao et al., 2020).

De igual forma, se han asociado a las líneas celulares de macrófagos en los estudios de psoriasis inducidos con lipopolisacáridos (LPS), debido a su papel en la respuesta inflamatoria produciendo óxido nítrico (NO), TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-6. Por lo tanto, se ha demostrado su efecto en RAW264.7 en la disminución de la producción de NO, L-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  (Takuathung et al., 2021).

Balkrishna y colaboradores en el 2019 realizaron un estudio *in vitro* en células de monocitos humanos (THP-1) estimuladas por LPS, en las que se evaluaron actividades antiinflamatorias del aceite de espinocerval de mar, en donde se cuantificó la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) y la expresión de citocinas pro-inflamatorias. Las RNS disminuyeron al igual que la expresión de genes de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . Con estos modelos *in vitro* de macrófagos se han podido estudiar los efectos de diversos compuestos.

#### 1.1.4 Plantas: fuente de posibles agentes terapéuticos

Se han obtenido diversos productos derivados de plantas que pueden tener un perfil farmacocinético seguro y eficaz con efectos anti-psoriásicos, con actividad antiproliferativa y antiinflamatoria, en pruebas *in vitro*, por lo que pueden considerarse como potenciales compuestos terapéuticos (Miron et al., 2020). Por esta razón, en este estudio se abordó plantas nativas de Baja California o India, que son utilizadas en la medicina tradicional en el tratamiento de heridas en la piel que pudieran tener efectos anti-psoriásicos. Los efectos pueden ser producidos por metabolitos secundarios llamados compuestos bioactivos que pueden clasificarse en tres clases principales: compuestos fenólicos, alcaloides y terpenos (Azmir et al., 2013; Rahman et al., 2022).

Según Azmir y colaboradores (2013), estos compuestos bioactivos se sintetizan a partir de cuatro principales vías de síntesis de metabolitos: del ácido shikímico, ácido malónico, ácido mevilónico y del no mevilonato. Esto permite clasificar los compuestos en categorías ya que tienen estructuras generales (Figura 26). Los grupos funcionales de estas estructuras permiten interactuar con enzimas, radicales libres y mediadores de la inflamación, como por ejemplo el grupo hidroxilo (-OH) o dobles enlaces entre carbonos, lo que les confiere propiedades antiinflamatorias o antioxidantes (Rahman et al., 2022).

##### 1.1.4.1 *Anemopsis californica*

Esta planta nativa del suroeste de América del Norte y norte de México, también conocida como Yerba del manso o Yerba mansa, es abundante en áreas pantanosas (Rangel, 1998; California Native Plant Society, 2024). *Anemopsis californica* es utilizada con diversos propósitos medicinales, sobre todo su aplicación externa en afecciones en la piel como quemaduras, llagas y cortadas (California Native Plant Society, 2024; López Vázquez, 2019). Sin embargo, aún se requieren estudios que corroboren su actividad antiinflamatoria y/o efecto sobre psoriasis.

##### 1.1.4.2 *Artemisia californica*

*Artemisia californica* pertenece a la familia Asteraceae y comparte el género *Artemisia* con más de 500 especies. Este género se destaca por tener importancia en la medicina popular en diferentes culturas en las que destacan por tener propiedades con efectos antinflamatorios, analgésicos y antipalúdicos. Algunos



de los compuestos que están dentro del género *Artemisia* que podrían inducir estos efectos pueden destacar: terpenos, alcaloides, fenoles y poliacetilenos (Filomena et al., 2019).

En California y Baja California la planta nativa *Artemisia californica* es también conocida como Romerillo; es un arbusto aromático que reside en matorrales de salvia costeros y chaparrales (California Native Plant Society, 2024). Es usada en tratamientos medicinales tradicionales en afecciones como lavado de heridas, problemas respiratorios y menstruales (California Native Plant Society, 2024). Dependiendo de la afección se puede utilizar externamente como una decocción, cataplasma o ungüento (Filomena et al., 2019).

Por otro lado, Lee et al. (2018) demostró que el extracto etanólico de *Artemisia capillaris*, perteneciente a la misma familia de *Artemisia californica*, tiene un efecto antiproliferativo en un modelo murino inducido por IMQ y verificado en células HaCaT. En este estudio, se redujo la proliferación de queratinocitos observado en los ensayos de anti-proliferación y disminuyó el dolor en los ratones utilizando la escala PASI (Lee et al., 2018; Hsueh et al., 2021).

#### 1.1.4.3 *Hemidesmus indicus*

*Hemidesmus indicus*, nativa de la India y Malasia, es llamada por diversos nombres en diferentes dialectos indios, pero comúnmente conocida como Sarsaparilla india, Falsa Sarsaparilla o Hindisalsa (Nandy et al., 2020). En la revisión realizada por Nandy et al. (2020) recalca su uso como agente antiaterogénico, antiespasmódicos, inmunopotenciador, antiinflamatorio y estimula la retención de la memoria. Sus presentaciones pueden ser en aceite, cremas tópicas o pastillas. Dentro del uso en el tratamiento de enfermedades tópicas está la psoriasis.

*Hemidesmus indicus*, es una planta utilizada por el Ayurveda. Este es un sistema de medicina tradicional y alternativo del subcontinente indio, que basa su conocimiento en la naturaleza y función del cuerpo humano. Sin embargo, carece de fuentes en la literatura, ya que se desconocen muchos de los componentes activos de estos medicamentos a base de hierbas (Jaiswal y Williams, 2017).

#### 1.1.4.4 *Eclipta prostrata*

La falsa margarita, Bhringraj o *Eclipta prostrata*, es considerada como una maleza común en la India, pero

su aplicación en la etnomedicina es de interés. Se utiliza en el Ayurveda y el Sistema Tradicional Chino (MTC) para el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas las enfermedades de la piel como dermatitis seborreica, vitíligo, eczema y heridas (Feng et al., 2019).

En un estudio realizado por Nakbanpote et al. (2019) se encontró que los extractos etanólicos de la hoja de *E. prostrata*, planta conocida por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, presentó efectos antiproliferativos en células HaCaT. Sin embargo, los resultados sugieren que pudiera tener una baja eficiencia en el tratamiento de las psoriasis, aunque recalcan que algunos de sus componentes pueden ser candidatos en estos tratamientos.

#### 1.1.4.5 Preparado herbal Triphala (*Emblica officinalis*, *Terminalia chebula* y *Terminalia bellerica*)

En el Ayurveda, este es un preparado herbal de *Emblica officinalis* (Amla), *Terminalia chebula* (Combretaceae) y *Terminalia bellerica* (Bibhitaki) en porciones iguales, y es la formulación herbal con mayor preferencia en sus prácticas médicas del Ayurveda. Se ha demostrado que este conjunto herbal tiene actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabético, analgésico, inmunomoduladora, entre otras (Kumar et al., 2016).

*Emblica officinalis*, nativa de India, por sí sola tiene actividad antioxidante bien reconocida, ya que está involucrada en la reducción de la peroxidación lipídica (Almatroodi et al., 2020). También se demostró su efecto al reducir ROS hidropéroxido lipídico en líneas celulares de hepatocitos (HepG2) (Nakbanpote et al., 2019). Además, también se determinó el efecto antiinflamatorio, al inhibir citocinas pro-inflamatorias, en las que se encuentran la IL-6 en una IB3-1 CF (células bronquiales epiteliales) (Almatroodi et al., 2020).

Uno de los usos tradicionales de *Terminalia chebula*, planta nativa de India, como tónico, es usarse en el tratamiento para la cicatrización de heridas y enfermedades de la piel (Nigam et al., 2020). En la revisión de Nigam et al. (2020) se menciona un estudio en modelos de artritis inducida en ratones, en donde disminuyó el nivel sérico de TNF- $\alpha$ , TNF-R1, IL-6 e IL-1 $\beta$ . También determinaron su actividad inhibitoria de iNOS en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos.

Por último, *Terminalia bellerica*, planta nativa de la India y proveniente de la misma familia de *Terminalia chebula*, ha mostrado actividad antioxidante y su actividad antiinflamatoria en ratas Wistar albinas (Gupta et al., 2021).

A partir de los estudios anteriores a este proyecto, se planteó hacer uso de los extractos de diferentes plantas usadas en la medicina tradicional como *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* y el preparado herbal Triphala, para profundizar o realizar un primer acercamiento del posible efecto antipsoriásico y seleccionar aquellas plantas que tengan un efecto antiproliferativo o antiinflamatorio en células involucradas en la psoriasis. De esta forma, se aportará un estudio con un sustento científico acerca del potencial de estas plantas en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos antipsoriásicos.

## 1.2 Justificación

La psoriasis es una enfermedad crónica que afecta aproximadamente a 125 millones de personas en el mundo. Su tratamiento puede variar dependiendo del grado de severidad de psoriasis en los pacientes; sin embargo, la accesibilidad a estos se ve comprometida por el costo. Además, muchos de los tratamientos tienen efectos secundarios y/o no son eficaces. Por lo que, dentro de los objetivos terapéuticos en los tratamientos anti-psoriásicos es reducir y/o inhibir la hiperproliferación de queratinocitos y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Lo que ha llevado a la búsqueda de opciones terapéuticas eficaces y seguras.

En este contexto y con la finalidad de estudiar los efectos anti psoriásicos en células que participan en la patogenia, diversos grupos de trabajo han implementado modelos de estudio *in vitro*, que mimetizan los microambientes generados en los procesos hiperproliferativos e inflamatorios de queratinocitos y células inmunes asociadas. Por lo que, en este proyecto, se aborda el estudio de plantas que tienen reconocimiento en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas en piel, pero que aún no se han generado hallazgos científicos que promuevan su evidencia.

## 1.3 Hipótesis

Al menos uno de los extractos de *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* o del preparado herbal Triphala, tendrá efectos antiproliferativos y/o antiinflamatorios, en queratinocitos y/o macrófagos estimulados con moléculas pro-inflamatorias asociadas a psoriasis.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar los efectos antiproliferativos y/o antiinflamatorios de los extractos herbales etanólicos y/o acuosos de *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* y el preparado herbal Triphala, en células involucradas en psoriasis.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones asociadas a psoriasis en macrófagos para definir los extractos herbales con actividad antiinflamatoria.
- Establecer las condiciones asociadas a psoriasis en queratinocitos para realizar ensayos de proliferación y/o actividad antiinflamatoria de los extractos herbales.
- Determinar el efecto modulador antiproliferativo y/o antiinflamatorio de los extractos herbales en la expresión génica de queratinocitos y macrófagos estimulados.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Obtención de extractos herbales

#### 2.1.1 Obtención del material vegetal

Se adquirió el Anantamul (*Hemidesmus indicus*), el Bhringaraj (*Eclipta prostrata*) y el preparado herbal Triphala (*Emblica officinalis*, *Terminalia bellirica* y *Terminalia chebula*) en polvo de Banyan Botanicals®. *Anemopsis californica* y *Artemisia californica* se adquirieron por donación de la Dra. Carolina Gutiérrez Sánchez en Medio Ambiente y Desarrollo de UABC. Las plantas fueron lavadas con agua destilada por separado y se apartaron las hojas del tallo. En el caso de *Artemisia californica* (Figura 4), por recolectarse en época de polinización, se separaron las semillas de la hoja.



Figura 4. Tallo, hoja y semillas de *Artemisia californica*.

Las hojas se secaron en horno a una temperatura de ~50° C y se pesaron constantemente cada hora. Las hojas se retiraron del horno (Thermo Scientific™ Vacuum Oven) hasta que su peso en gramos no tuviera diferencia a la vez anterior, de esta forma se atribuye a una deshidratación completa a 48 h aprox. Cuando las hojas se consideraron completamente secas, se trituraron hasta obtener un polvo fino. Los polvos de cada hoja fueron almacenados a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro.

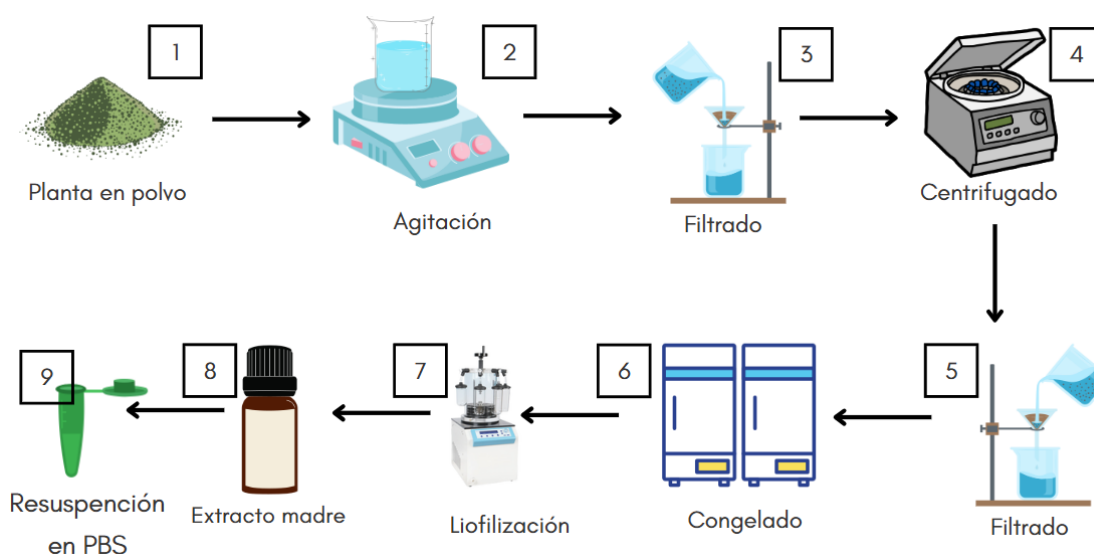
#### 2.1.2 Preparación de extracto acuoso

Se siguió el protocolo descrito por Cárdenas (2019) con las siguientes modificaciones (Figura 5). Para cada extracto se pesó el polvo de las plantas y se preparó con agua destilada en una relación planta-agua 1:10 (p/v) a 75°C por 5 min en agitación a 500 rpm (CORNING, PC420-D). Después se filtró con filtros

convencionales para café y se centrifugó (Kendro Heraeus Multifuge 1 S-R) a 4500 rpm por 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró nuevamente. Las muestras se congelaron por al menos 24 h a -80°C y se liofilizaron (FreeZone™, LABCONO). Se obtuvo el porcentaje de rendimiento de los extractos con la ecuación (1). Se almacenó la solución madre del extracto a 4°C sin luz.

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final seco}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Los extractos acuosos fueron filtrados con un filtro de 0.2 µm (Corning®) y resuspendidos en PBS a concentraciones establecidas.



**Figura 5. Preparación de extractos acuosos. 1) El material triturado. 2) Agitación en agua destilada con el material triturado a 75° C por 5 min. 3) Primera filtración. 4) Centrifugado a 4500 rpm. 5) Segunda filtración. 6) Refrigeración del material recuperado a -80°C por 24 h. 7) Liofilización del material. 8) Extracto madre a 4°C sin luz. 9) Resuspensión del material en PBS.**

### 2.1.3 Preparación de extractos etanólicos

Se realizaron dos extracciones etanólicas (Figura 6). La primera aplicando la metodología que el extracto acuoso, solo que, al polvo de cada planta se le añadió etanol absoluto con la proporción 1:10 (p/v) y se mantuvo en agitación (500 rpm) por 5 min (Figura 6, paso 2-A). En el segundo método se trató de simular las condiciones de una tintura, que es como se aplican los extractos de las plantas como uso tradicional, por lo que, en vez de ser una agitación por 5 minutos, el polvo y el etanol (respetando la misma proporción)

se depositaron en un frasco ámbar por una semana y una agitación manual diaria (Figura 6, paso 2B). Después se siguió con la metodología descrita, en donde se filtró y se centrifugó a 4500 rpm por 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró nuevamente. Las muestras se concentraron a través de evaporación utilizando el equipo Rocket de Genevac siguiendo las recomendaciones del proveedor (Figura 6). Se obtuvo el porcentaje de rendimiento para conocer la concentración de los extractos con la ecuación (1).

Se guardó el extracto madre que contenía el concentrado seco a 4°C y sin luz para realizar las pruebas futuras. Los extractos se reconstituyeron en DMSO a una concentración menor al 1% en las soluciones de trabajo y el resto se reconstituyó en PBS.



**Figura 6. Preparación de extracto etanólicos.** 1) El material triturado. 2) A) Agitación por 5 min en etanol puro con el material triturado o B) maceración en etanol puro con el material triturado por 7 días con una agitación diaria. 3)Primera filtración. 4) Centrifugado a 4500 rpm. 5) Segunda filtración. 6) Refrigeración del material recuperado a -80°C por 24 h. 7) Liofilización del material. 8)Extracto madre a 4°C sin luz. 9) Resuspensión del material en DMSO menor a 1%/PBS.

### 2.1.3.1 Determinación de contenido fenólico de los extractos

Los fenoles son compuestos que pueden participar en procesos antiinflamatorios, por lo que a través del ensayo Folin-Ciocalteu se puede determinar el contenido fenólico. El protocolo fue modificado de Rubio-Elizalde (2019). Para poder realizar este ensayo se requirió una curva de referencia, que en este caso fue de ácido gálico, en las que se trabajó en concentraciones de 0 a 600 nM. Para determinar el contenido

fenólico de cada muestra se realizó una interpolación utilizando la ecuación (2), donde “y” es la absorbancia y “x” era la concentración.

$$y = 0.0007x - 0.006 \quad (1)$$

La curva de referencia (Figura 27) y la determinación de las muestras se trabajaron en una placa de 96 pozos, en donde a cada pozo se agregaron 100  $\mu$ l del reactivo Folin-Ciocalteu a 0.2 N. Después de 5 minutos se agregó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 700 nM y se incubó sin luz a temperatura ambiente por 2 h. La absorbancia se leyó a 760 nm (Epoch, BioTech).

## 2.2 Selección de extractos herbales mediante ensayos en macrófagos

Antes de continuar con los ensayos en queratinocitos, se seleccionó un tipo de extracto acuoso o etanólico, para cada planta a través de ensayos en macrófagos con un perfil inflamatorio. También se eligió una sola concentración para cada tipo de extracto.

Esta selección se llevó a cabo a través de una serie de consideraciones bioquímicas y biológicas de los extractos que permitieron realizar un primer acercamiento en macrófagos:

1. Se descartaron los primeros extractos que no se concentraron al realizar la liofilización o la evaporación del solvente, ya que no se obtuvo un porcentaje de rendimiento que pudiera ser considerado.
2. Solo los extractos que pudieron ser resuspendidos en PBS o DMSO pudieron ser utilizados en los ensayos posteriores.
3. Con los extractos homogenizados, se evaluó el contenido fenólico y la citotoxicidad de las cinco concentraciones de trabajo (500  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml, 125  $\mu$ g/ml, 62.5  $\mu$ g/ml y 31.25  $\mu$ g/ml).
4. Por último, se realizó la selección de extractos con indicios de una respuesta antiinflamatoria a través de la cuantificación de la expresión de genes en macrófagos M1.



Para el punto 4 se realizaron varios ensayos los cuales se describen a continuación.

### 2.2.1 Cultivo de macrófagos

Para realizar el primer cribado biológico de los extractos, se evaluó su potencial antiinflamatorio en la línea celular monocítica de leucemia humana (THP-1, ATCC) que se cultivó y mantuvo en medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con suero bovino fetal (Biowest) al 10% o en el caso de la estimulación con LPS (BioXtra, Sigma-Aldrich) al 5%, antibiótico (Gibco) al 1%, en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Con la finalidad de diferenciar los monocitos a macrófagos activos con perfil pro-inflamatorio (M1) se requirió de tratamientos previos con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y lipopolisacáridos (LPS) (Huang et al., 2019; Shi et al., 2022).

#### 2.2.1.1 Estandarización de diferenciación de monocitos a macrófagos

El uso de PMA es ampliamente aceptado para diferenciar los monocitos THP-1 a macrófagos M0, también llamados macrófagos en reposo o inactivados (Zhang et al., 2022; Zhao et al., 2017). Sin embargo, dependiendo del tiempo y concentración de PMA provoca variantes en cambios morfológicos y moleculares (Pinto et al., 2021). A través de una búsqueda en la literatura, se seleccionaron las concentraciones de 50 y 100 nM de PMA por 24 h para evaluar sus efectos en las células THP-1 y elegir la concentración más adecuada (Starr Tregel et al., 2018).

Se trabajó en una placa de 24 pozos (Corning) con  $3.6 \times 10^4$  células en 400  $\mu$ L por pozo con un duplicado de concentraciones a 50 nM y 100 nM de PMA (Sigma-Aldrich). Como primera selección de la concentración a trabajar en los futuros ensayos se verificó el cambio morfológico, por lo que se tomaron fotografías a las 0 h y 24 h posteriores a la adición de PMA.

#### 2.2.1.2 Establecimiento de modelo de inflamación con LPS

La polarización de los macrófagos M0 a M1 con perfil proinflamatorio es inducido por LPS (Huang et al., 2022). Al igual que el PMA, el LPS es utilizado en diferentes concentraciones y tiempo que abarcan de 1 ng/ml a 1  $\mu$ g/ml por 24 h (Dueñas et al., 2023). A través de una búsqueda en la literatura, se seleccionaron

las concentraciones de 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1 µg/ml de LPS por 24 h para evaluar sus efectos en las células THP-1 en medio RPMI-1640 con SBF a 5% para no sobre activarlas y elegir una concentración.

Para determinar la concentración óptima de LPS, primero se seleccionó la concentración de 100 nM de PMA y se siguió la metodología de la sección 2.2.1.1. Después de 24 h se retiró el medio con PMA, se hizo un lavado con PBS y se agregó medio con las diferentes concentraciones de LPS (10 ng/ml, 100 ng/ml y 1 µg/ml). Finalmente se observaron cambios principalmente morfológicos a través de un registro fotográfico a las 0h y 24 h posteriores de añadir el LPS.

## 2.2.2 Ensayo de viabilidad celular

Con el fin de evaluar la respuesta de las células ante los diferentes extractos, primero se determinó el grado de citotoxicidad en diferentes concentraciones en macrófagos. Se utilizó la metodología según Rentería Pacheco (2023) para evaluar la citotoxicidad de los macrófagos a través de un ensayo con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (Promega). Las células THP-1 se sembraron  $1 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos (Corning) en medio completo con PMA a 100 nM. Después de 24 h se retiró el medio y se adicionó medio con las diferentes concentraciones del extracto (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml y 31.25 µg/ml) durante 24 h. Después de las 24 h, se retiró el medio y sustituyó con medio completo y 10 µl de MTS a cada pocillo. Después, las placas se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 2 h. La absorbancia se leyó a 490 nm con un lector de microplacas (Epoch, BioTech).

## 2.2.3 Evaluación actividad antiinflamatoria mediante RT-qPCR

Para determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos con una sola concentración en los macrófagos, se realizó una evaluación de la expresión de genes de las moléculas pro-inflamatorias IL-6 y TNFα. En la siguiente sección, se describen los pasos.

### 2.2.3.1 Extracción de ARN

Primero se incubaron las células THP-1 en placas de 24 pozos con  $2 \times 10^5$  células/pozo, donde se

estimularon previamente con 100 nM de PMA y posteriormente con 100 ng/ml de LPS con la metodología descrita anteriormente para inducir la respuesta inflamatoria. De esta forma se indujo una polarización de THP-1 a M1.

Después de la estimulación con LPS se realizaron co-tratamientos por 24 h con LPS y los extractos por individual: los extractos acuosos de *H. indicus*, *E. prostrata*, *Anemopsis californica*, *Artemisia californica* y el extracto etanólico de Triphala a una concentración de 125 µg/ml.

Después de las 24 h del tratamiento con los extractos de las plantas se realizó un lavado con PBS para proceder a la extracción de ARN total con TRI Reagent (ThermoFisher), utilizando 1-bromo-2-cloropropano (Sigma-Aldrich) para separar la fase acuosa de las fase orgánica e inorgánica. Se centrifugó (Centrifuge 5417R, Eppendorf) a 12,000 g por 12 min. Se recuperó el ARN y se agregó isopropanol (Sigma-Aldrich) para centrifugar a 12,000 g por 10 min y precipitar el ARN, después se retiró el sobrenadante. Se agregó etanol al 75% para hacer un lavado al precipitado de ARN, se volvió a centrifugar a la misma velocidad, pero por 8 min. Se retiró el etanol y el material se resuspendió en agua DEPC. Se determinó la calidad y concentración de ARN con el equipo NanoDrop y se verificó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 2% (Sigma-Aldrich).

### 2.2.3.2 Cuantificación de genes de macrófagos M1 con tratamientos

Para determinar la expresión génica se utilizó el kit SuperScrip III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). El gen de referencia que se utilizó fue  $\beta$ -actina a 300 nM. Los oligonucleótidos para el gen TNF $\alpha$  se utilizaron a una concentración de 200 nM y para IL-6 a 100 nM. Las secuencias de oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 1.

Para síntesis de ADNc se utilizó 300 ng de ARN total después de la extracción, y se realizó como lo señala el fabricante. Para la qPCR, se utilizó para cada una: 5 µL SYBR (Appliedbiosystems, Thermo Fisher Scientific), 15 ng de ADNc y las concentraciones respectivas de cada oligonucleótido que se encuentran en la Tabla 1. En el termociclador de PCR en tiempo real 7500 (Applied biosystems) se realizaron las reacciones de 95 °C por 10 min y 40 ciclos (95 °C por 15s y 60 °C por 1min). Se utilizó el método  $-\Delta\Delta CT$  para comparar la expresión de genes. Para determinar los extractos que se probarían en queratinocitos se realizó un análisis estadístico ANOVA en GraphPad Prism 8 y la normalización de los datos se realizó en Past 4.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de macrófagos con perfil inflamatorio en respuesta a los tratamientos herbales en qPCR.**

Gen	Secuencia 5'-3'	Longitud (nt)	Referencia
$\beta$ -actina	F: GCGAGAAGATGACCCAGATC	20	(Gasperin, 2021)
	R: CCAGTGGTACGGCCAGAGG	19	
IL-6	F: GGAGACTTGCCTGGTGAAA	19	(Robinson et al., 2020)
	R: CTGGCTTGTTCCCTCACTACTC	21	
TNF $\alpha$	F: AGCCTGTAGCCCATGTTGTAGC	22	(Shin et al., 2020)
	R: ATCTCTCAGCTCCACGCCATTG	22	

## 2.3 Estandarización del modelo psoriásico en células HEK con coctel M5

### 2.3.1 Cultivo de queratinocitos

Se adquirió la línea celular primaria de queratinocitos epidérmicos humanos (HEK, Cell Applications), la cual fue cultivada en medio de crecimiento para queratinocitos (KGM) (EpiVita, Cells Applications), antibiótico/antimicótico al 1%, en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5%.

### 2.3.2 Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la citotoxicidad del extracto acuoso de *Artemisia californica* y el extracto etanólico de Triphala, se utilizó la metodología según Rentería Pacheco (2023) para evaluar la citotoxicidad de los macrófagos a través de un ensayo con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS). Las células HEK se sembraron en placas de 96 pozos en medio completo, posterior a las 24 h se adicionaron los extractos con una concentración final de 125  $\mu$ g/ml durante 24 h más. Al finalizar la exposición de las células a los tratamientos, se retiró el medio y sustituyó con medio completo y MTS en cada pocillo. Después las placas se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 4 h. La absorbancia se leyó a 490 nm con un lector de microplacas.

### 2.3.3 Cuantificación de expresión génica en células HEK

#### 2.3.3.1 Tratamiento con extractos herbales en células HEK y extracción de ARN

A través de una búsqueda en literatura, se determinó la concentración a utilizar de cada uno de los componentes del coctel M5 (Guilloteau et al., 2010). Es decir, IL-17A, IL-22 (MedChemExpress), Oncostatina M, IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$  (Miltenyi Biotec) fueron trabajados a una concentración de 2 ng/ml por cada citocina y una concentración final de 10 ng/ml. Para validar el modelo y el efecto de los tratamientos, se sembraron  $1.9 \times 10^4$  células (pase 3-6) por pozo en una placa de 12 pozos y 1.5 ml de medio KGM. Después de 24 h, las células HEK fueron estimuladas 24 h con el coctel M5 (Guilloteau et al., 2010). Posteriormente, a las 24 h se añadió 125  $\mu$ g/ml de los extractos de *Anemopsis californica*, *H. indicus* y de Triphala.

Para validar el modelo *in vitro* de respuesta psoriásica en células HEK y conocer los posibles efectos de los extractos herbales, después de la estimulación con el coctel M5 se analizaron cinco genes; KGRT1, CCL20, CXCL8, S100A7 e IL-6. Considerando que KGRT1 es un marcador de queratina; KRT6 es un marcador de proliferación; CCL20 y CXCL8 son marcadores de quimiocinas; S100A7 es un péptido antimicrobiano, e IL-6 es un marcador de inflamación, la expresión de estos genes se ven modificados teniendo una respuesta psoriásica (Gao et al., 2020; Gendrisch et al., 2021; Mingfen et al., 2021; Pazdernik y Prediger, 2020; Takuathung et al., 2021), lo que permite validar el modelo *in vitro*.

**Tabla 2** Oligonucleótidos utilizados para la validación del modelo *in vitro* de respuesta psoriásica en HEK estimulados con el coctel M5 y con tratamientos herbales en su expresión génica.

Gen	Secuencia 5'-3'	Concentración (nM)	Longitud (nt)	Referencia
S100A7	F: AATTACCTCGCCGATGTCTTTGA	200	23	(Tsuji et al., 2020)
	R: ATGGCTCTGCTTGTGGTAGTC		21	
CXCL8	F: TCTGCAGCTCTGTGTGAAGGTG	200	22	(Shin et al., 2020)
	R: TGTGGTCCACTCTCAATCACTCTC		24	
CCL20	F: GAGTTTGCTCCTGGCTGCTTTG	200	22	(Shin et al., 2020)
	R: AGCAGTCAAAGTTGCTTGCTTCTG		24	
KGRT1	F: CTTTTCTGCTGTTTCCCAATGAA	200	23	

	<b>R:</b> GGAAAGAACAAAGCAGGGTCATAG		24	(Gao et al., 2020)
KGR6	<b>F:</b> CCAGGCCATACAGACTGCGG	300	22	(Gao et al., 2020)
	<b>R:</b> GGGTTTCAGTGCCAACACTCAG		22	

Se realizó la extracción de ARN como se especifica en la sección 2.2.3.1. con TRI reagent (Sigma Aldrich). Se determinó la calidad y concentración de ARN con el equipo NanoDrop. Para realizar la RT-qPCR, se utilizó el kit SuperScrip III. El gen de referencia fue  $\beta$ -actina. Las secuencias de oligonucleótidos S100A7, CXXL8, CCL20, KRT1 y KRT6 se encuentran con las respectivas concentraciones empleadas en la tabla 2 y de  $\beta$ -actina y IL-6 en la tabla 1. Se realizó el análisis estadístico ANOVA en el software GraphPad Prism 8 y la normalización de los datos se realizó en Past 4.

## Capítulo 3. Resultados y discusión

---

### 3.1 Rendimiento de extractos

En este estudio se determinaron los posibles efectos anti psoriásicos de *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, *Hemidesmus indicus*, *Eclipta prostrata* y del preparado herbal Triphala. Las plantas fueron elegidas por su uso en la medicina tradicional en afecciones tópicas. En el caso de *Anemopsis californica* y *Artemisia californica* se realizó la extracción acuosa a partir de la hoja debido a que es la parte más utilizada en la realización de tratamientos acuosos tópicos en la medicina tradicional (Filomena et al., 2019; Medina-Holguín et al., 2008).

Los extractos acuosos fueron resuspendidos en PBS y los extractos etanólicos en DMSO con una concentración menor al 1%. Sin embargo, en la Figura 17 (página 47) se muestran los extractos que se pudieron resuspender sin exceder el 1% de DMSO y que fueron usados en los ensayos posteriores. Los extractos herbales que se seleccionaron para los ensayos de viabilidad celular y contenido fenólico fueron: todos los extractos acuosos, los extractos etanólicos de *E. prostrata*, *H. indicus* y *Anemopsis californica* realizados con la extracción de 5 min y los extractos etanólicos de Triphala, *H. indicus* y *Artemisia californica* extraídos por 7 días.

Los rendimientos obtenidos de las extracciones acuosas y etanólicas de cada planta se presentan en la Tabla 3. En general, las extracciones acuosas mostraron mayores rendimientos en comparación con las etanólicas, esto puede indicar que el concentrado está constituido mayormente por compuestos termoestables, ya que la metodología utilizada favorece la obtención de compuestos estables al calor, tal como se menciona en la revisión de Jha y Sit (2022).

Por otro lado, las extracciones etanólicas realizadas con el protocolo dos, que incluyó una maceración de 7 días, generaron mayores rendimientos que aquellas realizadas en 5 minutos. Aunque la maceración a temperatura ambiente es un proceso lento y menos eficiente, es recomendada para la extracción de compuestos termolábiles (Jara-Palacios et al., 2020; Jha y Sit, 2022). En el caso de la extracción de 5 minutos, el corto tiempo de exposición entre las hierbas y el solvente pudo haber afectado el rendimiento, lo cual está respaldado por la literatura, que sugiere que el método de extracción influye significativamente en el rendimiento final (Jha y Sit, 2022).

De acuerdo con Jha y Sit (2022), tanto el agua como el etanol son solventes adecuados para extraer compuestos polares. Esto nos permite inferir que los extractos acuosos, que presentaron mayores rendimientos, podrían contener mayormente compuestos como ácidos fenólicos, antocianinas, taninos, saponinas y terpenoides. Por su parte, los extractos etanólicos, aunque de menor rendimiento, probablemente contienen compuestos como taninos, polifenoles, flavonoides, terpenoides y alcaloides (Alara et al., 2021; Jha y Sit, 2022). Sin embargo, el análisis bioquímico será fundamental para tener un acercamiento certero de los posibles compuestos responsables de las actividades observadas.

Además, el tamaño de las partículas de las plantas influye en la eficiencia de la extracción. Según Oubannin et al. (2024), las partículas más pequeñas mejoran el contacto entre la muestra y el solvente, lo que facilita la extracción. En las extracciones acuosas, las plantas en polvo presentaron un mayor rendimiento en comparación con las plantas adquiridas completas. De todas las plantas estudiadas, *Hemidesmus indicus* mostró el mayor rendimiento. Todos los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Rendimiento de los extractos acuosos y etanólicos. EtOH: Extracción etanólica por 5 min, EtOH\*: extracción etanólica por 7 días.**

Planta	Tipo de extracto	Rendimiento (%)
<i>Anemopsis californica</i>	Acuosa	1.0
<i>Artemisia californica</i>	Acuosa	2.8
<i>Hemidesmus indicus</i>	Acuosa	38.5
<i>Eclipsa prostrata</i>	Acuosa	15.3
<i>Triphala</i>	Acuosa	14.4
<i>Hemidesmus indicus</i>	EtOH	0.6
<i>Eclipsa prostrata</i>	EtOH	1.2
<i>Triphala</i>	EtOH	10.8
<i>Anemopsis californica</i>	EtOH*	2.6
<i>Artemisia californica</i>	EtOH*	8.8
<i>Hemidesmus indicus</i>	EtOH*	2.6
<i>Eclipsa prostrata</i>	EtOH*	1.6
<i>Triphala</i>	EtOH*	16.2



El extracto acuoso de *Hemidesmus indicus* mostró en este estudio un rendimiento de 38.5%, superior a los extractos etanólicos, que fueron de 0.6% y 2.6%. Este resultado es consistente con la literatura, que reporta rendimientos superiores al 20% cuando se emplea agua como solvente, como se observa en los estudios de Austin et al. (2003), Fimognari et al. (2011), Guerrini et al. (2014) y Statti et al. (2015). En el estudio de Statti et al. (2015), se comparó el extracto acuoso con uno hidroetanólico, demostrando nuevamente que el acuoso tiene un rendimiento superior. Además, se ha informado que otros solventes, como el metanol, acetona y etanol, producen rendimientos inferiores al 20%, tal como lo mencionan Austin et al. (2003) y Kumar et al. (2012).

## **3.2 Evaluación y selección de concentraciones de los extractos herbales para determinar actividad antiinflamatoria**

### **3.2.1 Concentración fenólica y citotoxicidad de los extractos herbales**

Los resultados de concentración fenólica de cada planta fueron analizados junto con los resultados de citotoxicidad como estrategia de selección para los ensayos subsecuentes de cultivo celular. La evaluación de la citotoxicidad se realizó en los cinco extractos acuosos y en los extractos etanólicos resuspendidos. De las cinco concentraciones evaluadas (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml y 31.25 µg/ml), se realizó un análisis de aquellas concentraciones que no presentaran citotoxicidad, según la norma "Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro" (ISO 10993-5:2009), la cual indica que un porcentaje <70% se considera citotóxico, y que mostrarán la mayor concentración posible de contenido fenólico. Estos resultados se estarán mostrando en las Figuras 7 a la 16, descritas a continuación.

En general, en este trabajo, los extractos etanólicos presentaron una mayor concentración de fenoles en comparación con sus respectivos extractos acuosos. En el caso de *Anemopsis californica*, el contenido fenólico del extracto etanólico de las concentraciones 125, 200 y 500 µg/ml (0.03, 0.06 y 0.12 µM, respectivamente) (Figura 7A) fue el que tuvo concentraciones más cercanas al de su extracto acuoso (0.022, 0.029 y 0.069 µM respectivamente, Figura 7B) que el resto de los extractos. Sin embargo, estas concentraciones en el extracto etanólico resultaron ser citotóxicas (Figura 8B). En cambio, el extracto acuoso no es citotóxico para las células por debajo de 500 µg/ml, por lo que las concentraciones de 250

$\mu\text{g/ml}$ ,  $125 \mu\text{g/ml}$  y  $62.5 \mu\text{g/ml}$  resultaron no ser significativas en comparación con respecto a células sin tratamientos (Figura 8).

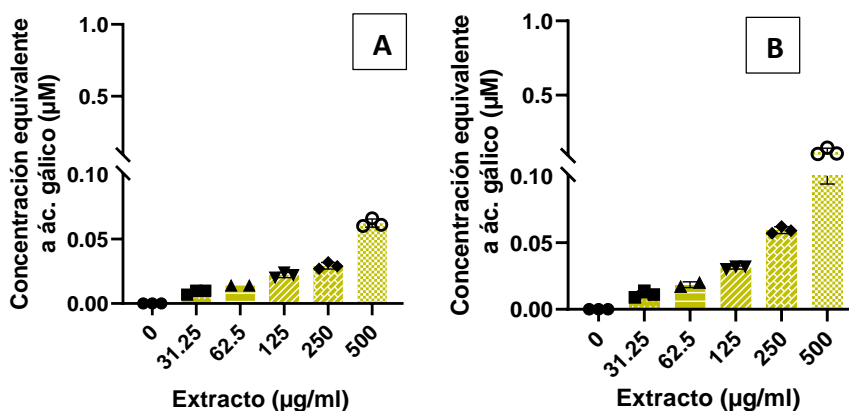


Figura 7. Contenido fenólico de extractos de *Anemopsis californica*. A) Extracto acuoso. B) Extracto etanólico. n=3.

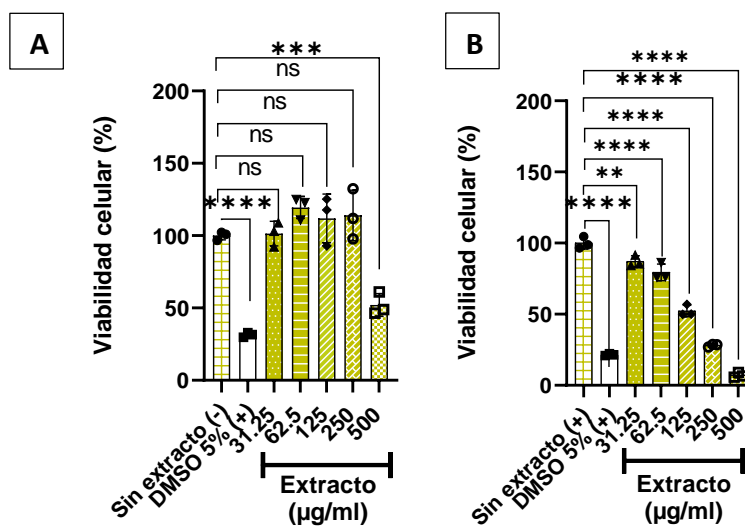


Figura 8. Viabilidad celular de extractos de *Anemopsis californica*. A) Extracto acuoso y B) extracto etanólico. ANOVA de una vía, método de comparación por Dunnett, n=3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

En los extractos de *Artemisia californica*, el contenido fenólico de la extracción etanólica fue superior a la extracción acuosa (Figura 9), sin embargo, las concentraciones de la extracción etanólica mostraron ser citotóxicas (Figura 10B) por lo que ya no se consideró este extracto para los ensayos posteriores. De la extracción acuosa, las concentraciones de 250 y 500  $\mu\text{g/ml}$  resultaron ser citotóxicas (Figura 10A).

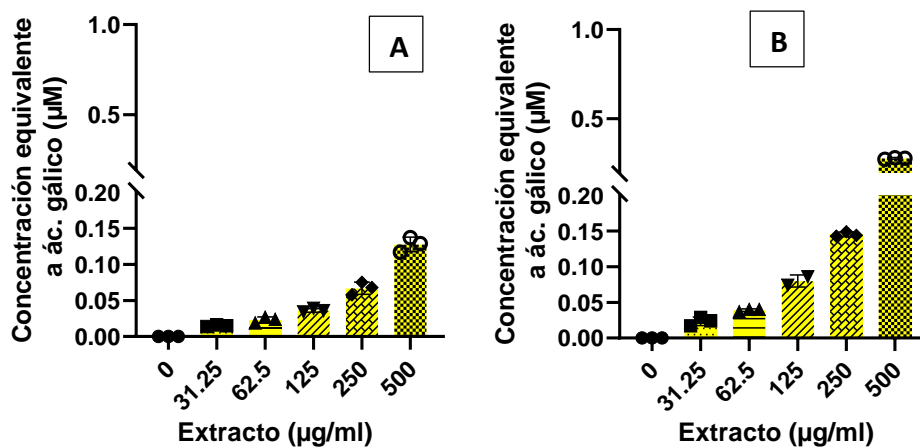


Figura 9. Contenido fenólico de extractos de *Artemisia californica*. A) Extracto acuoso B) Extracto etanólico. n=3.

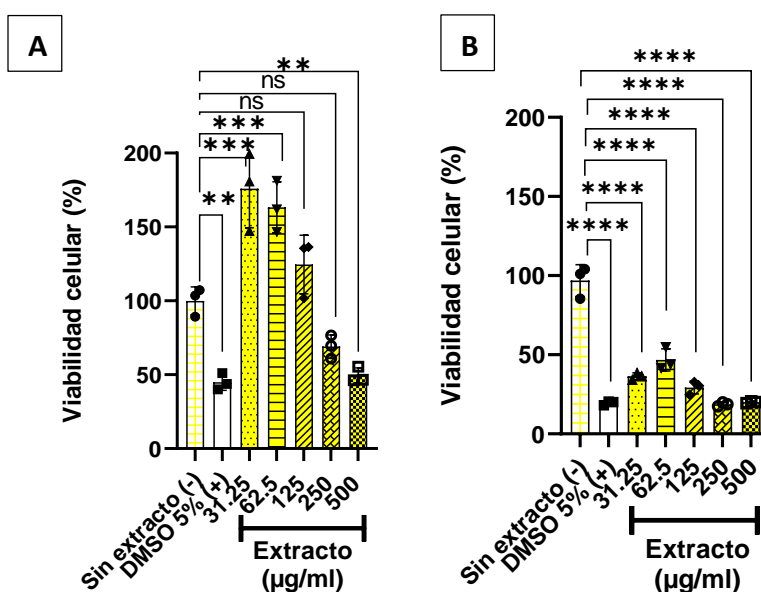


Figura 10. Viabilidad celular de extracto acuoso de *Artemisia californica*. A) Extracto acuoso y B) extracto etanólico. ANOVA de una vía, método de comparación por Dunnett, n=3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

Comparando el contenido fenólico del extracto acuoso (Figura 11A) con extracto etanólico (Figura 11B) de *Hemidesmus indicus*, la extracción por 5 min tiene mayor concentración que la extracción acuosa en cada concentración y en la extracción de 7 días llega a ser el triple esa diferencia, sin embargo, ambas extracciones etanólicas (Figuras 12B y 12C) son citotóxicas, por lo que quedaron fuera de la selección. La extracción acuosa resultó ser no citotóxica en ninguna de sus concentraciones (Figura 12A).

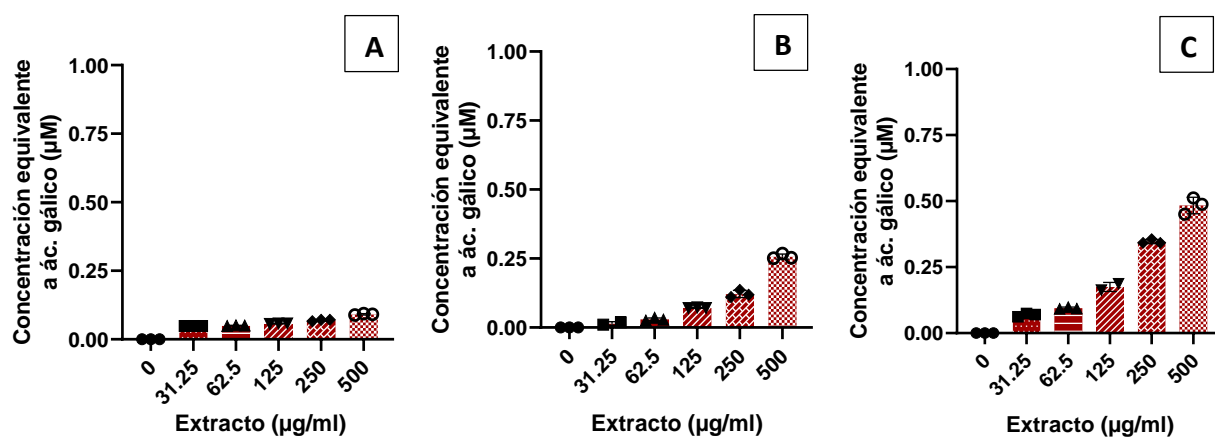


Figura 11. Contenido fenólico de extractos de *Hemidesmus indicus*. A) Extracto acuoso, B) Extracto etanólico (5 días), C) extracto etanólico (7 días). n=3.

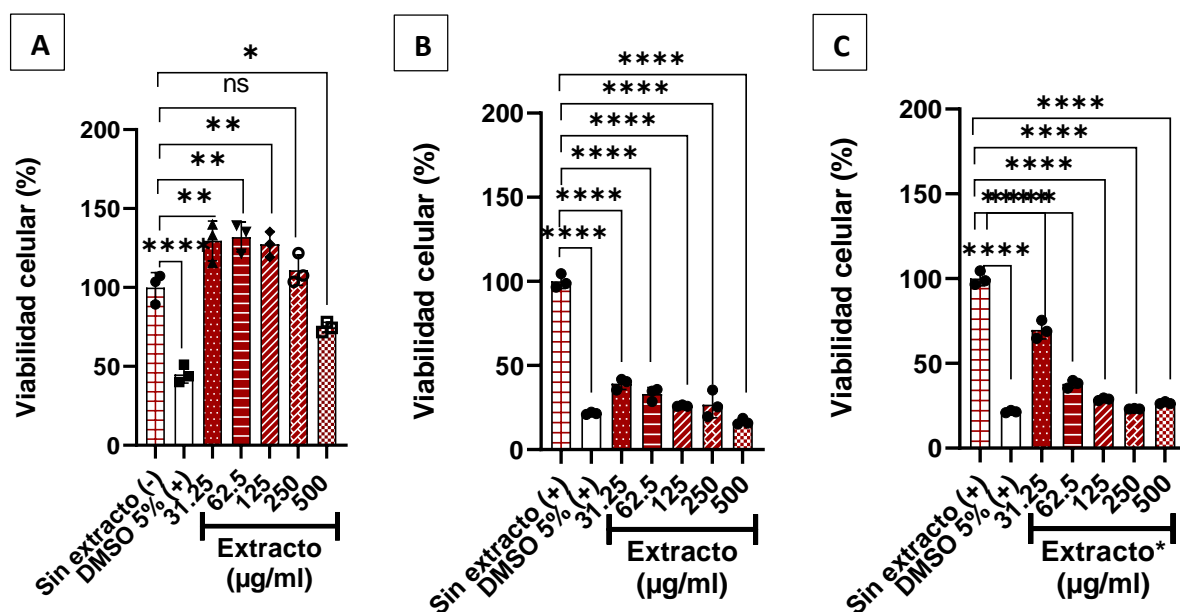


Figura 12. Viabilidad celular de *Hemidesmus indicus*. A) Extracto acuoso con concentraciones no citotóxicas, B y C los extractos etanólicos son citotóxicos. ANOVA de una vía, método de comparación por Dunnett, n=3 por grupo (P<0.05), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y <0.0001 (\*\*\*\*).

En el caso del extracto acuoso de *Eclipta prostrata*, el contenido fenólico (Figura 13A) es mayor a 0.009 µM en las concentraciones 125, 250 y 500 µl/ml comparándolo con el extracto etanólico (Figura 13B) a su concentración de 31.25 µl/ml. Lo anterior, considerando que fue la única concentración no citotóxica de este extracto (Figura 14B). Por otro lado, el extracto acuoso mostró que ninguna de las cinco concentraciones fue citotóxica (Figura 14A).

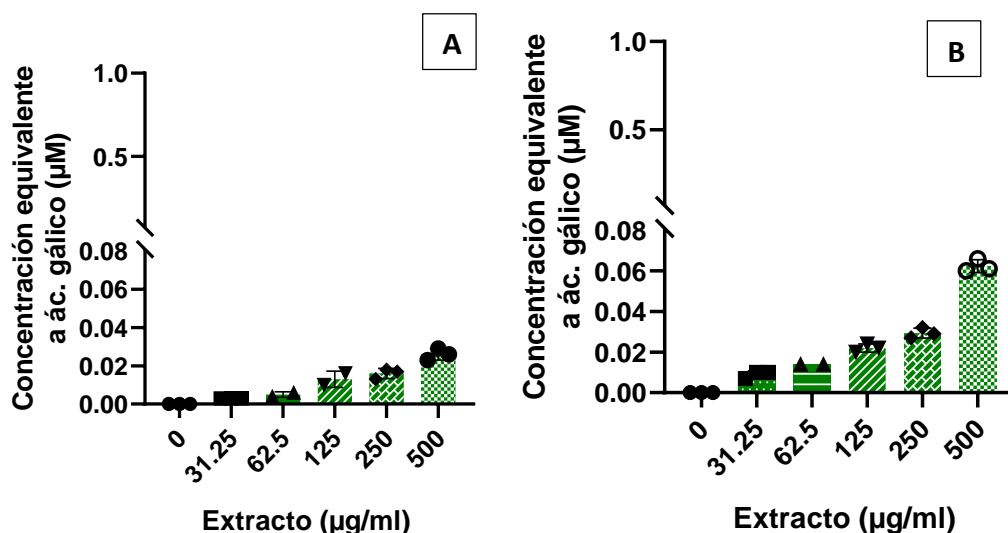


Figura 13. Contenido fenólico de extractos de *Eclipsa prostrata*. A) Extracto acuoso B) Extracto etanólico. n=3.

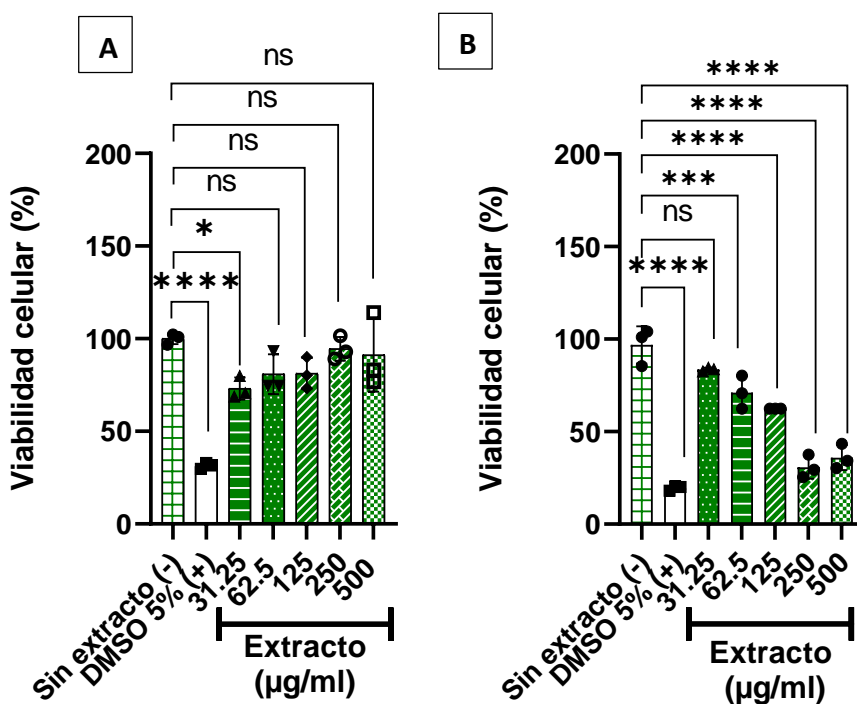


Figura 14. Viabilidad celular de *E. prostrata*. A) Extracto acuoso y B) Extracto etanólico. ANOVA de una vía, método de comparación por Dunnett, n=3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

Es importante destacar que el extracto etanólico de *Triphala* fue el único, entre las plantas estudiadas, que no presentó citotoxicidad en ninguna de sus concentraciones. Además, al analizar su contenido fenólico,

este extracto tuvo la mayor concentración de fenoles entre todos los extractos evaluados (Figura 15).

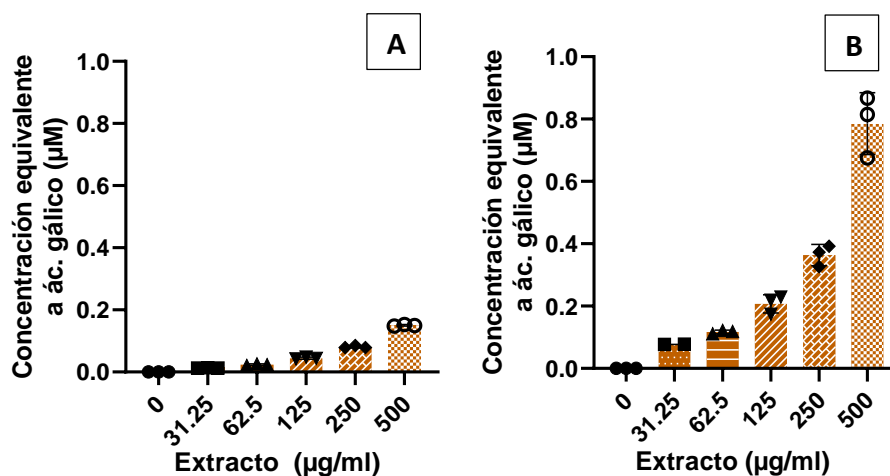


Figura 15. Contenido fenólico de extractos de Triphala. A) Extracto acuoso B) Extracto etanólico. n=3.

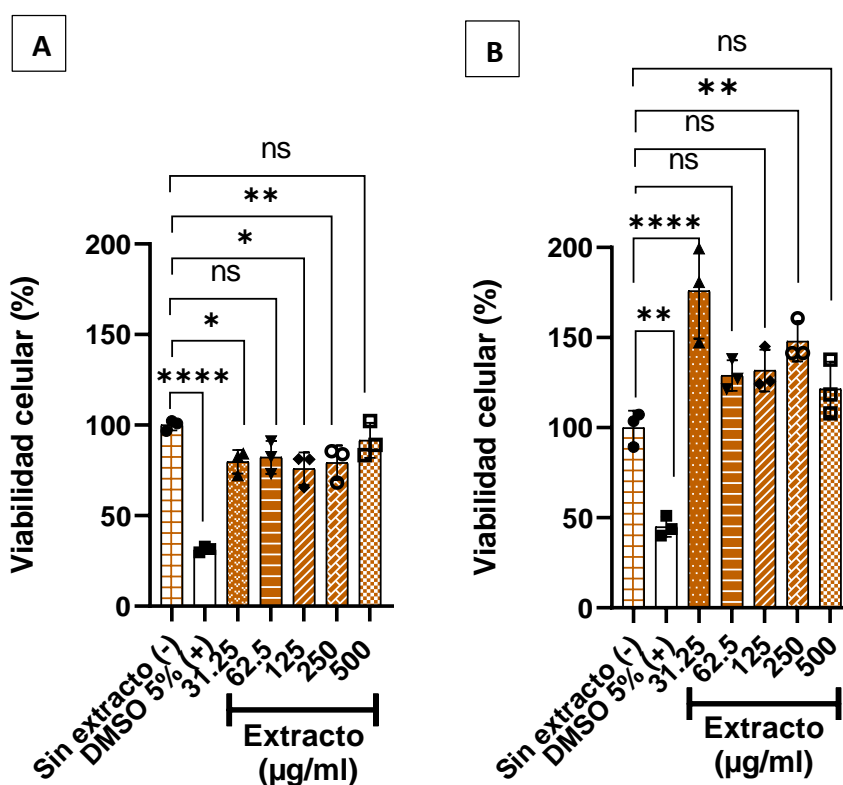


Figura 16. Viabilidad celular de extractos de Triphala. A) Extracto acuoso B) extracto etanólico. ANOVA de una vía, método de comparación por Dunnett, n=3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

Tanto el extracto etanólico como el acuoso de Triphala mostraron que las cinco concentraciones evaluadas

no fueron citotóxicas (Figura 16), presentando viabilidades celulares superiores al 75%. En el caso del extracto acuoso (Figura 16A), las viabilidades para las concentraciones de 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml fueron de 79%, 82%, 75%, 79% y 91%, respectivamente. Para el extracto etanólico (Figura 16B), las viabilidades fueron notablemente superiores, con valores de 175%, 128%, 131%, 147% y 121% en las concentraciones de 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml, respectivamente. Los porcentajes mayores a 100% puede deberse a que el extracto puede alterar la actividad metabólica de las células (Gendrisch et al., 2021).

Los resultados de contenido fenólico concuerdan con los que obtuvieron Kalaiselvan y Rasool (2016), en donde encontraron que el perfil de HPLC del extracto acuoso de triphala había presencia de polifenoles en donde el ácido gálico era el componente que más predominaba. En ese mismo estudio se encontraron otros compuestos pertenecientes a los polifenoles como el ácido ascórbico, ácido tánico, ácido quebulágico y ácido quebúlico.

La diferencia en el contenido fenólico entre extractos puede explicarse por la influencia del método y el solvente utilizado en la extracción, factores que afectan tanto el contenido total de fenoles como su actividad biológica (Waszkowiak y Gliszczynska-Świgło, 2016). Además, parámetros como la exposición a la luz, la duración de la extracción, la temperatura, el pH y la relación solvente/sustrato también influyen en el rendimiento de la extracción de este tipo de compuestos (Alara et al., 2021). Cabe resaltar que el agua y el etanol son los disolventes más utilizados en la extracción de compuestos vegetales debido a su aceptación como solventes seguros y su polaridad permite extraer compuestos para una amplia gama de compuestos bioactivos orgánicos e inorgánicos con la posibilidad de mezclar estos solventes en cualquier proporción (Jara-Palacios et al., 2020; Waszkowiak y Gliszczynska-Świgło, 2016).

Aunque el contenido de fenoles fue un factor importante para la toma de decisiones en este estudio, debido a la sólida evidencia de sus diversas propiedades farmacológicas, como efectos antiinflamatorios (N. Kumar y Goel, 2019; Rahman et al., 2022), otro criterio para seleccionar la concentración de los extractos utilizados en los ensayos posteriores fue el porcentaje de viabilidad celular. Solo se incluyeron los extractos que presentaron una viabilidad superior al 75%, clasificándolos como no citotóxicos. Este criterio se estableció de acuerdo con la norma "Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro" (ISO 10993-5:2009), la cual indica que una reducción de viabilidad >30% se considera indicativa de citotoxicidad. Para estandarizar el análisis en todas las plantas, se decidió trabajar con la concentración de 125 µg/ml.

La citotoxicidad observada en algunas plantas podría estar relacionada con las altas concentraciones utilizadas en los ensayos, siendo que la concentración mínima trabajada fue de 31.25 µg/ml, ya que las concentraciones fueron similares al del estudio de Daniels et al. (2006), que evaluó los efectos proliferativos de extractos acuosos y etanólicos de *Anemopsis californica* en células de carcinoma mamario humano MCF-7/AZ y de cáncer de colon HAMF12, se observó citotoxicidad a partir de 40 µg/ml. Aunque son líneas celulares diferentes, los resultados de citotoxicidad concuerdan, por lo que confirman que es viable trabajar con concentraciones más bajas de algunos extractos para minimizar efectos citotóxicos.

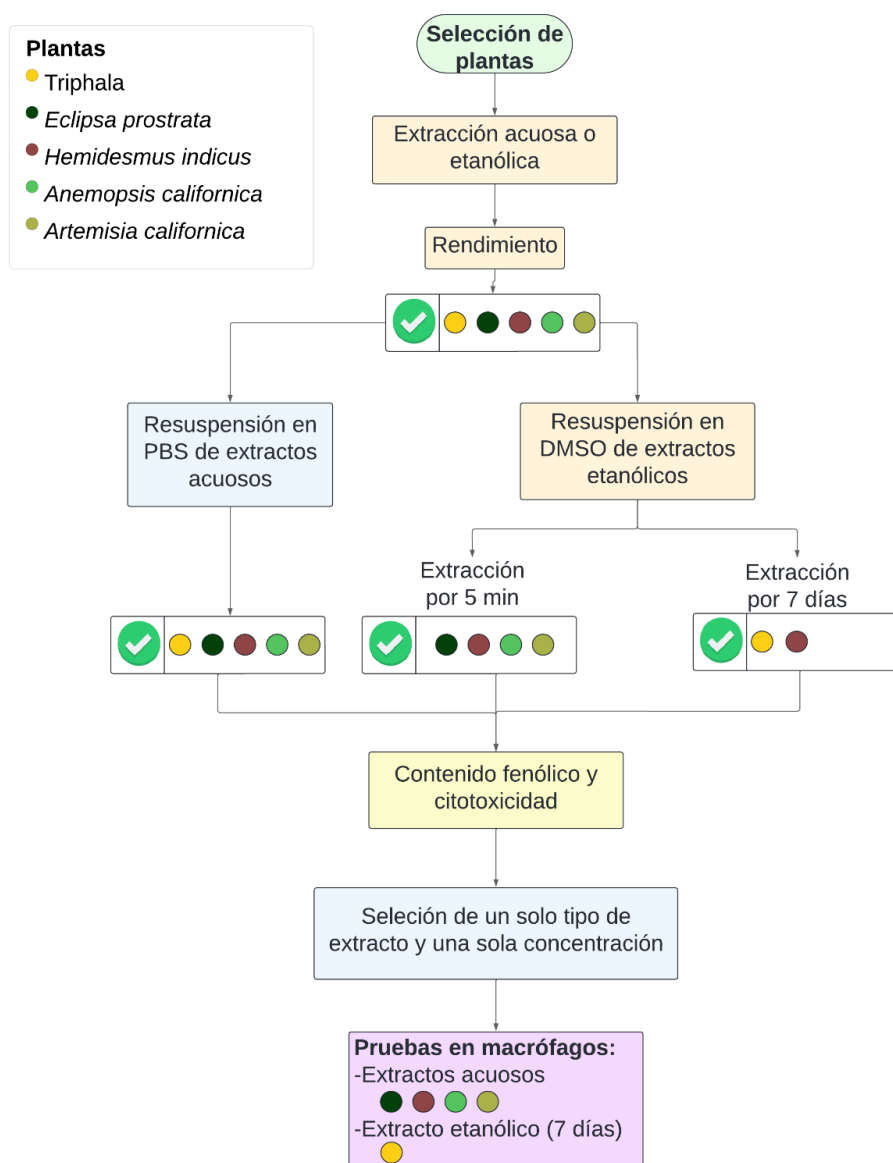


Figura 17. Diagrama de los extractos que fueron seleccionados para realizar pruebas en los macrófagos. Después de las extracciones se descartaron cuatro extractos: un extracto etanólico de *Triphala*, *E. prostrata*, *Artemisia californica* y *Anemopsis californica*. Por lo para las pruebas en macrófagos, se seleccionaron los extractos acuosos de *E. prostrata*, *Artemisia californica*, *Anemopsis californica* y del extracto etanólico de *Triphala* (7 días).



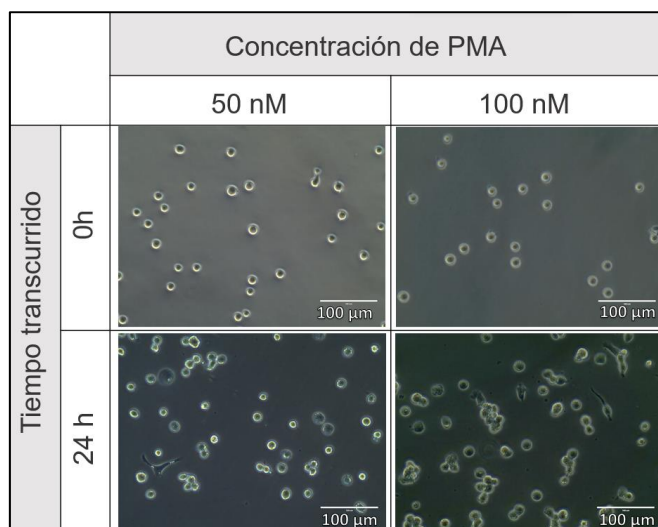
Cabe destacar que *Anemopsis californica* tuvo mayor cantidad de fenoles de todas las extracciones acuosas. Sin embargo, de todas las extracciones acuosas y etanólicas, el extracto etanólico de Triphala tuvo una mayor concentración fenólica en todas sus concentraciones. En general las extracciones acuosas tuvieron mejores resultados en cuanto a citotoxicidad. Sin embargo, Triphala fue la única extracción etanólica con viabilidades celulares superiores al 70%. Por lo que, para este punto, las extracciones acuosas de *H. indicus*, *E. prostata*, *Anemopsis californica* y *Artemisia californica* fueron consideradas junto con el extracto etanólico Triphala como las muestras candidatas para evaluar la expresión de genes proinflamatorios en macrófagos. De acuerdo con los resultados de citotoxicidad y contenido fenólico, se determinó que la concentración de trabajo sería de 125 µg/ml. A continuación, se presenta un esquema que representa el análisis de selección de todos los extractos evaluados con base en la capacidad de su resuspensión, citotoxicidad y contenido fenólico (Figura 17).

### 3.2.2 Diferenciación de monocitos a macrófagos

La línea celular monocítica THP-1 es ampliamente utilizada como modelo *in vitro* para estudiar respuestas inmunitarias, ya que existe evidencia de que los monocitos pueden diferenciarse en macrófagos tras el tratamiento con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), adquiriendo un perfil similar al de macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica primaria, tanto en la producción de citocinas como en sus propiedades metabólicas y morfológicas (Pinto et al., 2020). Por lo que se pueden encontrar diferentes protocolos en la literatura, cada uno con concentraciones de PMA y tiempos de diferenciación diferentes.

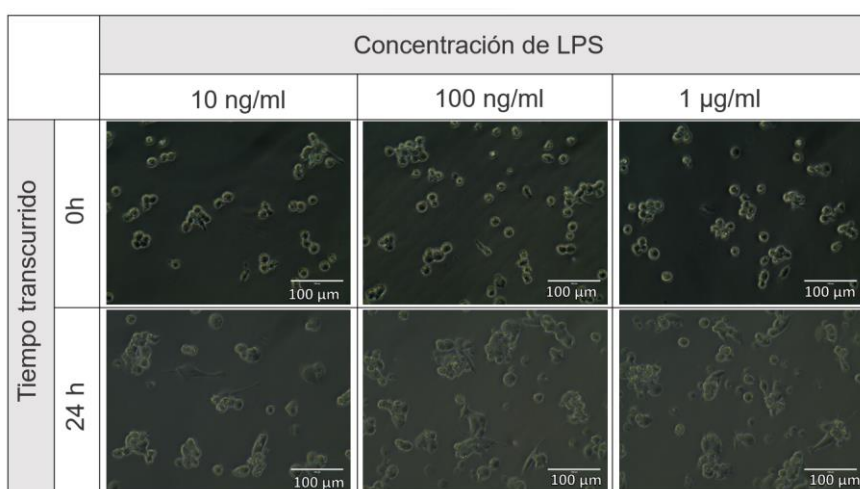
En este estudio, al tratar las células THP-1 con 50 nM y 100 nM de PMA (Figura 18), se observaron cambios morfológicos que indicaban su diferenciación a macrófagos. Una característica clave de esta diferenciación es la adherencia celular, que indica polarización hacia macrófagos. Sin embargo, los cambios observados con 50 nM de PMA no fueron suficientes para confirmar dicha diferenciación, por lo que se determinó que la concentración de 100 nM sería la más adecuada para los ensayos posteriores.

El PMA induce la liberación de citocinas, como TNF $\alpha$ , las cuales se incrementan mediante la activación de rutas inflamatorias como NF-kB y la proteína quinasa C, de forma dependiente de la estimulación (Kim et al., 2022). Posteriormente, para inducir un perfil proinflamatorio y madurar los fenotipos M1, se utilizó LPS, lo que incrementa la adherencia celular, la expresión de marcadores de macrófagos y la secreción de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF) (Lund et al., 2016).



**Figura 18.** Comparación de 0 h y 24 h de las células THP-1 en medio completo de RPMI-1640 a concentraciones a 50 nM y 100 nM de PMA. Después de las 24 h se observó que las células THP-1 se aglomeraron y presentaron morfología de células adherentes más notable en la concentración de 100 nM.

Después del tratamiento con las tres diferentes concentraciones de LPS (10 ng/ml, 100 ng/ml y 1  $\mu$ g/ml) (Figura 19), se observaron cambios morfológicos significativos. Las células cambiaron de una disposición lineal a formar aglomeraciones, mostrando una morfología más expandida. Tras 24 h de tratamiento, se evidenciaron cambios morfológicos que indicaban la diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M1, siendo más evidente con la concentración de 100 ng/ml, sin observarse una muerte celular elevada (desprendimiento de las células) inducida por la activación. Para evitar la sobreestimulación y la muerte celular, se decidió trabajar con la concentración de 100 ng/ml de LPS en los ensayos posteriores.



**Figura 19.** Células THP-1 con diferentes concentraciones de LPS. Los cambios morfológicos fueron graduales respecto a las concentraciones de LPS, las aglomeraciones y las células muertas que se observaban en el microscopio eran más evidentes en la concentración mayor.

En la sección 3.3.2 se ampliará la evaluación de la polarización a macrófagos M1, ya que otro factor en esta diferenciación es la expresión de genes clásicos de M1, como la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 (Genin et al., 2015).

### 3.2.3 Efecto de los extractos herbales en macrófagos M1

Tras la evaluación del contenido fenólico y la citotoxicidad, se seleccionaron los extractos acuosos de *H. indicus*, *E. próstata*, *Anemopsis californica*, *Artemisia californica*, y el extracto etanólico de Triphala a una concentración de 125  $\mu$ g/ml para evaluar su respuesta antiinflamatoria en macrófagos estimulados con 100 nM de PMA y 100 ng/ml de LPS, como se muestra en el resumen de la Figura 17. Después de los tratamientos, se extrajo el RNA verificando que calidad de material genético fuera aceptable, es decir, donde la relación 260/280 fue igual o mayor a 1.70 (Tabla 4) y una integridad adecuada para realizar la RT-qPCR (Figura 28). La evaluación se realizó mediante el análisis de la expresión de genes proinflamatorios como TNF $\alpha$  (Figura 20B) e IL-6 (Figura 20A) (Guo et al., 2023; Kim et al., 2022).

**Tabla 4. Calidad de las muestras de ARN de macrófagos M1 y tratamientos**

Muestra	Ácidos nucleicos (ng/ $\mu$ l)	Relación 260/280
Triphala	80.1	1.83
<i>E. prostrata</i>	75.9	1.81
<i>H. indicus</i>	36.7	1.81
<i>Anemopsis californica</i>	70.3	1.76
<i>Artemisia californica</i>	69.3	1.80

En la Figura 20, se observa que todos los extractos herbales evaluados mostraron una reducción en la expresión de estos genes proinflamatorios. Sin embargo, los extractos con los efectos más significativos en esta reducción fueron el extracto acuoso de *Artemisia californica* ( $P < 0.05$ ), que tuvo una reducción de expresión relativa de 69% en TNF $\alpha$  y de 96% en IL-6. El extracto etanólico de Triphala también presentó una reducción de expresión relativa significativa de 69.1% en TNF $\alpha$  y de 90% en IL-6. Por lo que ambos extractos fueron seleccionados para los ensayos en queratinocitos.

La importancia de la reducción en la expresión de TNF $\alpha$  e IL-6 frente a los extractos herbales en macrófagos previamente estimulados con PMA y LPS, en comparación con macrófagos sin tratamiento radica en su rol

como moléculas proinflamatorias y su rol en la psoriasis.

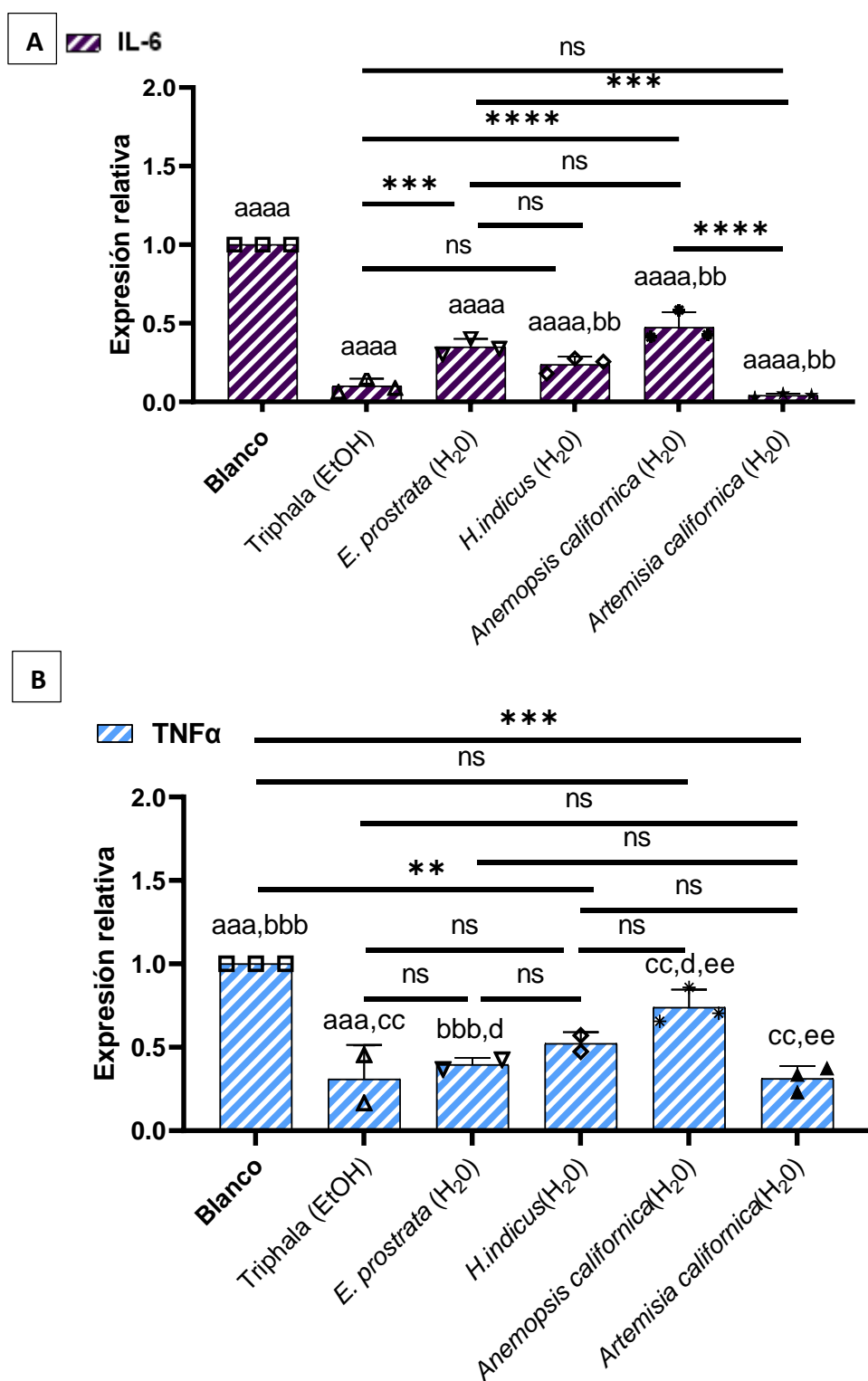


Figura 20. Expresión relativa de IL-6 y TNF $\alpha$  en macrófagos con perfil inflamatorio M1 con tratamientos de extractos herbales. A) Expresión relativa de IL-6 B) Expresión relativa de TNF $\alpha$ . ANOVA de una vía, método de comparación por Tukey, n=2-3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.002 (b), 0.002 (\*\*), 0.0002 (\*\*\*, aaa, bbb) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*, aaaa).

Además de TNF $\alpha$  e IL-6, otros marcadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , CXCL10, IL-8 y el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) también juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria de macrófagos M1 derivados de THP-1, activados por LPS. Este componente de la membrana de bacterias gram negativas se une al complejo receptor CD14/TLR4/MD2, activando las vías de señalización NF-kB y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), lo que desencadena una respuesta inflamatoria (Kim et al., 2022; Luetragoon et al., 2020).

TNF $\alpha$  es una citocina proinflamatoria fundamental en la psoriasis, ya que se expresa en altos niveles en las lesiones psoriásicas. Por esta razón, es un objetivo terapéutico importante. Aunque se produce principalmente por macrófagos, también lo generan células como las natural killers, Th1, Th17, Th22, neutrófilos, mastocitos y células dendríticas (Guo et al., 2023). No obstante, los tratamientos que solo inhiben TNF $\alpha$  pueden incrementar la recurrencia o gravedad de la psoriasis, ya que TNF $\alpha$  suprime la producción de IFN $\alpha$  producida por células dendríticas plasmocitoides (pDC), una citocina clave que modula la activación de las células Th17 (Guo et al., 2023). La sinergia entre TNF $\alpha$  e IL-17A regula otras citocinas y quimiocinas, como IL-23 y proteínas asociadas a S100, afectando la función de los queratinocitos. Esto amplía la cascada inflamatoria, un proceso clave en la patogénesis de la psoriasis (Guo et al., 2023).

Por otro lado, IL-6 tiene propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, ya que es producida por macrófagos, células dendríticas, células Th17, endoteliales, fibroblastos y queratinocitos (Guo et al., 2023; Pietrzak et al., 2020). En las lesiones psoriásicas, la expresión de IL-6 está aumentada, lo que sugiere una relación con la gravedad de estas lesiones (Pietrzak et al., 2020). Además, al igual que TNF $\alpha$ , existe una retroalimentación entre IL-6 e IL-17 en queratinocitos, lo que potencia la interacción entre la inmunidad innata y adaptativa en la psoriasis (Guo et al., 2023). Sin embargo, la inhibición de IL-6, aunque parece un objetivo terapéutico lógico en la psoriasis, existen estudios que demuestran lo contrario, ya que resulta ser contraproducente en algunos pacientes, porque su ausencia puede aumentar la producción de citocinas proinflamatorias por los queratinocitos (Yamanaka et al., 2021).

Sin embargo, Alves et al. (2024) sugieren que IL-6 también juega un papel importante en la supresión de células T y en las respuestas inflamatorias sistémicas, lo que indica que la modulación de IL-6 junto con otras citocinas podría ser una estrategia futura prometedora para el tratamiento de la psoriasis. Por esta razón, se evaluaron los efectos de los tratamientos herbales en al menos dos citocinas pro-inflamatorias: IL-6 y TNF $\alpha$ , las cuales cumplen con una función importante dentro de la psoriasis en macrófagos, ya que en esta enfermedad se busca la modulación de diferentes blancos y no se enfoca en una sola molécula.

### 3.3 Ensayos en células HEK

#### 3.3.1 Viabilidad de los extractos herbales

Al seleccionar los extractos de *Artemisia californica* y Triphala para ser evaluados en queratinocitos, se tuvo que verificar que la concentración 125  $\mu\text{g/ml}$  no fuera citotóxica en queratinocitos sanos, siguiendo los parámetros establecidos en los macrófagos de la norma "Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro" (ISO 10993-5:2009). Por ello, se realizó un ensayo de viabilidad celular con MTS en células HEK sin ningún tratamiento previo. Los resultados mostraron que los extractos de *Artemisia californica* y Triphala no presentaron efectos citotóxicos en la línea celular HEK, con viabilidades celulares del 100%, sin diferencia significativas en comparación con células control (solo tenían medio de cultivo) (Figura 21). Debido a esto, se determinó seguir trabajando con estos extractos a la concentración señalada.

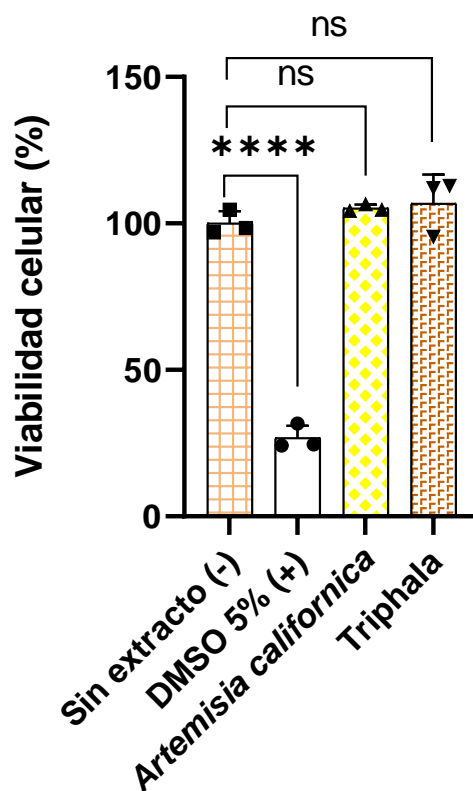


Figura 21. Viabilidad celular de células HEK con 125  $\mu\text{g/ml}$  del extracto acuoso de *Artemisia californica* y del extracto etanólico de Triphala. ANOVA de una vía, método de comparación por Dunnett,  $n=3$  por grupo ( $P<0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

### 3.3.2 Efecto de los tratamientos herbales en las células HEK estimuladas con cóctel M5

Antes de evaluar los efectos anti-psoriásicos de los extractos herbales, se estableció la respuesta psoriásica *in vitro* en queratinocitos HEK estimulados con el cóctel M5. Se seleccionaron seis genes reportados en la literatura (CXCL8, CCL20, IL-6, KRT1, KRT6 y S100A7) para analizar su expresión génica en respuesta a la estimulación. En la Figura 22 se muestra la expresión relativa de estos genes, normalizada a 1 en células sin tratamiento con M5. Tras 48 h de estimulación, se observó un aumento en la expresión de CXCL8 (Figura 22A), CCL20 (Figura 22B) y S100A7 (Figura 22E), siendo menor en IL-6 (Figura 22C). Por el contrario, KRT1 fue inhibido en comparación con las células no estimuladas (Figura 22D). Cabe mencionar que KRT6, que es considerado como un marcador molecular de hiperproliferación en psoriasis, el cual se esperaba que se sobreexpresara en células estimuladas con M5 en comparación a células sin estimular (Gao et al., 2020). Sin embargo, en la evaluación de este gen, no se logró estandarizar de manera óptima, ya que no se logró obtener un aumento de expresión del gen que se esperaba en células estimuladas con M5 como el trabajo de Gao et al. (2020), por lo que se descartó KRT6 en las siguientes evaluaciones.

El efecto sobre las quimiocinas CXCL8 (Figura 22A) y CCL20 (Figura 22B) estimuladas con M5 fue el aumento de su expresión relativa 9 y 5.2 veces respecto a las que no tuvieron ninguna estimulación con una diferencia altamente significativo ( $P < 0.05$ ). Este aumento de expresión coincide con lo reportado por Chiricozzi et al. (2018), Guilloteau et al. (2010) y Sarama et al. (2022). Este aumento está relacionado principalmente con IL-22, que junto con IL-17, producido por células Th17, Th22, T CD8+ y mastocitos, ejerce un efecto significativo en los queratinocitos, aumentando el grosor epidérmico e inhibiendo su diferenciación. Esta estimulación induce la expresión de estas quimiocinas y defensinas, así como la de proteínas de la familia S100, como S100A7 (Chiricozzi et al., 2018). Además, se ha demostrado que la actividad proinflamatoria se ve potenciada por la sinergia entre IL-17 y TNF $\alpha$ , lo que provoca una diferenciación alterada de los queratinocitos, resultando en hipogranulosis y paraqueratosis (Chiricozzi et al., 2018).

En el caso de S100A7 (Figura 22E), aumentó 13.67 veces su expresión relativa con diferencias altamente significativas respecto a las células que no fueron tratadas con M5. Este aumento era esperado, ya que esta proteína es fuertemente inducida en lesiones psoriásicas, diferenciando la piel psoriásica de otras afecciones inflamatorias. S100A7, junto con otras moléculas como BD2, es crucial en la respuesta innata cutánea y la eliminación de bacterias (Chiricozzi et al., 2018; Guilloteau et al., 2010).

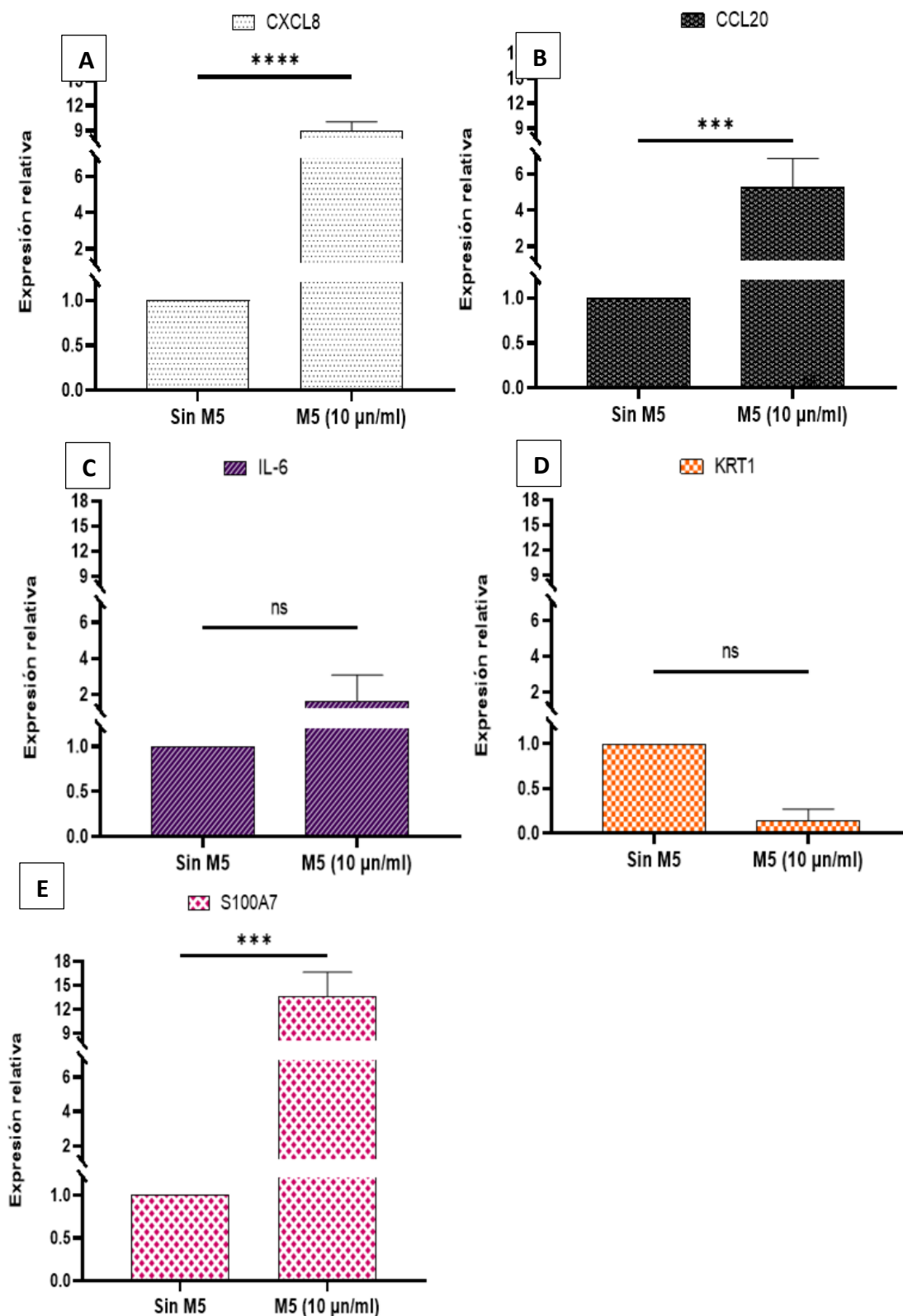


Figura 22. Gráficas de expresión génica de CXCL8, CCL20, IL-6, KRT1 y S100A en células HEK sin M5 y estimuladas con el coctel M5 por 48 h. A) CXCL8, B) CCL20, C) IL-6 y D) KRT1 E) S100A. ANOVA de dos vías, método de comparación por Dunnett, n=2-3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).



Los resultados son coherentes con los de Mingfen et al. (2021) en queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) y con Guilloteau et al. (2010), quienes encontraron que IL-1 $\alpha$  es un inductor fuerte de la expresión de S100A7, donde en este comparan la transcripción de genes S100A7, CXCL8 y BD2 de explantes de piel humana inyectada con M5 con explantes no inyectados. En ese mismo trabajo se evaluó la expresión de S100A7 en células HEK estimuladas con M5 por un análisis de Western blot, en donde se encontró que IL-1 $\alpha$  era el inductor que tenía una sobreexpresión. Por lo S1007A es considerado como marcador de psoriasis y buen indicador de proliferación y diferenciación celular (Gendrisch et al., 2021).

Respecto a IL-6, tuvo un aumento del 61.5% de expresión relativa con la estimulación de M5, aunque este aumento no tiene diferencias significancias estadísticas, el aumento de expresión es consistente con estudios previos, como los de Mingfen et al. (2021) y de Gao et al. (2020), que también reportaron una mayor expresión significativa de esta citocina en NHEK y HaCaT estimulados con M5, confirmando su papel como molécula proinflamatoria.

Finalmente, KRT1 fue prácticamente inhibido ya que la estimulación con M5 redujo su expresión relativa un 87% respecto a las células sin estimulación, lo que concuerda con los hallazgos de Gao et al. (2020), ya que KRT1 es un marcador de diferenciación de queratinocitos, cuyo control está relacionado con el ciclo celular y es regulado negativamente en la psoriasis. Gendrisch et al. (2021) demostraron que TNF $\alpha$  e IL-22, y en menor medida IL-17A, afectan significativamente la reducción de expresión de KRT1. Roth et al. (2012) también observaron que ratones knockout para KRT1 y KRT10 tenían una piel más frágil, lo que destaca el papel de estas proteínas en la red inflamatoria de los queratinocitos murinos.

La modulación en la expresión de estos genes confirmó la respuesta psoriásica en las células estimuladas con M5, lo que permitió evaluar el efecto de los tratamientos herbales.

### 3.3.2.1 Efecto de los tratamientos herbales

Para evaluar el efecto modulador de los extractos herbales, los queratinocitos HEK fueron estimulados con 10 ng/ml del coctel M5 durante 24 h para inducir una respuesta psoriásica. Posteriormente, se añadió el extracto etanólico de Triphala o el extracto acuoso de *Artemisia californica* a una concentración de 125  $\mu$ g/ml, con el fin de analizar el impacto de cada tratamiento.

La expresión relativa de la quimiocina CXCL8 mostró una reducción significativa tras el tratamiento con

Triphala y *Artemisia californica*. Como se observa en la Figura 23, las células estimuladas con M5 sobreexpresaron CXCL8 en comparación con las células sin estimulación, mostrando diferencias altamente significativas. El extracto de Triphala (Figura 23A) redujo la expresión relativa de CXCL8 en un 40%, mientras que *Artemisia californica* (Figura 23B) logró una reducción del 87%, ambas disminuciones siendo estadísticamente significativas en comparación con las células solo estimuladas con M5. Además, la expresión de CXCL8 en células tratadas con estos extractos no presentó diferencias significativas respecto a las células no estimuladas con M5, lo cual indica que ambos extractos tienen un efecto modulador inflamatorio al reducir la expresión de esta quimiocina.

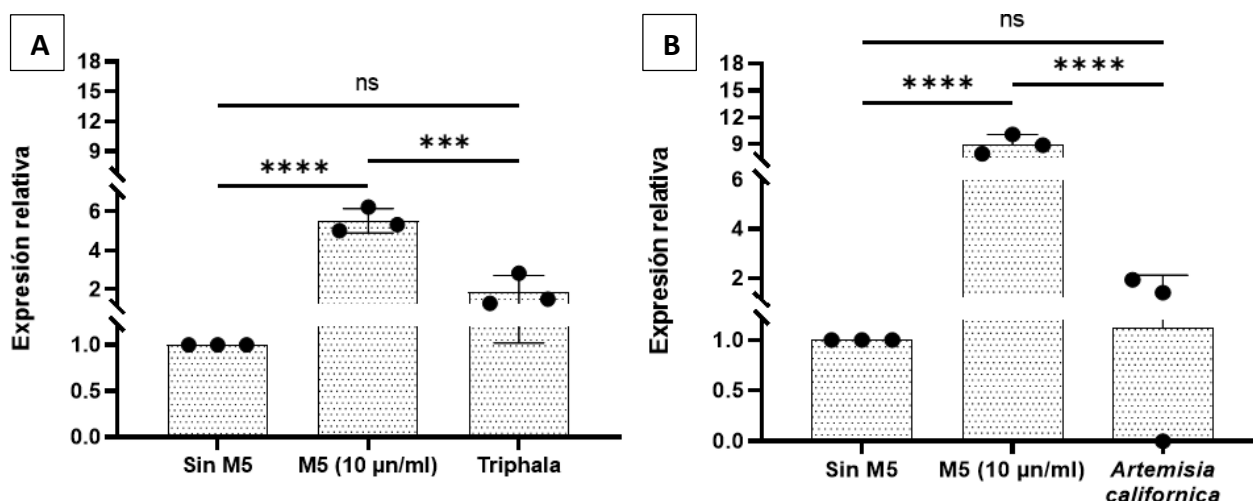


Figura 23. Efecto de expresión de CXCL8 con células tratadas con los extractos herbales de Triphala y *Artemisia californica*. A) Efecto del extracto etanólico de Triphala en la expresión relativa de CXCL8, B) Efecto del extracto acuoso de *Artemisia californica* en la expresión relativa de CXCL8. ANOVA una vía, método de comparación por Tukey, n=2-3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

El efecto de los extractos en la quimiocina CCL20 (Figura 24) mostró que las células estimuladas con M5 sobreexpresaron esta molécula 4.3 veces más en la Figura 24A que las células sin M5 y 5 veces más en la Figura 24B que las células sin M5, presentando ambas graficas diferencias significativas. En las células tratadas con Triphala (Figura 24A), la expresión relativa de CCL20 aumentó 2.3 veces en comparación con las células estimuladas únicamente con M5, manteniéndose con diferencias significativas respecto a este control. Por otro lado, *Artemisia californica* (Figura 24B) redujo la expresión relativa de CCL20 en un 94.6%, lo que representa una diferencia altamente significativa respecto a las células estimuladas solo con M5, sin mostrar diferencias estadísticas frente a las células sin estimulación, lo cual representa una reducción del 80 % entre células con M5 y el tratamiento con *Artemisia californica*. Aunque las células con perfil psoriásico respondieron al tratamiento con Triphala, se esperaba que, como en el caso de *Artemisia*

*californica*, su expresión se redujera significativamente.

Por otro lado, los resultados esperados del efecto de los extractos de *Artemisia californica* y Triphala en la expresión de CCL20, solo *Artemisia californica* concuerda con el trabajo realizado por Wei et al. (2024), donde se determinó el efecto antipsoriásico por la supresión de CCL20 por el ácido 18 $\beta$ -glicirretínico, compuesto proveniente la planta regaliz, a través de la detección de niveles de expresión por RT-qPCR y un ensayo de citocinas. Las pruebas en su trabajo las realizaron en un modelo de lesión cutánea aplicando imiquimod en ratones normales, provocando heridas similares a psoriasis y en células HaCaT. La expresión de CCL20 se consideró en ese trabajo debido a ser un importante puente de retroalimentación entre queratinocitos y células inmunitarias, ya que es el ligando del receptor CCR6 presentes en células inmunitarias, como las células dendríticas y Th17.

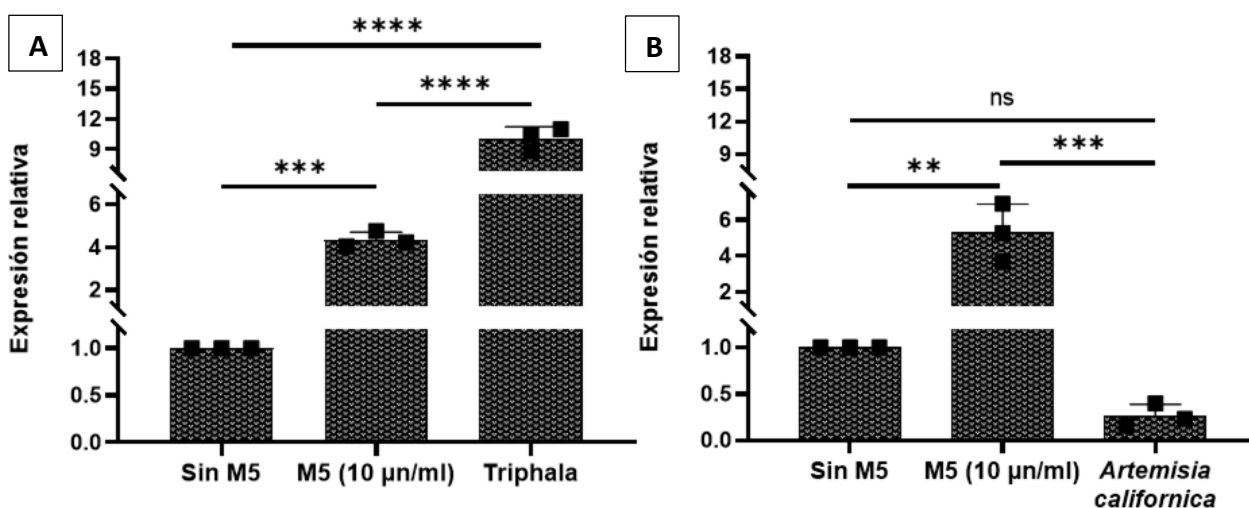


Figura 24. Efecto de expresión de CCL20 con células tratadas con los extractos herbales de Triphala y *Artemisia californica*. A) Efecto del extracto etanólico de Triphala en la expresión relativa de CCL20, B) Efecto del extracto acuoso de *Artemisia californica* en la expresión relativa de CCL20. ANOVA una vía, método de comparación por Tukey, n=3 por grupo (P<0.05), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y <0.0001 (\*\*\*\*).

Para los genes KRT1, IL-6 y S100A7, solo se realizaron tratamientos con *Artemisia californica* (Figura 25). Este extracto mostró una disminución en la expresión relativa de los tres genes. En el caso de KRT1 (Figura 25A), su expresión se redujo un 61.5 %, y la IL-6 (Figura 25B) aumentó su expresión en un 87 %, estos cambios representan diferencias significativas entre las células estimuladas y las no estimuladas con M5. Sin embargo, KRT1 mostró una disminución del 57 % en las células tratadas con el extracto en comparación

con los queratinocitos estimulados con M5. En el caso de IL-6, el tratamiento podría haber reducido su expresión a niveles demasiado bajos para superar el umbral de detección, como lo sugieren Pazdernik y Prediger (2020).

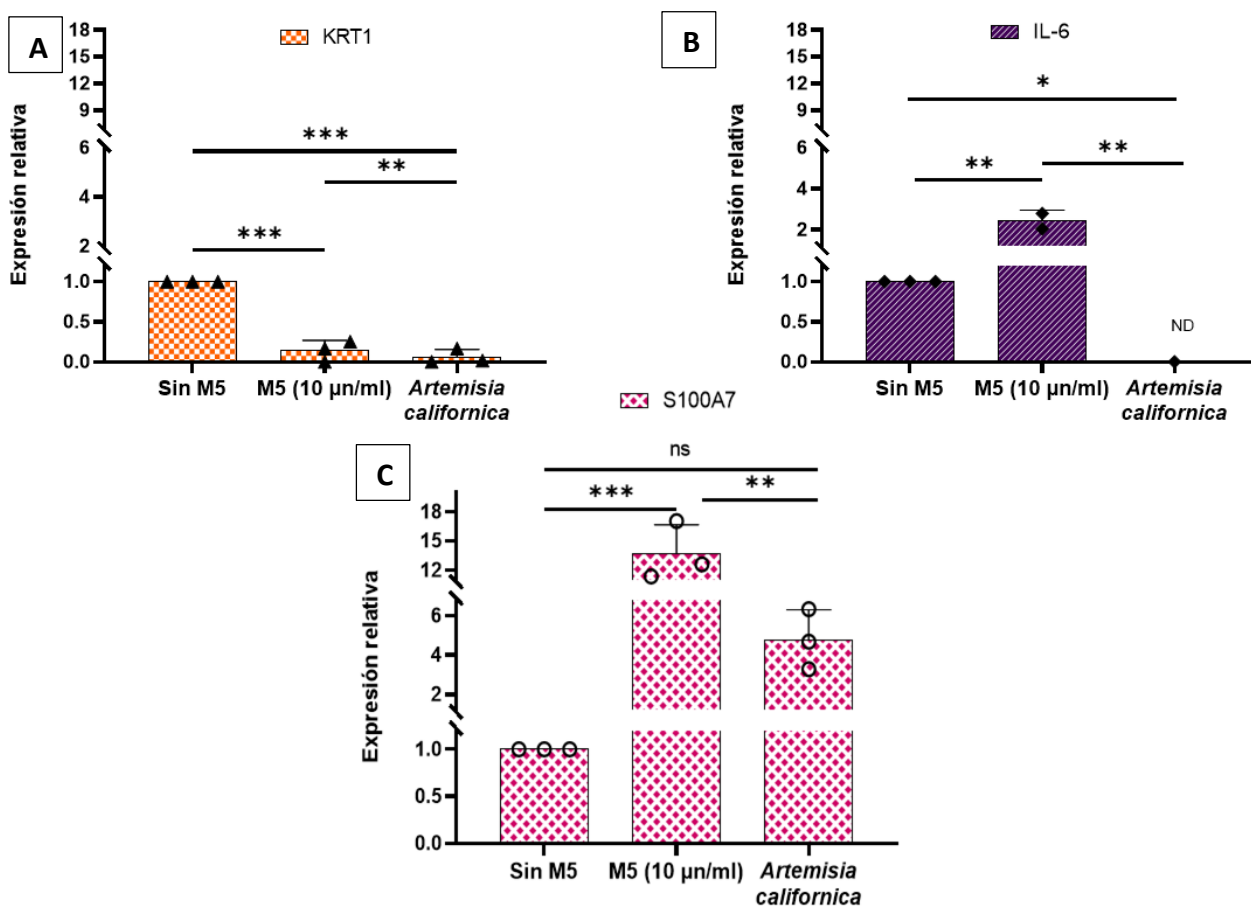


Figura 25. Efecto de expresión de KRT1, IL-6 y S100A7 en células tratadas con los extractos herbales de *Artemisia californica*. A) KRT1, B) IL-6 y C) S100A7. ANOVA una vía, método de comparación por Tukey, n=2-3 por grupo ( $P < 0.05$ ), donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ND: valor no determinado.

En cuanto a S100A7 (Figura 25C), este gen mostró un incremento significativo de 13 veces más en su expresión relativa en las células psoriásicas, mientras que el tratamiento con *Artemisia californica* disminuyó esta expresión en un 64 %, alcanzando niveles sin diferencias estadísticas con las células no estimuladas con M5. Esto sugiere que *Artemisia californica* tiene un efecto modulador inflamatorio en genes asociados al perfil psoriásico, especialmente IL-6 y S100A7. Cabe destacar que S100A7 es considerada un biomarcador por aumentar su expresión drásticamente en queratinocitos en lesiones

psoriásicas a comparación de queratinocitos normales (Guilloteau et al., 2010; Liang et al., 2023). Aunque parte de los mecanismos de acción y funciones de S100A7 son desconocidos, estudios sugieren que S100A7 tiene una función dentro de la hiperproliferación de queratinocitos en la psoriasis, ya que pueden activar vías de señalización intracelular, promoviendo la activación de citocinas proinflamatorias que exacerbaban la inflamación y la proliferación celular en la psoriasis (Liang et al., 2024). Esta respuesta puede estar asociada a través de la regulación positiva entre diversas moléculas, como, por ejemplo, otras proteínas de la familia S100A (Ekman et al. 2017; Liang et al., 2023; Wei et al., 2024). En el estudio de Granata et al. (2019) se refuerza la función de S100A7 en la psoriasis, ya que demostraron que la interacción entre esta proteína y el cofactor Jab1 contribuyen a la proliferación en muestras de piel psoriásica y queratinocitos humanos normales transfectadas con el plásmido de activación CRISPR S100A7. La reducción en la expresión relativa de IL-6 en respuesta a tratamientos herbales fue esperada según los estudios previos en plantas con efectos anti-psoriásicos. Por ejemplo, Mingfen et al. (2021) mostraron que el curcumol a 10 y 20  $\mu\text{M}$ , seguido de una estimulación con M5 en células NHEK, y Takuathung et al. (2021) encontraron resultados similares en células HaCaT tratadas con 15  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de *Kaempferia parviflora* y luego estimuladas con TNF $\alpha$ .

Del mismo modo, Gendrisch et al. (2021) observaron reducciones significativas de IL-6 y CXCL8, en el cual compararon el efecto de tres plantas: *Humulus lupulus*, *Hypericum perforatum* y *Curcuma amada*, donde hubo una reducción de expresión con diferencias significativas de IL-6 al ser estimuladas con IL-17, TNF $\alpha$  e IL-22 por 24 h en queratinocitos humanos primarios (HPK) previamente tratadas 2 h con los extractos. Sin embargo, en KRT1 se observó un aumento de expresión al ser tratadas con *Humulus lupulus* y *Hypericum perforatum*, pero el tratamiento con *Curcuma amada* y con ditranol (fármaco tópico usado en lesiones psoriásicas) no se mostraron efectos sobre la expresión de este gen. En ese mismo estudio, se hizo un análisis de tinción inmunohistoquímicos en la misma línea celular estimulada, donde S1007A mostró la reducción de expresión tras el tratamiento con *Humulus lupulus* y *Hypericum perforatum*. Otro estudio realizado por Gao et al. (2020), también muestra la reducción significativa en nivel de expresión en el nivel de IL-6 y CXCL8 en células HaCaT co-tratados con dafteina y M5.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los extractos herbales evaluados, especialmente el extracto acuoso de *Artemisia californica*, muestran un efecto modulador en la respuesta inflamatoria y proliferativa en queratinocitos psoriásicos al evaluar la expresión genética de genes determinantes en psoriasis. El extracto de *Artemisia californica* logró reducir de manera significativa la expresión de varios biomarcadores clave, como CXCL8, CCL20, IL-6 y S100A7, mientras que el extracto etanólico de Triphala

demostró efectos selectivos, con una modulación destacada en la expresión de CCL20, lo que sugiere un efecto en la inflamación producida en un entorno psoriásico.

La reducción de la sobreexpresión de estos genes sugiere que los extractos tienen potencial para modular el entorno inflamatorio característico de la psoriasis, donde *Artemisia californica* demostró un perfil más consistente y amplio en su acción antiinflamatoria/antiproliferativa. Estos hallazgos abren la puerta a estudios más detallados para comprender mejor los mecanismos específicos de estos extractos y su posible uso terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas como la psoriasis.

## Capítulo 4. Conclusiones

---

Se estableció el modelo de psoriasis en un monocultivo de queratinocitos HEK con el coctel M5 (IL-17A, IL-22, oncostatina M, IL-1 $\alpha$  y TNF $\alpha$ ). El perfil psoriásico, se demostró a través de una sobreexpresión de genes inflamatorios CXCL8, CCL20 e IL-6; la sobreexpresión del gen proliferativo/inflamatorio S100A7; y la inhibición del gen KRT1, siendo genes considerados como biomarcadores psoriásicos por sus efectos en la inflamación y proliferación en la enfermedad.

Bajo las condiciones *in vitro* evaluadas, y tras la exposición de células con perfil psoriásico a los tratamientos herbales, el extracto acuoso de *Artemisia californica* tuvo un impacto antiinflamatorio y antiproliferativo al reducir significativamente la expresión de CXCL8, CCL20, IL-6, y S100A7. Por su parte, el extracto etanólico de Triphala mostró una modulación con la reducción de expresión del CXCL8, pero un aumento de expresión de CCL20, lo que indica la necesidad de más estudios para comprender mejor su potencial modulador.

En este trabajo, se evaluaron extractos herbales utilizados en la medicina tradicional. De los cinco extractos estudiados, el extracto etanólico de Triphala y los extractos acuosos de *Artemisia californica*, *Anemopsis californica*, *Hemidesmus indicus*, y *Eclipta prostrata* mostraron una notable reducción en la expresión de genes proinflamatorios como TNF $\alpha$  e IL-6 en macrófagos M1 a una concentración de 125  $\mu$ g/ml.

Este trabajo abre la posibilidad de seguir investigando los extractos de *Artemisia californica*, *Anemopsis californica*, *H. indicus*, *E. prostrata* y Triphala como candidatos potenciales para el desarrollo de fármacos contra enfermedades inflamatorias.

## Literatura citada

- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., y Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Almatroodi, S. A., Alsahli, M. A., Almatroudi, A., Dev, K., Rafat, S., Verma, A. K., y Rahmani, A. H. (2020). Amla (*Emblica officinalis*): Role in health management via controlling various biological activities. *Gene Reports*, 21. <https://10.1016/j.genrep.2020.100820>
- Alves, N. R. de M., Kurizky, P. S., da Mota, L. M. H., de Albuquerque, C. P., Esper, J. T., Campos, A. S. C., Reis, V. P., Ferro, H. M., Gil-Jaramillo, N., Brito-de-Sousa, J. P., Leal, L. C. L., Nóbrega, O. de T., Araújo, C. N. de, Santos Júnior, A. de C. M. dos, Martins, G. A., Martins Filho, O. A., y Gomes, C. M. (2024). Elevated serum IL-6 levels predict treatment interruption in patients with moderate to severe psoriasis: a 6-year real-world cohort study. *Anais Brasileiros de Dermatologia. Elsevier Espana S.L.U.*, 99(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.03.002>
- Austin, A., Jegadeesan, M., y Gowrishankar, R. (2003). Antimicrobial Activity of *Hemidesmus indicus* var. *indicus* R.Br. Against Human Isolates of *Helicobacter pylori*. *The Korean Society of Pharmacognosy*, 9(1), 578-81. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2866357/>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2866357/>
- Balkrishna, A., Sakat, S. S., Joshi, K., Joshi, K., Sharma, V., Ranjan, R., Bhattacharya, K., y Varshney, A. (2019). Cytokines driven anti-inflammatory and anti-psoriasis like efficacies of nutraceutical sea buckthorn (*hippophae rhamnoides*) oil. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01186>
- Betts, G., Desaix, P., Johnson, J., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J., Womble, M., y Young, K. (2022). *Anatomy & Physiology*. 1a ed. OpenStax, Houston, Texas. Recuperado el 22 de julio de 2023, de <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>
- Bielecka, E., Zubrzycka, N., Marzec, K., Maksylewicz, A., Sochalska, M., Kulawik-Pióro, A., Lasoń, E., Śliwa, K., Malinowska, M., Sikora, E., Nowak, K., Miastkowska, M., y Kantyka, T. (2024). Ursolic Acid Formulations Effectively Induce Apoptosis and Limit Inflammation in the Psoriasis Models In Vitro. *Biomedicines*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040732>
- Bocheńska, K., Moskot, M., Smolińska-Fijołek, E., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Szczerkowska-Dobosz, A., Słomiński, B., y Gabig-Cimińska, M. (2021). Impact of isoflavone genistein on psoriasis in vivo and in vitro investigations. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97793-4>
- Bu, J., Ding, R., Zhou, L., Chen, X., y Shen, E. 2022. Epidemiology of Psoriasis and Comorbid Diseases: A Narrative Review. En *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880201>
- Caifeng Chen Li Chen, J. Z. R. C. Z. Y. y Zhang, D. 2023. Anti-psoriasis activities of hydroxytyrosol on HaCaT cells under psoriatic inflammation in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 45(3), 328–333. <https://doi.org/10.1080/08923973.2022.2143373>



- California Native Plant Society. (2024). *Yerba mansa: Anemopsis californica*. Calscape. [https://www.calscape.org/Anemopsis-californica-\(Yerba-Mansa\)](https://www.calscape.org/Anemopsis-californica-(Yerba-Mansa))
- California Native Plant Society. (2024). California Sagebrush, *Artemisia californica*. Calscape. [https://calscape.org/Artemisia-californica-\(\)](https://calscape.org/Artemisia-californica-())
- Chen, C., Wu, N., Duan, Q., Yang, H., Wang, X., Yang, P., Zhang, M., Liu, J., Liu, Z., Shao, Y., & Zheng, Y. (2018). C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26996-z>
- Chiricozzi, A., Romanelli, P., Volpe, E., Borsellino, G., & Romanelli, M. (2018). Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010179>
- Daniels, L. A., Van Slambrouck, S., K. Lee, R., S. Arguello, T., Browning, J., J. Pullin, M., Kornienko, A., & F.A. Steelant, W. (2006). Effects of extracts from two Native American plants on proliferation of human breast and colon cancer cell lines in vitro. *Oncology reports*, 15(5), 1327–1331. <https://doi.org/10.3892/or.15.5.1327>
- Das, S. (2021). *Psoriasis - Trastornos dermatológicos*. Manual MSD versión para profesionales. Recuperado el 18 de julio de 2023, de <https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-dermatol%C3%B3gicos/psoriasis-y-enfermedades-descamativas/psoriasis>
- Dueñas, S., Escalante, T., Gasperin-Bulbarela, J., Bernáldez-Sarabia, J., Cervantes-Luévano, K., Jiménez, S., Sánchez-Campos, N., Cabanillas-Bernal, O., Valdovinos-Navarro, B. J., Álvarez-Lee, A., De León-Nava, M. A., & Licea-Navarro, A. F. (2023). Chimeric Peptides from *Californiconus californicus* and *Heterodontus francisci* with Antigen-Binding Capacity: A Conotoxin Scaffold to Create Non-Natural Antibodies (NoNaBodies). *Toxins*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/toxins15040269>
- Ekman, A. K., Vegfors, J., Bivik Eding, C., y Enerbäck, C. (2017). Overexpression of psoriasin (S100A7) contributes to dysregulated differentiation in psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica*, 97(4), 441–448. <https://doi.org/10.2340/00015555-2596>
- Feng, L., Zhai, Y. Y., Xu, J., Yao, W. F., Cao, Y. D., Cheng, F. F., Bao, B. H., & Zhang, L. (2019). A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Eclipta prostrata* (L.) L. *Journal of Ethnopharmacology*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112109>
- Filomena, P., Luca, F., Ian, H., Matteo, B., Asma, E., Angela, F., Charles, G., Francesca, A., & James David, A. (2019). Naturally occurring sesquiterpene lactones and their semi-synthetic derivatives modulate PGE2 levels by decreasing COX2 activity and expression. *Heliyon*, 5. 01366. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01366>
- Fimognari, C., Lenzi, M., Ferruzzi, L., Turrini, E., Scartezzini, P., Poli, F., Gotti, R., Guerrini, A., Carulli, G., Ottaviano, V., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2011). Mitochondrial pathway mediates the antileukemic effects of *hemidesmus indicus*, a promising botanical drug. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021544>
- Gao, J., Chen, F., Fang, H., Mi, J., Qi, Q., & Yang, M. (2020). Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice. *Biological Research*, 53(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00316-0>

- Gaspari, A. A., Tyring, S. K., & Kaplan, D. H. (2017). Clinical and Basic Immunodermatology. En *Springer eBooks* (2ª ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29785-9>
- Gasperin Bulbarela, J. (2021). Caracterización de la actividad antifibrótica de dominios vNAR neutralizantes de TGF- $\beta$  en modelos dérmicos. [Tesis de Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3594>
- Gendrisch, F., Haarhaus, B., Krieger, N., Quirin, K. W., Schempp, C. M., & Wölfle, U. (2021). The effect of herbal medicinal products on psoriasis-like keratinocytes. *Biomolecules*, 11(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biom11030371>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-015-1546-9>
- Grän, F., Kerstan, A., Serfling, E., Goebeler, M., & Muhammad, K. (2020). Current developments in the immunology of Psoriasis. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 93, 97–110. [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7087066/pdf/yjbm\\_93\\_1\\_97.pdf](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7087066/pdf/yjbm_93_1_97.pdf)
- Granata, M., Skarmoutsou, E., Gangemi, P., Mazzarino, M. C., & D'Amico, F. (2019). S100A7, Jab1, and p27 kip1 expression in psoriasis and S100A7 CRISPR-activated human keratinocyte cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3), 3384–3392. <https://doi.org/10.1002/jcb.27609>
- Guerrini, A., Mancini, I., Maietti, S., Rossi, D., Poli, F., Sacchetti, G., Gambari, R., & Borgatti, M. (2014). Expression of pro-inflammatory interleukin-8 is reduced by ayurvedic decoctions. *Phytotherapy Research*, 28(8), 1173–1181. <https://doi.org/10.1002/ptr.5109>
- Guilloteau, K., Paris, I., Pedretti, N., Boniface, K., Juchaux, F., Huguier, V., Guillet, G., Bernard, F.-X., Lecron, J.-C., & Morel, F. (2010). Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  Recapitulates Some Features of Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 184(9), 5263–5270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902464>
- Guo, J., Zhang, H., Lin, W., Lu, L., Su, J., & Chen, X. (2023). Signaling pathways and targeted therapies for psoriasis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–38. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01655-6>
- Gupta, A., Kumar, R., Ganguly, R., Singh, A. K., Rana, H. K., & Pandey, A. K. (2021). Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective activities of Terminalia bellirica and its bioactive component ellagic acid against diclofenac induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Toxicology Reports*, 8, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.12.010>
- Hsueh, T. P., Lin, W. L., Dalley, J. W., & Tsai, T. H. (2021). The pharmacological effects and pharmacokinetics of active compounds of *Artemisia capillaris*. En *Biomedicines*, 9(10), 1412. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101412>
- Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H.-B. (2022). Activating THP1-derived macrophage in vitro. *Methods in molecular biology*, 1784, 119. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:251736969>

- Huang, Y., Tian, C., Li, Q., & Xu, Q. (2019). TET1 Knockdown Inhibits Porphyromonas gingivalis LPS/IFN- $\gamma$ -Induced M1 Macrophage Polarization through the NF- $\kappa$ B Pathway in THP-1 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms20082023>
- Jaiswal, Y. S. & Williams, L. L. (2017). A glimpse of Ayurveda – The forgotten history and principles of Indian traditional medicine. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 50-53. <https://doi.org/10.1016/j.itcme.2016.02.002>
- Jara-Palacios, M. J., Gonçalves, S., Heredia, F. J., Hernanz, D., & Romano, A. (2020). Extraction of antioxidants from winemaking byproducts: Effect of the solvent on phenolic composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities, and electrochemical behaviour. *Antioxidants*. MDPI, 9(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9080675>
- Jha, A. K. & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 119, 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019>
- Kalaiselvan, S. & Rasool, M. K. (2016). Triphala herbal extract suppresses inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and adjuvant-induced arthritic rats via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Immunotoxicology*, 13(4), 509–525. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2015.1136010>
- Kamata, M. & Tada, Y. (2022). Dendritic Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis. *Frontiers in Immunology*, 13, 941071. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.941071>
- Kim, Y. K., Hwang, J. H., & Lee, H. T. (2022). Differential susceptibility to lipopolysaccharide affects the activation of toll-like-receptor 4 signaling in THP-1 cells and PMA-differentiated THP-1 cells. *Innate Immunity*, 28(3), 122–129. <https://doi.org/10.1177/17534259221100170>
- Korman, N. J. (2020). Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence? *British Journal of Dermatology*, 182(4), 840–848. <https://doi.org/10.1111/bjd.18245>
- Kumar, N. y Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kumar, N. S., Nair, A. S., Nair, A. M., & Murali, M. (2016). Pharmacological and therapeutic effects of triphala-A literature review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3), 23-27. <https://www.phytojournal.com/archives/2016/vol5issue3/PartA/5-2-33-672.pdf>
- Kumar, P., Baraiya, S., Gaidhani, S. N., Gupta, M. D., & Wanjari, M. M. (2012). Antidiabetic activity of stem bark of Bauhinia variegata in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(1), 64-66. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.92518>
- Lee, S. Y., Nam, S., Hong, I. K., Kim, H., Yang, H., & Cho, H. J. (2018). Antiproliferation of keratinocytes and alleviation of psoriasis by the ethanol extract of *Artemisia capillaris*. *Phytotherapy Research*, 32(5), 923–932. <https://doi.org/10.1002/ptr.6032>
- Leigh, I. M., Navsaria, H., Purkis, P. E., Mckay, I. A., Bowden, P. E., & Riddle, P. N. (1995). Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *British Journal of Dermatology*, 133(4), 501–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1995.tb02696.x>

- Liang, H., Li, J., & Zhang, K. (2023). Pathogenic role of S100 proteins in psoriasis. *Frontiers in Immunology*, 14, 1191645. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1191645>
- López Vázquez, E. (2019). Elaboración de fichas técnicas etnomédicas plurilingües enfocado en la flora nativa de Baja California, México. [Tesis de Licenciatura en Traducción, Universidad Autónoma de Baja California]. Repositorio institucional: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/38b7ab70-38a8-4c9e-a1fe-80a539e58b13/content>
- López-Mejía, R., Ramales-Montes, E. M., Ley-Silva, L. S., Romero-Sansalvador, C. Y., y Gutiérrez-Gabriel, I. (2022). Calidad de vida, depresión y su relación con la severidad en la psoriasis. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 60(3), 315–320. Recuperado el 18 de julio de 2023, de [http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista\\_medica/article/view/4432/4379](http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/view/4432/4379)
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M., & Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130), 866–873. <https://doi.org/10.1038/nature05663>
- Luetragoon, T., Sranujit, R. P., Noysang, C., Thongsri, Y., Potup, P., Suphrom, N., Nuengchamnong, N., & Usuwanthim, K. (2020). Bioactive compounds in moringa oleifera Lam. Leaves inhibit the pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced human monocyte-derived macrophages. *Molecules*, 25(1), 191. <https://doi.org/10.3390/molecules25010191>
- Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, 430, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.012>
- Meager, A. (2006). Cytokines: Interleukins. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200300048>
- Medina-Holguín, A. L., Omar Holguín, F., Micheletto, S., Goehle, S., Simon, J. A., & O'Connell, M. A. (2008). Chemotypic variation of essential oils in the medicinal plant, *Anemopsis californica*. *Phytochemistry*, 69(4), 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.11.006>
- Mingfen, L., Junyi, S., Fan, J., & Jingjing, L. (2021). Curcumol may alleviate psoriasis-like inflammation by inhibiting keratinocyte proliferation and inflammatory gene expression via JAK1/STAT3 signaling. *AGING*, 13(14), 18392–18403. <https://doi.org/10.18632/aging.203287>
- Miron, A., Nahar, L., Gille, E., & Sarker, S. D. (2020). Antipsoriatic natural products. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 55, 297-325. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2020.02.005>
- Nakbanpote, W., Ruttanakorn, M., Sukadeetad, K., Sakkayawong, N., & Damrianant, S. (2019). Effects of drying and extraction methods on phenolic compounds and in vitro assays of *Eclipta prostrata* Linn leaf extracts. *Science Society of Thailand under Royal Patronage*, 45(2), 127–137. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2019.45.127>
- Nandy, S., Mukherjee, A., Pandey, D. K., Ray, P., & Dey, A. (2020). Indian Sarsaparilla (*Hemidesmus indicus*): Recent progress in research on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 254, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112609>

- National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. (2020). Psoriasis Basics: Diagnosis, Treatment, and Steps to Take. Recuperado el 18 de julio de 2023, de <https://www.niams.nih.gov/health-topics/psoriasis/basics/diagnosis-treatment-and-steps-to-take>
- NIAMS. (2020). Puntos importantes sobre la psoriasis. Recuperado el 18 de julio de 2023, de <https://www.niams.nih.gov/es/informacion-de-salud/psoriasis>
- Nigam, M., Mishra, A. P., Adhikari-Devkota, A., Dirar, A. I., Hassan, M. M., Adhikari, A., Belwal, T., & Devkota, H. P. (2020). Fruits of *Terminalia chebula* Retz.: A review on traditional uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities. *Phytotherapy Research*, 34(10), 2518-2533. <https://doi.org/10.1002/ptr.6702>
- Ogawa, E., Sato, Y., Minagawa, A., & Okuyama, R. (2018). Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *Journal of Dermatology*, 45(3), 264-272. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14139>
- Ogawa, K. & Okada, Y. (2020). The current landscape of psoriasis genetics in 2020. *Journal of Dermatological Science*, 99(1), 2 - 8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.05.008>
- Orsmond, A., Bereza-Malcolm, L., Lynch, T., March, L., & Xue, M. (2021). Skin barrier dysregulation in psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10841. <https://doi.org/10.3390/ijms221910841>
- Oubannin, S., Bijla, L., Nid, A. M., Ibourki, M., El Kharrassi, Y., Devkota, K., Bouyahya, A., Maggi, F., Caprioli, G., Sakar, E. H., & Gharby, S. (2024). Recent advances in the extraction of bioactive compounds from plant matrices and their use as potential antioxidants for vegetable oils enrichment. *Journal of Food Composition and Analysis*, 128, 105995. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.105995>
- Pazdernik, N. & Prediger, E. (2020). Guide for troubleshooting qPCR data. *Integrated DNA Technologies, Inc.* <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/a-quick-guide-for-troubleshooting-qpcr-data>
- Pietrzak, A., Chabros, P., Grywalska, E., Pietrzak, D., Kandzierski, G., Wawrzycki, B., Roliński, J., Gawęda, K., & Krasowska, D. (2020). Serum concentration of interleukin 6 is related to inflammation and dyslipidemia in patients with psoriasis. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 37(1), 41–45. <https://doi.org/10.5114/ada.2018.78028>
- Pinto, S. M., Kim, H., Subbannayya, Y., Giambelluca, M., Bösl, K., & Kandasamy, R. K. (2020). Dose-dependent phorbol 12-myristate-13-acetate-mediated monocyte-to-macrophage differentiation induces unique proteomic signatures in THP-1 cells. *BioRxiv*, 968016. <https://doi.org/10.1101/2020.02.27.968016>
- Pinto, S. M., Kim, H., Subbannayya, Y., Giambelluca, M. S., Bösl, K., Ryan, L., Sharma, A., & Kandasamy, R. K. (2021). Comparative Proteomic Analysis Reveals Varying Impact on Immune Responses in Phorbol 12-Myristate-13-Acetate-Mediated THP-1 Monocyte-to-Macrophage Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 12, 679458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679458>
- Raharja, A., Mahil, S. K., & Barker, J. N. (2021). Psoriasis: A brief overview. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 1(3), 170-173. <https://doi.org/10.7861/CLINMED.2021-0257>



- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. Bin, & Uddin, M. S. (2022). Role of phenolic compounds in human disease: Current knowledge and future prospects. *Molecules*, 27(1), 233. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Rangel, B. (1998). Botanical Studies of Yerba mansa (*Anemopsis californica*. Saururaceae). [Theses of Doctor of Philosophy in Botany, University of California, Riverside]. ProQuest Dissertations & Theses: <https://www.proquest.com/openview/7e310daf4a64ce48909422b4c1769025/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- Rentería Pacheco, O. (2023). Actividad inmunomoduladora de toxinas del veneno de *Conasprella ximenes*, en un modelo murino. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3846>
- Robinson, K. F., Narasipura, S. D., Wallace, J., Ritz, E. M., & Al-Harhi, L. (2020).  $\beta$ -Catenin and TCFs/LEF signaling discordantly regulate IL-6 expression in astrocytes. *Cell Communication and Signaling*, 18, 1-14. <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-020-00565-2>
- Roth, W., Kumar, V., Beer, H. D., Richter, M., Wohlenberg, C., Reuter, U., Thiering, S., Staratschek-Jox, A., Hofmann, A., Kreuzsch, F., Schultze, J. L., Vogl, T., Roth, J., Reichelt, J., Hausser, I., & Magin, T. M. (2012). Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18. *Journal of Cell Science*, 125(22), 5269–5279. <https://doi.org/10.1242/jcs.116574>
- Sarama, R., Matharu, P. K., Abduldaiem, Y., Corrêa, M. P., Gil, C. D., & Greco, K. V. (2022). In Vitro Disease Models for Understanding Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 803218. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.803218>
- Shi, B., Hao, Y., Li, W., Dong, H., Xu, M., & Gao, P. (2022). TIPE2 May Target the Nrf2/HO-1 Pathway to Inhibit M1 Macrophage–Related Neutrophilic Inflammation in Asthma. *Frontiers in Immunology*, 13, 883885. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883885>
- Shin, J. W., Kwon, M. ae, Hwang, J., Lee, S. J., Lee, J. H., Kim, H. J., Lee, K. B., Lee, S. J., Jeong, E. M., Chung, J. H., & Kim, I. G. (2020). Keratinocyte transglutaminase 2 promotes CCR6+  $\gamma\delta$ T-cell recruitment by upregulating CCL20 in psoriatic inflammation. *Cell Death and Disease*, 11(4), 301. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2495-z>
- Starr Tregel, Bauler, T. J., Malik-Kale Preeti, & Steele-Mortimer, O. (2018). The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. *Public Library of Science*, 13(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193601>
- Statti, G., Marrelli, M., Conforti, F., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Fimognari, C., Brognara, E., Gambari, R., Sacchetti, G., & Guerrini, A. (2015). Inhibition of cancer cell proliferation and antiradical effects of decoction, hydroalcoholic extract, and principal constituents of *Hemidesmus indicus* R. Br. *Phytotherapy Research*, 29(6), 857–863. <https://doi.org/10.1002/ptr.5322>
- Takuathung, M. N., Potikanond, S., Sookhee, S., Mungkornasawakul, P., Jearanaikulvanich, T., Chinda, K., Wikan, N., & Nimlamool, W. (2021). Anti-psoriatic and anti-inflammatory effects of *Kaempferia parviflora* in keratinocytes and macrophage cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 143, 112229. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112229>

- Tsuji, G., Hashimoto-Hachiya, A., Yen, V. H., Takemura, M., Yumine, A., Furue, K., Furue, M., & Nakahara, T. (2020). Metformin inhibits IL-1 $\beta$  secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes: implications for preventing the development of psoriasis. *Cell Death Discovery, Springer Nature*, 6(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0245-8>
- Waszkowiak, K. & Gliszczyńska-Świątło, A. (2016). Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. *European Food Research and Technology. Springer Verlag*, 242(5), 777–786. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2585-9>
- Wei, J., Zhang, J., Hu, F., Zhang, W., Wu, Y., Liu, B., Lu, Y., Li, L., Han, L., & Lu, C. (2024). Anti-psoriasis effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid by breaking CCL20/CCR6 axis through its vital active group targeting GUSB/ATF2 signaling. *Phytomedicine*, 128, 155524. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155524>
- Wroński, A. & Wójcik, P. (2022). Impact of ROS-Dependent Lipid Metabolism on Psoriasis Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12137. <https://doi.org/10.3390/ijms232012137>
- Yamanaka, K., Yamamoto, O., & Honda, T. (2021). Pathophysiology of psoriasis: A review. *Journal of Dermatology*, 48(6), 722-731. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15913>
- Zhang, Y., Zou, J., & Chen, R. (2022). An M0 macrophage-related prognostic model for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 22(1), 791. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09872-y>
- Zhao, Y.-L., Tian, P.-X., Han, F., Zheng, J., Xia, X.-X., Xue, W.-J., Ding, X.-M., & Ding, C.-G. (2017). Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18(12), 1055–1063. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700003>

## Anexos

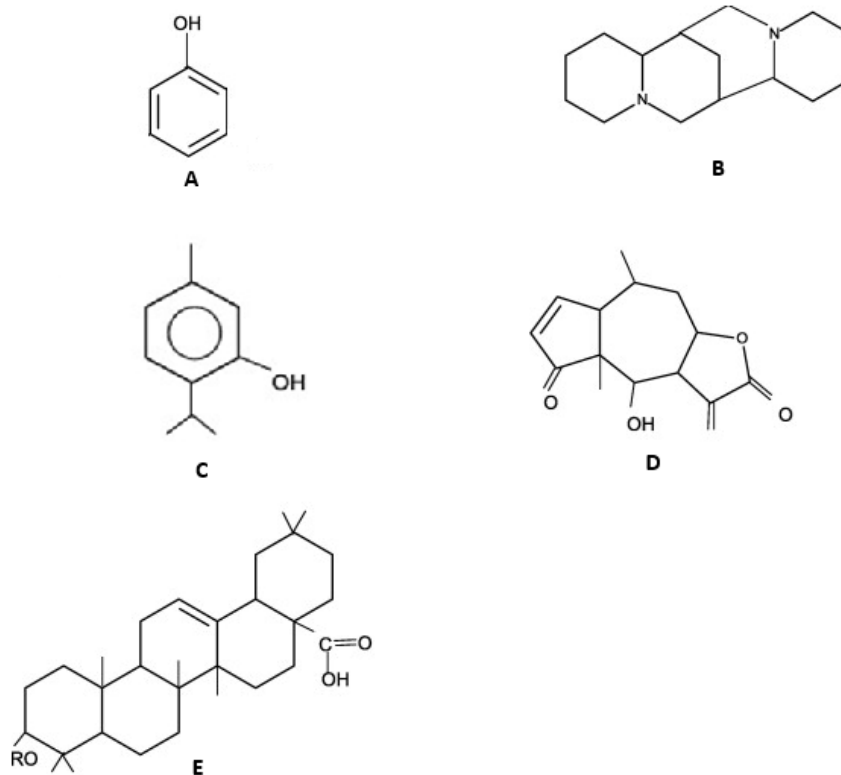


Figura 26. Estructuras generales de compuestos bioactivos. A) Compuestos fenólicos, B) alcaloides, C) monoterpenos, D) sesquiterpenos y E) triterpenos y saponinas. Fuente: Modificado de Azmir et al., (2013).

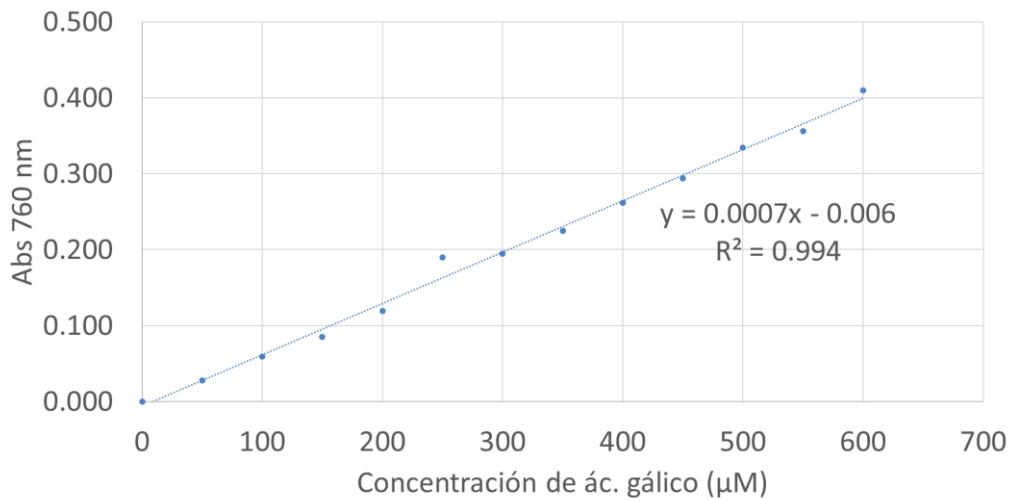


Figura 27. Curva de referencia de ácido gálico para determinar el contenido de los extractos herbales. La ecuación para la interpolación fue  $y=0.0007x-0.006$  con una  $R^2$  de 0.994.



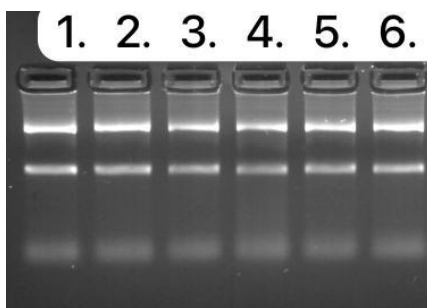


Figura 28. Gel de agarosa al 2% de tratamientos en macrófagos. 1. Triphala, 2. *E. prostrata*, 3. *H. indicus*, 4. *Anemopsis californica*, 5. *Artemisia californica*.