



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

.....

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA Y RADICALES LIBRES DE
DOS EXTRACTOS DE BARRETA (*Helietta parvifolia*) EN UN MODELO DE
RATAS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

**P R E S E N T A:
CARLOS GEOVANY PÉREZ HERNÁNDEZ**

DIRECTOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

ASESOR: MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL

MEXICO, DF. FEBRERO 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

***“EN TÚ VIDA NO TE DAS A CONOCER POR LAS PERSONAS QUE HAS
BESADO,
POR LA FAMA DE TU FAMILIA, POR EL DINERO QUE TIENES,
POR TU COLOR DE PIEL, POR TU RELIGION, POR TUS PREFERENCIAS
NI POR LO GUAPO NI POR LO FEO QUE ERES...
SIMPLEMENTE NO ES NADA DE ESO.....
EN TÚ VIDA TE DAS A CONOCER POR TODOS AQUELLOS MOMENTOS
DE FELCIDAD O TRISTEZA QUE PROPORCIONAS A LOS DEMAS”.***
ESO ES REALMENTE EL GRAN VALOR DE UN SER HUMANO.

GEOVANY

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios

Agradezco por darme la oportunidad de permitirme vivir y seguir viviendo y de concluir con mis estudios profesionales con el que cumplo mi segundo objetivo en la vida que era ser un Q.F.B.

Este trabajo esta dedicado a mis padres Teresa Hernández Ygnacio y Joel Martínez Posadas, a mi mamá les doy gracias por su apoyo, por aceptarme tal cual soy, por sus consejos, su apoyo moral y social, por su gran amor y sobretodo por enseñarme a valorar, respetar y luchar por lo que uno quiere ¡GRACIAS MAMÁ!. A mi papá por su apoyo, consejos y enseñanzas de la vida ¡GRACIAS POR SER MI PAPÁ!. Ellos han sido y serán mis maestros de toda la vida.

A mi mamá Lupe y mi papá Rene por su amor, por sus enseñanzas, anécdotas y por sus consejos. Ya que son un gran ejemplo de vida, lucha y esfuerzo.

A mi hermana Lic. Elizabeth y hermano Emanuell por su cariño, por las vivencias, alegrías y tristezas, por su apoyo y que a pesar de todo cuentan conmigo y no pude tener mejores hermanos que ustedes.

A mis tíos, tías, primos, primas, sobrinos gracias por ser parte de mi familia, por su afecto y cariño.

Todos ellos son un gran ejemplo
GRACIAS POR TODO.
LOS QUIERO MUCHO...

A mi Director de tesis

Gracias DR. Rubén Marroquín Segura, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Por su paciencia, tiempo y empeño. Por ser un gran ser humano y alentarme siempre a seguir adelante, por su optimismo y confianza. Por su ayuda, consejos y conocimientos los cuales se ven reflejados en esté proyecto.

A mi asesor de tesis

MC. Maurilio Flores Pimentel por su asesoría, orientación y disponibilidad para la realización de este proyecto.

A los profesores y sinodal

DR. Luís Mora

Q.F.B. Yolanda Flores

Por aceptarme como miembro de esta gran familia, por su asesoría, orientación y que me apoyaron en todo lo que pudieron para que se culminara este proyecto.

A mis sinodales

Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio y

Q.F.B. Oscar

Por su atención, asesoría, orientación y consejos para el termino de este proyecto.

A la UNAM.

Por hacer realidad mi primer objetivo en la vida que era ser un universitario. Por la aportación de sus conocimientos y que en su escudo esta escrito:

“Por mi raza hablara el espíritu”

Que significa lo que realmente es ser universitario.

Gracias por enseñarme a ser humano

A mis amigos de la FES
Q.F.B. Hilda (Hildo)
Q.F.B. Lucia (Lucía)
Q.F.B. Mariela (Marielo)
Q.F.B. Erick (Gerick)
Q.F.B. Aurora Jacal (Aurorita)
Por ser unos grandes compañeros y
amigos fieles e incondicionales. Gracias
por todo su apoyo y afecto.

A mis amigos del CCH
Q.F.B. Ma. Guadalupe
MC. Miriam Moctezuma
MC. Ana Elena García
MC. Vianney Nava
Ingeniero Evelyn J. Calderón,
MC. Tania y Lizbeth.
Por las miles de aventuras, confidencias,
alegrías, tristezas, por todos aquellos
momentos que vivimos en el CCH y
sobre todo por su amistad.

A mis compañeros y futuros colegas de el
laboratorio de Inmunología
Q.F.B. Guadalupe
Q.F.B. Eliza
Q.F.B. Brenda
Q.F.B. Blanca
Q.F.B. Sandra
Q.F.B. Francisco
Q.F.B. Erick
Q.F.B. Froylan
Q.F.B. Carmelo
Por su amistad, compañerismo, consejos
y su apoyo en la proceso de este proyecto.

A mis amigos de desma...ñanadas y
trabajo
Papá Rafi
Edgar
Lic. en Turismo Carlos
Lic. Cesar
MC. Raúl
I.Q. Guadalupe
I.Q. Martín
Tec. Lab. Eduardo
Por todos los momentos de diversión, por
su constante motivación de superación,
consejos, apoyo y sobre todo por su
cariño y amistad incondicional.

A todos aquellos amigos y en especial
enemigos, los cuales prefiero no nombrar
para no omitir a nadie, les doy gracias por
sus críticas, comentarios e intentos en
desalentarme para no seguir y alcanzar
mis objetivos. Ya que gracias a su
constante empeño, me alentaron y dieron
fuerza para que hoy en día se vea
culminado este proyecto, aprendí a ser
más fuerte, a crecer como persona, a
valorar la vida, a luchar día a día para
alcanzar un objetivo y sobre todas las
cosas aprendí a quererme y aceptarme tal
cual soy.

A todas aquellas personas que me
apoyaron en cualquier situación y que
puede haber olvidado en este momento, y
a todos ustedes... ¡¡¡GRACIAS!!! Por
que de cada persona que conoces en la
vida se puede aprender grandes cosas.

“Que Dios los Bendiga”

G E O V A N Y

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1. Sistema inmunitario	3
3.2. FACTORES MECÁNICOS	4
3.3. FAGOCITOSIS	10
3.4. ANTIINFLAMATORIOS AINES	16
3.5. LESION CELULAR INDUCIDA POR RADICALES LIBRES	19
3.6. BARRETA	20
3.7. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	21
3.8. CERULOPLASMINA	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5. OBJETIVOS	25
6. HIPÓTESIS	26
7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	26
8. DIAGRAMA DE FLUJO	27
9. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	28
10. MÉTODO	20
10.1. Preparación de la población de estudio.	20
10.2. Obtención de suspensión celular de polimorfonucleares (PMN).	31
10.3. Opsonización del Zymosan A.	31
10.4. Obtención de suspensión celular de macrófagos (MA).	32
10.5. Reducción de Nitro Azul de Tetrazolium (NBT) espectrofotométrica.	32
10.6. Reducción de Nitro Azul de Tetrazolium (NBT) en placa.	33
10.7. Formación de rosetas EA.	34
10.8. Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial.	35
10.9. Determinación de Nitritos.	36
10.10. Determinación de peroxidación lipídica (MDA).	37
11. RESULTADOS	39
11.1. Resultados del Análisis estadístico de las diferentes determinaciones	43
12. ANÁLISIS DE RESULTADOS	55
13. CONCLUSIONES	57
14. ANEXO	58
14.1. Obtención y purificación de Ceruloplasmina así como la obtención de suero de conejo anti-ceruloplasmina.	58
14.2. Preparación de reactivos.	
15. REFERENCIAS	78

1. RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad fagocítica de los polimorfonucleares (PMN) en sangre periférica y macrófagos (MA) peritoneales, así como los radicales libres en ratas machos cepa Wistar con la administración oral de los extractos de Barreta (*Helietta parvifolia*). Se determinó en PMN y MA peritoneales la reducción de nitro azul de tetrazolium (NBT), para determinar el porcentaje de fagocitosis (técnica en placa), reducción de NBT (técnica espectrofotométrica) se evaluará la adherencia por la formación de rosetas EA (técnica de rosetas Fc). En plasma se determinó la producción de NO_2^- como un indicador de la generación de óxido nítrico NO (técnica de reacción de Griess), se determinó peroxidación lipídica siguiendo el método de Aust, (ácido tiobarbitúrico) y se determinó ceruloplasmina por el método de Mancini (inmunodifusión radial). Los resultados muestran que el extracto de corteza de Barreta en el método cualitativo y cuantitativo para PMN y MA presentó disminución en la reducción de NBT. En nitritos, peroxidación lipídica y ceruloplasmina no tuvo efecto. Por lo cual se confirmó su efecto antiinflamatorio sobre las células que participan en la inflamación. El extracto de hojas de Barreta no presentó efecto en la reducción de NBT ni en radicales libres.

2. INTRODUCCIÓN

La inflamación representa una compleja secuencia de fenómenos que estimulan reacciones inmunitarias. El daño tisular que causa una herida o un microorganismo patógeno invasor induce una compleja secuencia de fenómenos que se conocen en conjunto como reacción inflamatoria. Los signos cardinales de la inflamación reflejan los tres principales fenómenos de una reacción inflamatoria: 1) La vasodilatación (un aumento del diámetro de los vasos sanguíneos). 2) Un aumento de la permeabilidad capilar facilita una afluencia de líquido y células de los capilares ingurgitados hacia el tejido. 3) La afluencia de fagocitos. La migración de los fagocitos es un proceso de múltiples etapas que incluyen la adherencia de las células a la pared endotelial de los vasos sanguíneos, seguida de su migración entre las células endoteliales de los capilares hacia los tejidos y por último a través del tejido hasta el sitio de la invasión (quimiotaxis) para comenzar la actividad fagocítica¹⁷. Los procesos inflamatorios continúan hasta que se resuelvan las condiciones causantes de su inicio. Para evitar estas consecuencias de una inflamación, la forma de controlarlo es la administración de antiinflamatorios, para ayudar a disminuir todos los factores que éste libera. De los

antiinflamatorios más comunes en su consumo son los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son sustancias químicas con efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético¹⁹. Actualmente el papel universal del uso de las plantas en el tratamiento de las enfermedades está ejemplificado en su utilidad en los sistemas principales de medicina²¹. En la actualidad se están realizando investigaciones y proponiendo el uso de otras sustancias como antiinflamatorios de origen natural. Un estudio reciente realizado en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, reveló que la planta Barreta (*Helietta parvifolia*) en comparación con la indometacina (AINEs), tiene un efecto antiinflamatorio efectivo ante la inflamación crónica y este extracto de planta es una propuesta como una alternativa de antiinflamatorio²⁷. En el caso de la barreta además de probar su actividad como antiinflamatorio, es conveniente evaluar la actividad de las células y observar si éstas no se ven afectadas por el consumo de dicho inflamatorio. El propósito de este trabajo es evaluar la actividad fagocítica de los polimorfonucleares (PMN) en sangre periférica y macrófagos (MA) peritoneales, así como los radicales libres en ratas machos cepas Wistar de tres meses de edad con peso promedio de 300-400g con la administración oral de los extractos de Barreta (*Helietta parvifolia*). Se determinará en la suspensión celular de PMN y MA peritoneales la reducción de nitro azul de tetrazolium (NBT), para determinar % de fagocitosis (técnica en placa)^{1, 2}, reducción de NBT (técnica espectrofotométrica)^{3, 4, 5, 6, 7}, se evaluará la adherencia por la formación de rosetas EA (técnica de rosetas Fc)^{8, 9, 10}. En plasma se determinará la producción de NO_2^- como un indicador de la generación de óxido nítrico NO (técnica de reacción de Griess)^{11, 12}, se determinará peroxidación lipídica siguiendo el método de Aust (ácido tiobarbitúrico)¹³ y se determinará ceruloplasmina por el método de Mancini (inmunodifusión radial)^{14, 15, 16}. La utilidad de este estudio es importante ya que proporcionaría datos sobre el efecto secundario que pueda presentar un nuevo antiinflamatorio sobre la actividad de las células que participan en la inflamación y así evitar o en su caso contribuir a su consumo para con ello ayudar al mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Sistema inmunitario

El cuerpo humano continuamente intenta mantener la homeostasis contrarrestando las actividades de los organismos productores de la infección, que se denomina patógeno, o de sus toxinas. La capacidad para combatir la infección a través de las defensas del cuerpo recibe el nombre de resistencia. La vulnerabilidad o falta de resistencia se llama susceptibilidad. Las defensas contra las enfermedades se pueden agrupar en dos grandes áreas importantes: La resistencia no específica y la resistencia específica¹⁷.

Principales características de las respuestas inmunitarias

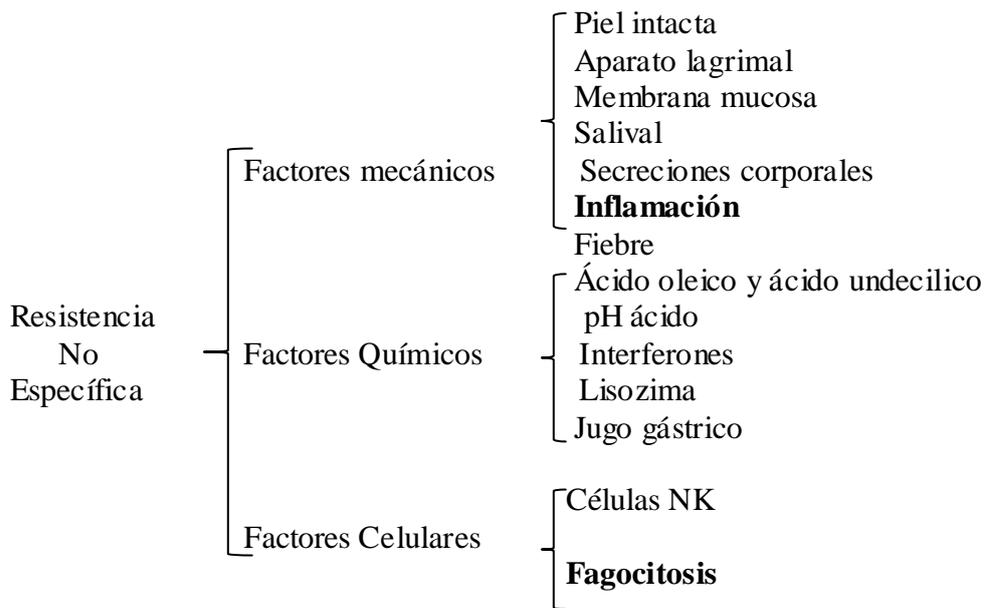
El análisis experimental de la respuesta inmunitaria es, de hecho un intento de proporcionar explicaciones moleculares y mecánicas a estas características fundamentales de la inmunidad específica.

Especificidad: las respuestas inmunitarias son específicas para antígenos distintos. De hecho, las respuestas inmunitarias son específicas para diferenciar componentes estructurales de proteínas complejas, polisacáridos y otros antígenos. Las porciones de dichos antígenos que son reconocidas de forma específica por linfocitos individuales se denominan determinantes o epítomos. Esta refinada especificidad existe por que los linfocitos B y T individuales que responden a antígenos extraños expresan receptores de membrana que distinguen diferencias sutiles entre antígenos diferentes. Los linfocitos específicos de antígeno se desarrollan sin estimulación antigénica, de forma que en los individuos no inmunizados existen clones de células con diferentes receptores de antígeno y especificidades para reconocer y responder a la exposición a antígenos extraños¹⁸.

Discriminación entre lo que es propio y lo que no lo es: Una de las propiedades más señaladas del sistema inmunitario es su capacidad para distinguir entre antígenos extraños y antígenos propios. De esta forma, los linfocitos de cada individuo son capaces de reconocer y responder a muchos antígenos extraños, aunque normalmente no

responden a las sustancias potencialmente antigénicas presentes en ese individuo. La auto-tolerancia es un proceso adquirido que debe ser aprendido por los linfocitos de cada individuo. Ello ocurre en parte porque los linfocitos pasan en su desarrollo por una fase donde el encuentro con el antígeno conduce a su muerte o inactivación.

La resistencia no específica a la infección: involucra 1) factores mecánicos 2) factores químicos y 3) factores celulares¹⁷.



Del cuadro sinóptico anterior los puntos más relevantes son los que se encuentran marcados con negritas y que a continuación de desarrollan¹⁸.

3.2. FACTORES MECÁNICOS

Inflamación

Cuando las células son dañadas por microorganismos, agentes físicos o agentes químicos, se establece la reacción de inflamación (respuesta inflamatoria). La lesión se puede observar como una forma de tensión¹⁷. La inflamación es una respuesta de defensa del cuerpo ante la agresión debida al daño de los tejidos que por lo general se caracteriza por cuatro síntomas fundamentales: hiperemia, dolor, calor y aumento de volumen¹⁹. Un quinto síntoma puede ser la pérdida de la función en el área lesionada.

La pérdida de la función depende del sitio y de la extensión de la lesión. La respuesta inflamatoria sirve como una medida protectora y de defensa. Es un intento para eliminar microbios, toxinas o material extraño en el sitio de la lesión con objeto de evitar la diseminación a otros órganos y preparar al sitio para la reparación de los tejidos. Así la respuesta inflamatoria es un intento para restablecer la homeostasis de los tejidos²⁰.

La inflamación aguda presenta tres componentes principales:

- a) vasodilatación: modificaciones en el calibre de los vasos sanguíneos, permitiendo el aumento en el flujo de sangre.
- b) Aumento en la permeabilidad vascular: alteraciones en la estructura de la microvasculatura, que permite la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos.
- c) infiltración celular: la migración de los leucocitos desde el punto en el que abandonan la microcirculación, hasta el foco de la lesión, en donde se acumulan.

Estos cambios son desencadenados de manera principal por mediadores químicos que están ampliamente distribuidos de modo secuestrado o inactivo a través del cuerpo y se liberan activan localmente en el sitio de la inflamación. Después de su liberación tienden a inactivarse con rapidez para asegurar el control del proceso inflamatorio¹⁹.

Cuando la hinchazón es grave puede haber pérdida de la función del área afectada. Si el agente lesivo se elimina con rapidez, el tejido pronto será reparado y regresará a su estado original. Los procesos inflamatorios continúan hasta que se resuelvan las condiciones causantes de su inicio con la administración de antiinflamatorios¹⁸.

Los antiinflamatorios más comunes en su consumo son los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) un ejemplo la Indometacina, son sustancias químicas con efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético, efectos que son similares a los de los corticoides. Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas²¹.

Células de la inflamación

Las células fagocíticas, como los macrófagos y los neutrófilos, las barreras como la piel, y una diversidad de compuestos antimicrobianos sintetizados por el huésped tienen funciones importantes en la inmunidad innata.

En contraste con la amplia reactividad del sistema inmunitario innato, que es uniforme en todos los miembros de una especie, el componente específico, *inmunidad adaptativa*, no actúa hasta que no existe un reto antigénico para el organismo. La inmunidad adaptativa responde al desafío con un gran elevado de especificidad y, asimismo, con la propiedad notable de “memoria”^{31, 32}.

Las funciones de las células se pueden ver agraviadas por diferentes factores, de los cuales pueden ser externos o internos o también el envejecimiento, la contaminación, el ritmo de vida, los fármacos, etc. Todos estos y de más factores pueden afectar nuestra inmunidad³³.

En donde el estrés oxidativo se ha relacionado con el envejecimiento, pero al igual con la contaminación, consumo de fármacos o genéticamente que están relacionados también en la patogénesis de una gran variedad de padecimientos, y lo cual da cambios en la respuesta inmune, en los radicales libre o antioxidantes. En la actualidad se a estudiado estos cambios en o efectos con el consumo de fármacos^{10, 11, 34}.

Células fagocíticas

Aunque varias células tienen la capacidad de ingerir partículas, sólo los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos (MA) lo hacen “de manera profesional” y ésta es su función preponderante.

Polimorfonucleares: Leucocitos polimorfonucleares: Estas células, en ocasiones, se denominan granulocitos y son de vida corta (2 a 3 días) comparados con macrófagos que pueden sobrevivir durante meses o años. Comprenden del 60 al 70 % de los leucocitos pero también migran hacia los tejidos en respuesta a la clasifican como neutrófilos, eosinófilos y basófilos con base en su función histoquímica^{33, 35, 36}.

Los basófilos se encuentran en números en extremo pequeños en la circulación (<0,2%) y tienen ciertas características en común con las células cebadas tisulares. Ambos tipos de células tienen receptores en su superficie para la porción Fc de la IgE y el entrecruzamiento de esta inmunoglobulina por el antígeno lleva a la liberación de

diversos mediadores farmacológicos (figura 1). Estas moléculas estimulan una respuesta inflamatoria, hay dos tipos de células cebadas; una se encuentra en el tejido conjuntivo y la otra, relacionada a mucosas. Las células cebadas y los basófilos se derivan de la médula ósea, pero no está clara su relación en el desarrollo³³.



Figura 1. Imágenes de células fagocíticas.

Fagocitos mononucleares, el sistema fagocítico mononuclear comprende *monocitos* que circulan en la sangre y *macrófagos* diseminados en los tejidos. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo alrededor de ocho horas, durante las cuales crecen; a continuación, migran hacia los tejidos y se diferencian en macrófagos específicos de tejido o células dendríticas³⁶.

Monocitos: Los monocitos son células sanguíneas de gran tamaño de 17-20 micrómetros (μm), el citoplasma contiene numerosas vesículas de pinocitosis y gran número de lisosomas. Tienen receptores membranales para el fragmento cristalizante de las inmunoglobulinas (fragmento Fc) y para la porción del sistema del complemento C3b. Las funciones principales de los monocitos son la liberación de productos esenciales en la inflamación, la pinocitosis y la fagocitosis (figura 1)³⁵. Los monocitos son el principal componente del sistema retículoendotelial o sistema fagocítico mononuclear (SFM). Su función más importante es la fagocitosis³⁵.

Las células mencionadas hasta ahora se originan en médula ósea, compartiendo un antecesor común como se muestra en figura 2. En esta imagen se representa las líneas celulares hematopoyética.

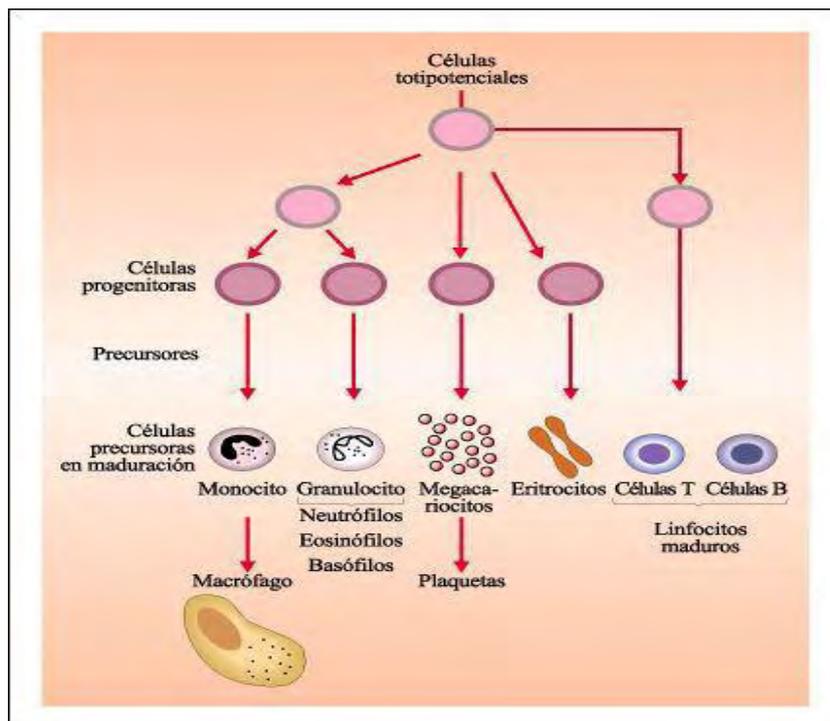


Figura 2. Origen, maduración y vida media de las células fagocíticas “profesionales”.

Fibroblastos. Son células mesenquimales de los tejidos. En el foco inflamatorio se transforman en fibroblastos, proliferando en la fase tardía o crónica y formando el tejido de granulación. Los fibroblastos sintetizan colágena, que es esencial para la cicatrización y curación de las heridas. Algunos fibroblastos tienen capacidad de fagocitar³⁵.

Células Endoteliales. En el estadio inicial de la inflamación, las células endoteliales tienen un papel activo en la adherencia y paso de células por los espacios interendoteliales y de diversas moléculas por los poros intracelulares. El papel primordial del endotelio en la inflamación se relaciona con la adherencia de los leucocitos y el paso de células y solutos fuera del vaso. El endotelio sintetiza la interleucina-1 (IL-1), expresando antígenos en la superficie de clase I (HLA) y II (MHC); posee en su superficie propiedades procoagulantes y anticoagulantes que cuando se alteran pueden causar una coagulación intravascular^{35, 37}.

Las células parecidas a macrófagos tienen diferentes funciones en distintos tejidos y se denominan de acuerdo con su localización tisular:

- *Macrófagos alveolares* en el pulmón.
- *Histiocitos* en los tejidos conjuntivos.
- *Células de Kupffer* en el hígado.
- *Células mesangiales* en el riñón.
- *Células microgliales* en el cerebro.
- *Osteoblastos* en el hueso.

Aunque casi siempre se encuentran en estado de reposo, los macrófagos se activan por una diversidad de estímulos en el curso de una reacción inmunitaria^{31,33,38}.

Actividad fagocítica de PMN y MA

Existen muchos mecanismos de defensa del hospedero en su esfuerzo para evadir a los microorganismos que lo invaden. Uno de estos mecanismos inespecíficos de defensa, es la fagocitosis. Ésta se define como el fenómeno mediante el cual una célula engulle una partícula completa. Por ejemplo: bacterias, parte de otras células, gránulos de polvo o de pigmentos, etc.^{39,40}.

La fagocitosis representa uno de los sistemas de defensa más primitivos en el hospedero^{48,41}.

Las células relacionadas de manera específica con el fenómeno de la fagocitosis son: leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares (células de Kupffer, macrófago alveolares, peritoneales, etc.)^{40,42}.

No obstante que hay diferencias específicas entre la función fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, el proceso fagocítico incluye varias etapas secuenciales que son comunes en ambas células y que comprenden la quimiotaxis, la adhesión, la endocitosis (la cual se optimiza por la opsonización de las partículas), y los cambios físicos y bioquímicos intracelulares que capacitan a los fagocitos para endocitar, matar y digerir a los microorganismos^{41,36}.

Existen varias formas de evaluar las diferentes etapas de la fagocitosis en donde para poder medir la citopepsis se realiza la prueba de reducción del NBT con la cual se determina y se conoce el buen comportamiento de la fagocitosis o si en su caso se presenta una anomalía en su actividad⁴³.

3.3. FAGOCITOSIS

Proceso de fagocitosis

El proceso de fagocitosis se puede dividir en 4 pasos diferentes: quimiotaxis, opsonización, ingestión y muerte intracelular. Todos los pasos están íntimamente relacionados, todos ocurren en una célula fagocítica determinada, y el fenómeno se efectúa por todas las células fagocíticas del foco inflamatorio⁴⁴.

Quimiotaxis

La quimiotaxis es el fenómeno mediante el cual moléculas secretadas por células en el foco infeccioso atraen la movilización y reclutamiento fagocitos, siendo ésta la primera fase del fenómeno inflamatorio, las cuales responden al estímulo llegando al foco inflamatorio, siendo la quimiotaxis la migración de los PMN o MA al foco inflamatorio en respuesta a las citocinas producidas^{41,42}.

En la activación se producen importantes mediadores humorales de la inflamación, como C_{5a} y C_{3a} que es un potente factor quimiotáctico para neutrófilos, monocitos y eosinófilos. También estimula a ésta célula a desgranularse, adherirse al endotelio y a liberar leucotrienos, los cuales por sí mismo son potentes mediadores de la inflamación^{41,45}.

El flujo sanguíneo laminar empuja a los leucocitos así adheridos en dirección de la corriente sanguínea. El fagocito se despega de las interacciones corriente-arriba y sus ligandos de membrana se unen a nuevas selectinas corriente-abajo. El resultado es un movimiento neto a lo largo de la superficie endotelial, como se aprecia en la figura 3.

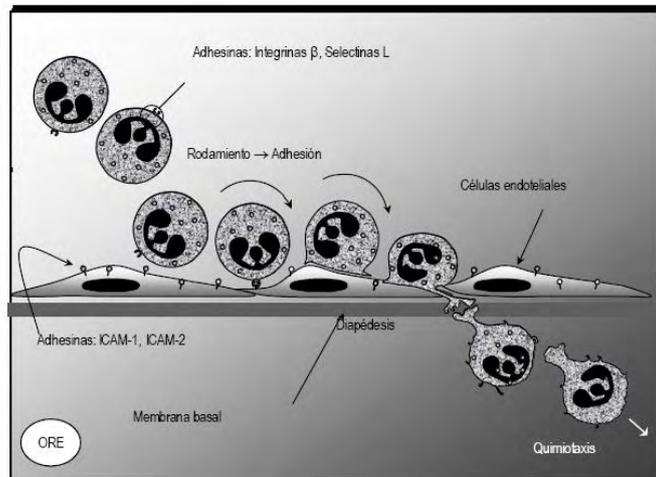


Figura 3. Ilustración de la fase de la quimiotaxis en la actividad fagocítica y receptores que participan.

Es en ese punto de movilización lenta que los fagocitos, atraídos por gradientes de concentración de las quimiocinas, atraviesan el epitelio vascular hacia el foco de infección patógena como se aprecia en la figura 4.

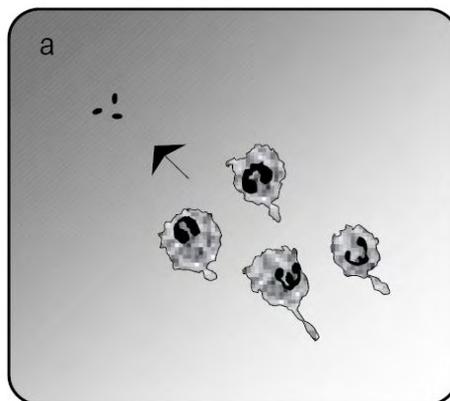


Figura 4. Movimiento de los fagocitos al ser atraídos por el foco infeccioso.

Adherencia

Otros receptores sobre la membrana de los leucocitos y otros fagocitos actúan como mecanismos de adherencia sobre los microorganismos (figura 5), sea a productos microbianos específicos o sobre opsoninas del sistema inmune del hospedador.

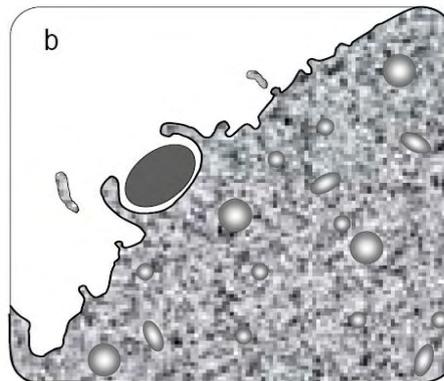


Figura 5. El germen esta adherido a la célula fagocítica, esto se lleva acabo en la fase de la adherencia en la actividad fagocítica.

- Receptor de manosa. Este receptor tiene afinidad por los componentes de manosa presentes en las glucoproteínas y glucolípidos de las paredes celulares microbianos.
- *Scavenger*. Estos receptores se unen directamente a microorganismos y a moléculas de LDL modificadas.
- CD14. Es un ligando con preferencia específica al lipopolisacárido presente en ciertas bacterias y está asociado a un receptor tipo *Toll*.
- Transmembrana de 7 hélices alfa. Es un receptor recientemente descubierto, cuya función está asociada a señales de quimiocinas y ciertos péptidos microbianos.
- Receptores para los fragmentos Fc de los anticuerpos opsonizantes IgG2 e IgG3⁴⁰.

Opsonización

Durante la opsonización, la bacteria se combina con ciertas proteínas del suero y son más susceptibles a la ingestión por fagocitosis. Asimismo, algunas proteínas del suero que ayudan a la ingestión, puede ser llamada opsoninas, Para facilitar la ingestión de bacterias patógenas, las opsoninas son un eslabón importante entre las denominadas inmunidad celular y humoral.

La opsonización puede efectuarse por anticuerpos específicos que pueden funcionar como opsoninas. Los anticuerpos como la inmunoglobulina G o inmunoglobulina M, son capaces de actuar como opsoninas, pero algunos como la inmunoglobulina A, no puede hacerlo. Otra forma de opsonización proviene de los fragmentos resultantes de la activación del complemento, por ejemplo C_{3b} , se une a los receptores CR1 sobre los fagocitos; C_{3b} puede ser roto a C_{3bi} , que se une al receptor CR3, de la molécula MAC-1. Junto con el anticuerpo, ésta promueve la ingestión del organismo. Esta es una función muy importante para la erradicación de la mayoría de las bacterias y hongos ⁴⁵.

Ingestión (endocitosis)

Una vez que la bacteria patógena son opsonizadas, son más susceptibles a la ingestión por las células fagocíticas.

El proceso de la ingestión comienza con el arreglo de la bacteria a la superficie del fagocito (adherencia). Los receptores para la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina se une a su ligando en el PMN, al igual que la molécula opsónica C_{3b} , de tal manera que en la superficie de la célula fagocítica se forman los pseudópodos que producen una vacuola rodeando a la bacteria opsonizada, encerrándola como se aprecia en la figura 6. *Esto es lo que se denomina fagocitosis.*

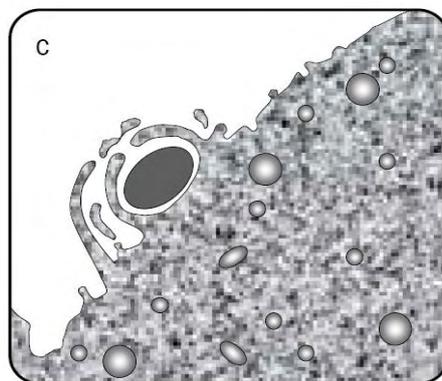


Figura 6. La bacteria opsonizada es encerrada y se comienza la fase de la endocitosis.

Posteriormente se formarán la vacuola lisosoma y se fusionará con la fagocítica dando la vacuola fagolisosoma encargada de dar muerte a lo fagocitado ⁴³.

La unión a receptores de adherencia promueve señales de comunicación intracelular que resultan en la invaginación de la membrana del fagocito rodeando al receptor y su ligando patogénico. Al rodear por completo al complejo receptor molécula, la membrana se une en sus extremos y libera al interior de la célula un fagosoma. Esto puede ocurrir en más de un punto de la membrana celular^{37,38,46}.

Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es un radical libre soluble y gaseoso, que es secretado no sólo por las células endoteliales sino también por los macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular y NADPH, por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS).

En las células endoteliales y en las neuronas, la NOS está presente de forma constitutiva, y puede ser activada rápidamente por el incremento en la concentración citoplásmica de iones de calcio en presencia de calmodulina. La NOS es los macrófagos no es constitutiva sino inducida en la situaciones en las que estas células son activadas por citocinas⁴⁸.

El NO realiza otras funciones importantes en la inflamación. Reduce la agregación y adhesión plaquetaria. El NO producido por macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar grupos sulfhidrilo de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico, y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno (fuertemente oxidante) y un radical hidroxilo (intensamente reactivo).

La producción de NO por parte de macrófagos activados en casos de shock séptico puede producir vasodilatación periférica extrema con shock; a su vez, el NO también ha sido implicado en diversas enfermedades inflamatorias ⁵⁰.

Efectos del óxido nítrico sobre los leucocitos y procesos inflamatorios

El NO afecta las interacciones entre los leucocitos polimorfonucleares y las células endoteliales. Esto se produce por adhesión de neutrófilos a las paredes de las vénulas poscapilares. De esta manera se evidenció que el óxido nítrico está relacionado con la regulación de la adhesión de los glóbulos blancos a las células endoteliales. Por tanto, el NO rige la adhesión de polimorfonucleares y contribuye al mantenimiento de la integridad de la barrera microvascular, a la vez que disminuye la permeabilidad vascular, la inflamación y la formación de edema. Una relación entre la producción de NO y la disminución de tolerancia autoagénica es posible, porque el NO está relacionado con el daño a tejido sano por la inhibición de varias enzimas, además de sus efectos tóxicos sobre macrófagos y células malignas⁴⁹.

Además se ha descubierto la participación de la óxido nítrico sintetasa (NOS) en enfermedades autoinmunes, se supone una relación entre la actividad de la NOS y subpoblaciones de linfocitos T y la influencia del NO sobre la producción de citocinas^{51, 52}. Se estima que el infiltrado de células T en el hígado tiene actividad inducible de la NOS, además de observarse un aumento de nitritos y nitratos en enfermedades autoinmunes⁵³.

Digestión

Los fagocitos cuentan con variados mecanismos microbicidas, los cuales se activan al acoplar el fagosoma con un lisosoma intracelular figura 7. Las enzimas del lisosoma se liberan dentro del recién formado *fagolisosoma* actuando sobre su contenido como se aprecia en la figura 8, y por último se lleva a cabo la liberación o eliminación de los desechos (exocitosis) figura 9, otros componentes tóxicos usados en la digestión de microorganismos son los Intermediarios reactivos del O₂ y el Óxido nítrico⁴⁶.

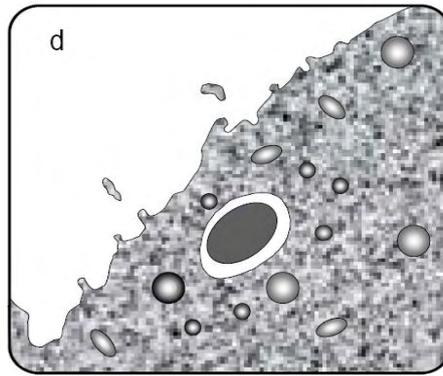


Figura 7. Se aprecia que la bacteria ya dentro del fagocito, esta se forma el fagosoma con un lisosoma.

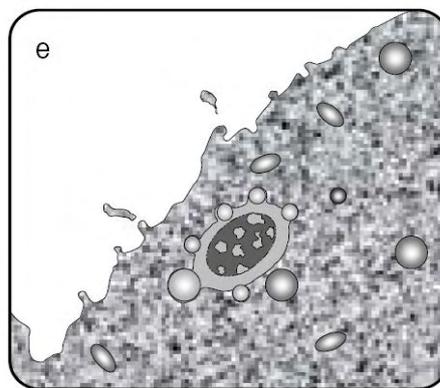


Figura 8. Se forma el *fagolisosoma* y las enzimas del lisosoma se liberan dentro del fagolisosoma y actuando sobre su contenido.

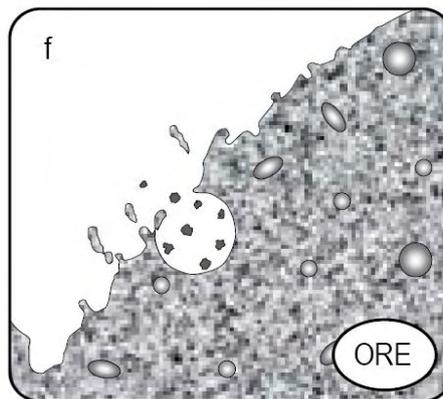


Figura 9. La eliminación de desechos (exocitosis).

Se consigue mediante mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. Entre los dependientes del oxígeno se encuentran los que generan radicales libres de $O_2\bullet$, $OH\bullet$, y $H_2O_2\bullet$. Los neutrófilos contienen mieloperoxidasa, que en presencia de Cl^- , convierte el H_2O_2 en $OCl\bullet$, que es un agente antimicrobiano^{37, 38, 46, 47}.

3.4. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

De los antiinflamatorios más comunes en su consumo son los analgésicos antiinflamatorios no esteroideo.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son sustancias químicas con efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético, efectos que son similares a los de los corticoides. Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas.^{22, 23}

Los corticoesteroides poseen actividad antiinflamatoria potente sin ser analgésicos; el paracetamol y los analgésicos narcóticos tienen efecto analgésico con escasa actividad antiinflamatoria; la aspirina y demás AINEs poseen ambas actividades.

Los fármacos antiinflamatorios se utilizan para tratar desórdenes que originan inflamación, pirexia y dolor de cualquier origen, sea condiciones reumáticas, gota, dismenorrea, enfermedades neoplásicas y cefaleas^{23, 24}.

A nivel celular se han propuesto mecanismos más específicos como:

1. Interferencia con la activación de neutrófilos: Los AINEs inhiben la capacidad de adherencia de las células sanguíneas blancas, especialmente neutrófilos; con la consecuente inhibición de la quimiotaxis y de la agregación de neutrófilos.

2. Los AINEs estimulan la liberación de óxido nítrico.

3. Bloqueo de las citocinas: Se ha postulado que las citocinas tendrían un papel significativo en la inflamación, por lo tanto los AINEs inhiben indirectamente la liberación de las mismas²⁴.

4. La administración de AINEs reduce el dolor inducido por bajo pH al evitar la acidosis que acompaña a un proceso inflamatorio, además de inhibir directamente a los canales iónicos sensibles a ácido (ASICs). Esta acción analgésica se ejerce en el SNC por medio de dos mecanismos.

5. La inhibición de formación de prostaglandina disminuye el procesamiento de los mensajes del dolor²⁵.

Al analizar estas nuevas investigaciones nos damos cuenta que son fármacos completamente necesarios para controlar el dolor agudo y crónico; y al observar que los AINEs pueden ser útiles y reducir marcadamente el componente analgésico e inflamatorio, impidiendo o disminuyendo, pueden ser administrados tanto antes como después de una lesión²³.

Acción antiinflamatoria

INFLAMACIÓN AGUDA: Se da no solamente por la inhibición de la síntesis de PG si no que interfieren con diversas funciones de los neutrófilos: adhesividad, agregación, quimiotaxis, degranulación y generación de metabolitos reactivos de oxígeno²⁴.

INFLAMACIÓN CRÓNICA: En las fases iniciales y en determinados casos, la inhibición de síntesis de PG. También colabora en inhibir las fases iniciales de la acción de PMN²⁴.

Sin embargo los estudios actuales señalan que esta acción no es la única para producir su efecto antiinflamatorio, sino que también de manera directa o indirecta modifican otros mediadores de la inflamación:

- a) Radicales de oxígeno y metabolitos citotóxicos.
- b) Las citocinas que intervienen en la inflamación crónica.
- c) El sistema de complemento que desarrolla actividades proinflamatorias.
- d) Las cininas (bradicinina y precalicreína) que sensibilizan terminales nerviosas produciendo dolor.
- e) Las aminas vasoactivas (histamina y serotonina) que favorecen el incremento de permeabilidad vascular, producidas en plaquetas, mastocitos y basófilos^{23, 24, 25}.

La indometacina es un derivado del indol, reduce la migración de neutrófilos y disminuye la proliferación de linfocitos T y B. Los efectos a nivel gastrointestinal son el dolor abdominal, diarrea, hemorragia gastrointestinal y pancreatitis. Con los cuales tienden a perder peso, también manifiestan la cefalea, mareos, confusión y depresión se presentan hasta en la cuarta parte de pacientes medicados. Se ha observado necrosis

papilar renal. Su uso debe evitarse en pacientes con pólipos nasales o angioedema, y en pacientes asmáticos se puede desencadenar crisis^{20, 26}.

3.5. LESIÓN CELULAR INDUCIDA POR RADICALES LIBRES

Un importante mecanismo de lesión de la membrana, es la lesión inducida por radicales libres, en particular por especies de oxígeno activado. Contribuye a procesos variados como la lesión química y por radiación, la toxicidad por oxígeno y otros gases, el envejecimiento celular, la muerte microbiana por células fagocíticas, la lesión inflamatoria, la destrucción tumoral por macrófagos y otros⁴⁸.

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón no apareado en una órbita externa, es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas, en especial con moléculas claves de las membranas y con ácidos nucleicos.

Los radicales libres pueden iniciarse dentro de las células por:

1. La absorción de la energía radiante (luz ultravioleta, rayos X).
2. Metabolismo enzimático de productos químicos o fármacos exógenos (tetracloruro de carbono (CCl_4) puede generar (CCl_3).
3. Reacciones endógenas, habitualmente oxidaciones, que se producen durante los procesos metabólicos normales⁴⁸.

Las especies reactivas más importantes son:

- Tres especies del oxígeno, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), e iones hidroxilo (OH).
- Oxido nítrico: puede actuar como radical libre y puede ser convertido a un anión peroxinitrito altamente reactivo (ONOO^-), además de NO^-_2 y NO_3^- .

Los efectos de estas especies se pueden englobar en 3 reacciones:

1. Peroxidación de los lípidos de las membranas. Los radicales libres en presencia de oxígeno pueden causar la peroxidación de lípidos dentro de las membranas plasmáticas y organelos.
2. Modificación oxidativa de las proteínas. Los radicales libres promueven la formación de enlaces cruzados mediada por sulfhidrilo en los polipéptidos.
3. Lesiones en el ácido desoxirribonucleico (ADN)⁴⁹.

Hay, sin embargo, diversos sistemas enzimáticos y no enzimáticos que contribuyen a la terminación o inactivación de las reacciones de radicales libres, por ejemplo:

- Antioxidantes endógenos y exógenos que bloquean la formación de radicales libres o la inactivan. P. ej., vitamina E, cisteína, ceruloplasmina, albúmina, transferrina y células barrenderas.
- Enzimas. Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa⁵⁰.

3.6. BARRETA (*Helietta parvifolia*)

Actualmente el papel universal de las plantas en el tratamiento de las enfermedades está ejemplificado en su empleo en los sistemas principales de medicina. El conocimiento de los efectos medicinales, narcóticos y demás propiedades de las plantas se ha pasado de generación en generación, principalmente en las regiones del África tropical, Norte y Sudamérica, y países del Pacífico^{21, 22}. Gran parte de la medicina tradicional mexicana es el resultado de la reconciliación de los conocimientos médicos aztecas y las teorías médicas europeas²².

La *Helietta parvifolia* (Barreta) fue estudiada como parte de la búsqueda de agentes anticancerosos, en un primer momento²⁷; posteriormente ha sido objeto de estudio en México, como agente antimicótico de uso agrícola, sin esclarecer la presencia o ausencia de tal actividad, ni los métodos que se utilizaron para determinar la actividad antimicótica^{27, 28, 29}. Esta planta ha sido utilizada para el tratamiento de las heridas en caballos, como antiinflamatorio; además de usarse en forma de polvo para proteger semillas del ataque de hongos la cual no está aun comprobada²⁷.

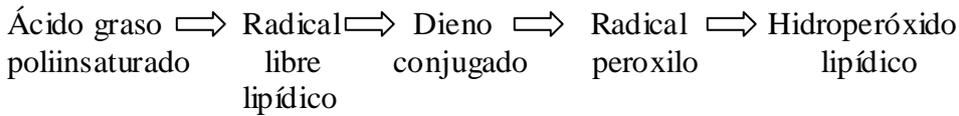
En la actualidad se están realizando investigaciones y proponiendo el uso de nuevos antiinflamatorios de origen natural. Un estudio reciente realizado en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, reveló que el extracto acuoso de corteza y el extracto de hoja de la planta Barreta (*Helietta parvifolia*) tiene un efecto antiinflamatorio efectivo ante la inflamación crónica a una dosis efectiva media de 60 mg/Kg y es una propuesta como una alternativa de antiinflamatorio³⁰. Por tal interés estudiar que efectos pueda tener en las células que participan en la inflamación este extracto como antiinflamatorio al comparar con antiinflamatorio indometacina.

3.7. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de los radicales libres de interés biológico suele corresponder a especies extremadamente reactivas e inestables, por lo que su periodo de vida media es muy corto, así como su radio de acción. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical, se puede formar un nuevo radical libre que podrá reaccionar, a su vez, con otro compuesto no radical y así sucesivamente. De esta manera, es posible que se cree reacciones en cadena que darán lugar a efectos biológicos lejos del lugar donde se originó el primer radical. Un claro ejemplo de este hecho lo constituye la peroxidación lipídica^{33, 35}.

Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena hidrocarbonada para originar un radical libre lipídico. Los ácidos grasos poliinsaturados son especialmente susceptibles al ataque de los radicales libres, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace metileno C-H. El radical libre lipídico, para estabilizarse, sufre un reajuste molecular que produce un dieno conjugado. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular y se forma un radical peroxilo que puede dar lugar a endoperóxidos, o bien tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar de nuevo, radical libre lipídico y un hidroperóxido³⁴.

Reacción de peroxidación lipídica:



Los hidroperóxidos lipídicos son compuestos estables, pero si entran en contacto con iones metálicos de transición, producen más radicales que pueden iniciar y propagar otras reacciones en cadena. De esta manera, se altera la estructura de las membranas y, por tanto, su función. Los productos finales de la peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y alteran la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis³².

3.8. CERULOPLASMINA

Los diversos anticuerpos desarrollados contra las muchas clases de antígenos, se encuentran en la fracción globulina α de las proteínas del plasma. Las globulinas α se subdividen en los grupos α_1 y α_2 .

La ultracentrifugación ha mostrado, la presencia de un componente principal con una constante de sedimentación de alrededor de 7s y otro menos de alrededor de 19s.

El componente de 19s está constituido por dos clases muy diferentes de proteínas, una de ellas emigra como globulina α_1 y la otra como globulina α_2 ⁵⁴.

Dentro de las globulinas α_2 encontramos a la ceruloplasmina.

	Cantidad estimada mg/100 mL	Movilidad electroforética	Peso molecular	Punto isoelectrico, pH	Función principal
Ceruloplasmina	30	4.6	132 kDa	4.4	Transporte de cobre

La ceruloplasmina (Cp) es una proteína plasmática, anti-oxidante, que participa en el metabolismo del cobre y el hierro en la célula. Esta globulina se sintetiza principalmente en hígado, se dice que es una proteína de fase aguda.

Las funciones fisiológicas de la ceruloplasmina incluyen:

- Transporte de cobre
- Coagulación
- Angiogénesis
- Ayuda en el estrés oxidativo por captación de radicales superóxidos y secuestro de iones libres de cobre.
- Oxidación de lipoproteínas de baja densidad.
- Homeostasis del hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de Fe^{2+} en Fe^{3+} ^{50,55}.

Se ha encontrado que los niveles de ceruloplasmina sérica y la actividad y cantidad de cobre se incrementan en enfermedades autoinmunes o daño celular. El transporte de cobre en los conductos biliares es interrumpido por el colapso de los conductos biliares interlobulares y por tanto el cobre se acumula en el hígado, así es probable que la actividad de la ceruloplasmina sérica aumenta para metabolizar los acúmulos de cobre en el hígado⁵⁶.

Sin embargo, los niveles de ceruloplasmina en suero no son significativos para el diagnóstico de padecimientos autoinmunes, pero si en el grado de cicatrización del hígado cuando este se ve dañado por factores físicos, químicos (fármacos) o biológicos⁵⁷.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas de salud más común en el mundo, son las enfermedades inflamatorias, por lo cual varios medicamentos fueron desarrollados para tratar estos desórdenes como es el caso del grupo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); donde se buscó disminuir y/o eliminar los efectos graves de la inflamación¹⁹. Pero los AINEs traen consigo efectos secundarios como es el caso de la indometacina, el cual su consumo provoca lesiones gástricas y problemas en un grupo de órganos^{19, 20}. Por tales motivos se ha tenido la necesidad de proponer nuevos antiinflamatorios de origen natural.

En la actualidad el uso de plantas medicinales se ha incrementado para el tratamiento de enfermedades²¹. Gran parte de la medicina tradicional mexicana es el resultado de los conocimientos empíricos de nuestros antepasados, un claro ejemplo es la planta Barreta (*Helietta parvifolia*).

La *Helietta parvifolia* (Barreta) empíricamente, se ha utilizado en el tratamiento de las heridas en caballos, como antiinflamatorio; además de usarse en forma de polvo para proteger semillas del ataque de hongos. Actualmente se tiene conocimiento, por un estudio reciente, el cual confirma que la actividad biológica de la *Helietta parvifolia* (Barreta) va encaminada a un efecto antiinflamatorio²⁷.

Pero también es de interés saber qué efecto puede presentar en las células que participan en el proceso inflamatorio sin padecer una inflamación. Por lo tanto en este estudio lo que se pretende es determinar si la *Helietta parvifolia* afecta a la actividad de las células fagocíticas (PMN) para reducir el nitro azul de tetrazolium (NBT), así también, observar si hay aumento o disminución de los radicales libres. De ahí la necesidad de este estudio para justificar su empleo como antiinflamatorio.

5. OBJETIVOS

Objetivos generales

Evaluar el daño en las células fagocíticas de rata, al administrar los extractos de barreta comparándolos contra indometacina, mediante las determinaciones de reducción de NBT, rosetas Fc, nitritos, peroxidación lipídica y ceruloplasmina.

Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad fagocítica mediante la reducción de NBT en placa y reducción de NBT espectrofotométricamente de PMN y MA peritoneales en las ratas.
2. Determinar en plasma nitritos como un indicador de óxido nítrico, por el método Griess, determinará la concentración de MDA (peroxidación lipídica) mediante el método de TBA y se determinará concentración de ceruloplasmina.
3. Evaluar la adherencia, mediada por Fc de IgG anti-glóbulos rojos de carnero (hemolisina de conejo) y se observará por la formación de rosetas Fc.
4. Realizar conteo total y diferencial de leucocitos.

5. HIPÓTESIS

Con la administración oral del extracto acuoso de Barreta (*Helietta parvifolia*), los animales presentarán una disminución en la reducción del NBT, nitritos y peroxidación lipídica en relación a la administración oral de solución salina.

7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Prospectivo, observacional, transversal.

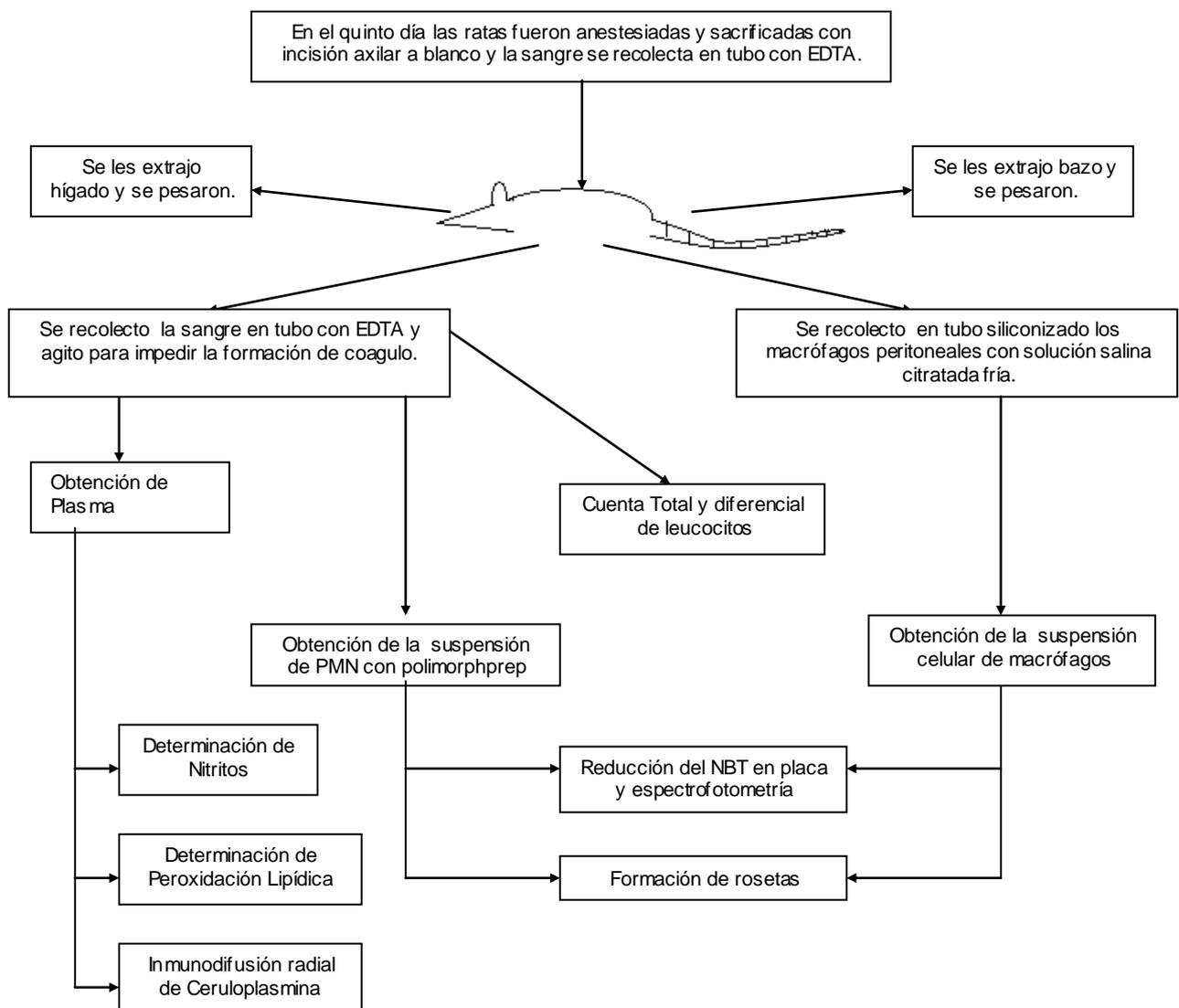
Población: Ratas Wistar con peso promedio de 300-400g divididas en cuatro grupos de ocho ratas cada uno.

Criterios de inclusión: Ratas machos de 3 meses de la cepa Wistar, sanas y dentro del rango de peso.

Criterios de exclusión: Ratas hembras de las cepas Wistar, ratas que no se encuentren entre la edad requerida y que presenten algún padecimiento.

Criterios de eliminación: Ratas que en el proceso de la investigación adquieran un padecimiento o en su caso la muerte.

DIAGRAMA DE FLUJO



9. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVO

Reactivos

Nombre	Proveedor
Acido acético	Merck
Ácido clorhídrico	Merck
Aceite de inmersión	Sigma
Acido Ortofosfórico	
Agarosa	Bioxon
Agua destilada	Theissier
Alcohol	Bioxon
Albúmina sérica bovina	JT. Baker
Azul de Commassie	
Bicarbonato de sodio	JT. Baker
Borato de sodio	JT. Baker
Butiril-hidroxitolueno (BHT)	Monterrey S.A. de C.V.
Cadmio metálico	Técnica química S.A.
Cianuro de potasio	JT. Baker
Citrato de sodio	Merck
Cloruro de amonio	JT. Baker
Cloruro de calcio	Sigma
Cloruro de sodio	JT. Baker
Cocktail inhibidor de proteasas	Sigma chemical company p-2714
EDTA	Sigma
Etanol	JT. Baker
Fenol	JT. Baker
Fosfato de potasio	Merck
Fosfato de sodio	JT. Baker
Glucosa	Merck
Hidróxido de sodio	Merck
Indometacina	Kener
NBT	Sigma
n-butanol	JT. Baker
Nitrito de sodio	JT. Baker
N-(1-naftil)-etilendiaminodiclorhidratado (NED)	Merck
Piridina	Baker
Polimorphprep	Nycomed
Safranina	S.S.A
Sigmacote	Sigma chemical company.
Solución salina fisiológica	Baxter
Sulfanilamida	Merck
Sulfato de cobre	Técnica clínica
Sulfato de magnesio	Merck
Sulfato de zinc	HYCEL de México
TBA (ácido tiobarbiturico)	Sintetizado en el laboratorio de orgánica por el M en C Rodolfo Carreón Sánchez.FES Zaragoza UNAM.
1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMP)	Aldrich
Zymosan A	Sigma

MATERIAL BIOLÓGICO

- Suero de rata.
- Suero de conejo anti-ceruloplasmina de rata.
- Hemolisina.
- Glóbulos rojos de carnero.
- Ratas machos (300-290g) cepa Wistar.
- Marcador de peso molecular (MPM).

SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard
Marca: Invitrogen
Catalogo No. LC5925
Contenido: 500µL de SeeBlue Plus2 Pre- Stained Estándar
Buffer de corrimiento: Tris-HCL, Formamida, SDS, Rojo de Fenol
Consiste de 10 bandas de proteínas preteñidas, 8 azules y 2 de colores de contraste, en el rango de 4-250 kDa.

- La *Helietta parvifolia* (Barreta) se colectó en el mes de junio de 2007, en la comunidad de “El Tanque”, Xicoténcatl, Tamaulipas. *Una muestra de la planta fue depositada en el herbario IMSSM, al cual se le asignó el número de registro 15235 y fue autenticada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario. Los extractos utilizados fueron obtenidos y proporcionados por el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez en el L-312 de la FES-Zaragoza, UNAM.

*Abreviatura reconocida por la Asociación Internacional de Taxonomía Vegetal.

EQUIPO

Nombre	Marca
Agitador de placas	Bellco Glass Inc
Agitador vortex genie	Scientific Industries Inc
Agitador rocker platform	Bellco Glass
Balanza analítica	Mettler H33AR
Balanza granataria	Ohaus
Baño metabólico	Precision
Caja Petri	Kimax
Campana de extracción	
Canula oral	
Centrífuga	Solbat

EQUIPO (continuación)	
Centrífuga clínica	Hamilton Bell
Congelador (-4°C)	Revco
Espectrofotómetro Spectronic 20	Bausch & Lomb
Incubadora	Riossa EC
Microcentrífuga	Hermle 2233M-2
Microscopio	Zeiss
Micropipeta de 5-40 µL	Finnpipette-Labsystems
Micropipeta de 10-100 µL	Labpette-Labnet
Micropipeta de 100-1000 µL	BIOHIT Proline
Pipeta automática	Finnpipette, de 20-400 microlitros
Placa para inmunodifusion	Falcon
Refrigerador	Philips 127 volts-VA

10. MÉTODO

10.1. Preparación de la población de estudio

Para iniciar el experimento fue necesario que las ratas estén en ayuno por 18 horas.

Grupo de ratas	Solución a administrar vía oral. A concentración.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Testigo (-)	0.5 ml de solución salina	▲	▲	▲	▲	†
Testigo (+)	Indometacina 5.0 mg / Kg.	▲	▲	▲	▲	†
Extracto acuoso de corteza	Extracto 60 mg / Kg.	▲	▲	▲	▲	†
Extracto acuoso de hoja (a reflujo)	Extracto 60 mg / Kg.	▲	▲	▲	▲	†

Tabla 1. Dosificación para los cuatro grupos de ratas.

▲: Administración de misma dosis por día y misma hora.

†: Se sacrificaron a las ratas, esto se llevo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

En el quinto día las ratas se pesaron, se anestesiaron y sacrificaron con incisión axilar a blanco y la sangre se recolecto en tubo con EDTA.

Se recolectaron los macrófagos peritoneales con solución salina citratada fría, cada muestra en tubos siliconizados.

Se tomó sangre con anticoagulante EDTA (0.1mg por mL de sangre) para obtener PMN.

Se recolectaron 4 tubos con 6 mL de sangre sin anticoagulante para la obtención de suero.

Se extrajeron los bazo e hígados de cada rata y se pesaron, para observar si presentan disminución o en su caso aumento en sus pesos con relación al testigo negativo.

10.2. OBTENCIÓN DE SUSPENSIÓN CELULAR DE POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Procedimiento

1. Se obtuvo 8 mL de sangre por rata y se colocó en un tubo con EDTA. De cada muestra se tomaron 5 mL para el siguiente paso.
2. Se estratificó la sangre sobre 2.5 mL de polimorphprep en un tubo de 13 x 100 mm y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min.
3. Se obtuvo con una pipeta Pasteur el anillo de polimorfonucleares y se colocó cada una de las 29 muestras en un tubo siliconizado, ajustando la suspensión celular, en solución de krebs-Henseleit.
4. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se decantó y se le adicionó 0.5 mL de solución de Krebs-Henseleit.

10.3. OPSONIZACIÓN DEL ZYMOAN A

Procedimiento

1. Se pesaron 70 mg de zymosan A y se resuspendieron en 10 mL de agua destilada, y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min., (se realizó dos veces el lavado).
2. Se resuspendió el sedimento con 7 mL de suero fresco de rata y se incubó a 37° C durante 20 min.
3. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. el sedimento se resuspendió en 5 mL de solución de krebs-Henseleit, una vez más centrifugamos a 3000 rpm por 5 min.
4. Se tiró el sobrenadante y el botón se resuspendió con 7 mL de solución de krebs-Henseleit, y se mantuvo en frío hasta que se utilizó.

10.4. OBTENCIÓN DE SUSPENSIÓN CELULAR DE MACROFAGOS (MA)

Procedimiento

1. Una vez sacrificada la rata, se le inyectaron 5 mL de solución salina citratada fría vía intraperitoneal.
2. Se agitó veinte veces a la rata, sujetándola de la base de la cola y del cuello.
3. Se realizó un corte en el esternón de la rata y se extrajo la solución con macrófagos con la ayuda de una pipeta pasteur y se colocó en un tubo siliconizado y se ajustó con solución de krebs-Henseleit.
4. Cada muestra se centrifugó a 3000 rpm por 5 min., se hicieron dos lavados, se decanto el sobrenadante, y al botón se le adicionó 0.5 mL de solución de Krebs-Henseleit, se mantuvo en baño de hielo, para proceder a realizar las siguientes pruebas.
 - 1) Reducción del NBT espectrofotométrica.
 - 2) Reducción del NBT en Placa.
 - 3) Rosetas Fc.

10.5. REDUCCIÓN DE NITRO AZUL DE TETRAZOLIUM (NBT) ESPECTROFOTOMÉTRICA

Procedimiento

1. Se prepararon dos tubos de ensaye de 13 X 100mm siliconizados (solución siliconizada), uno para fagocitosis y otro en reposo, para cada muestra tanto de PMN como de macrófagos (MA).
2. Se realizaron para cada muestra suspensión celular de PMN y MA los pasos siguientes de la tabla 2.

Reactivos	Tubos siliconizados	
	F (Fagocitosis)	R (Reposo)
NBT 1 %.	0.4 mL	0.4 mL
KCN 0.01M.	0.1 mL	0.1 mL
Sol. Krebs-Henseleit.	0.35 mL	0.4 mL
Zymosan A opsonizado.	0.05 mL	-----
Suspensión Celular de PMN y MA.	0.1 mL	0.1 mL
3. Se coloco en baño metabólico a 37 ° C, durante 20 min.		
4. Se detuvo la reacción con HCl a 2.5N.	2 mL	2 mL

Tabla 2. Procedimiento para el método de reducción de NBT.

5. Se sacaron los tubos del baño y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min., se decantaron y se resuspendieron.
6. Se le adicionó 2 mL de piridina a cada tubo y se leyó la absorbancia al espectrofotómetro a 515 nm, utilizando un blanco de piridina pura.

Tubos en F1 R1 R2 F2



Imagen 1. Foto de reducción de NBT por espectrofotometría de PMN (F1, R1) Y MA (F2, R2) peritoneales. Tubos en reposo y fagocitando.

10.6. REDUCCIÓN DE NITRO AZUL DE TETRAZOLIUM (NBT) EN PLACA

Procedimiento

1. Se prepararon dos portas objetos por muestra de PMN y MA con papel parafilm. Al papel se le hizo un orificio de 5 mm; se colocó el papel ya con las perforaciones sobre la placa y se adhirió a presión.
2. Se colocó en los círculos del portaobjeto 0.01 mL NBT más 0.01 mL de zymosan A opsonizado y 0.01 mL de suspensión celular de PMN (repetir este mismo proceso para la suspensión de MA).
3. Se colocaron las placas en cámara húmeda, la cual se selló y se colocó en la incubadora a 37°C por 20 min.
4. Transcurrido el tiempo, se tomaron las placas y se lavaron con PBS tibio de forma suave.
5. Se tiñeron las placas con colorante de safranina por 10 min., transcurrido ese tiempo se lavaron con agua destilada y se dejaron secar.
6. Las placas ya secas se observaron al microscopio a 100X con aceite de inmersión y se comenzó a contar las células hasta tener un total de doscientas células contadas.

7. Se sacó el porcentaje de reducción, de los PMN y MA, los que contengan manchas azules en su interior se consideraron positivos a la reducción, los PMN o MA que contengan levaduras rosas en su interior se consideraron negativos a la reducción.

Los porcentajes de reducción en placa se sacaron con las siguientes fórmulas:

$$\%R \text{ PMN} = \left(\frac{\text{PMN con levaduras reducidas}}{\text{Total de PMN contados}} \right) 100$$

$$\%R \text{ MA} = \left(\frac{\text{MA con levaduras reducidas}}{\text{Total de MA contados}} \right) 100$$

10.7. FORMACIÓN DE ROSETAS Fc

Procedimiento

Se realizó la técnica de rosetas Fc, para la evaluación de la adherencia.

1. Se colocaron en los tubos siliconizados de 12 X 75mm un volumen de 0.25 mL de una suspensión de eritrocitos de carnero ajustados al 1% en solución salina amortiguada.
2. Se les adicionaron 0.25 mL de la suspensión celular de PMN para un tubo y 0.25 mL de MA, (conseguido del paso 1 de la técnica de “obtención de suspensión celular” de PMN y del paso 3 de la técnica de “obtención de suspensión celular” de MA.)
3. Se incubaron a 37°C durante 20 minutos, y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto.
4. Se resuspendieron y se le colocó una gota entre porta y cubreobjeto, se leyeron las rosetas activas. Aquellas células que unan tres ó más eritrocitos sobre la superficie del fagocito se consideraron roseta.

El porcentaje de células (PMN ó MA) formadoras de rosetas (CFr) se saco con la siguiente formula.

$$\%CFr = \left(\frac{\text{Células formadores de rosetas}}{\text{Total de células}} \right) 100$$

10.8. DETERMINACIÓN DE CERULOPLASMINA POR INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Procedimiento

Preparación de las placas

1. Se pesó 0.3g de agarosa, en una balanza analítica.
2. Se colocaron en un matraz de 250 mL, se les agregó 30 mL.
3. Se colocó el matraz en una olla de presión de 21L a que alcanzara 125 °C para disolver la agarosa, se dejó enfriar y se agregó una pizca de azida de sodio.
4. Se colocaron 2 mL de agarosa con una pipeta graduada a 13 tubos de ensayo etiquetados.
5. Se colocaron en baño María a 45 °C durante 10 min.
6. A cada tubo se le agregó 200µL de suero de conejo anticeruloplasmina y se agitaron.
7. Cada uno de los tubos fue vaciado en un pozo de las placas de Falcon, evitando la presencia de burbujas.
8. Las placas se dejó reposar hasta alcanzar la solidificación.
9. Se realizaron 4 perforaciones de 3mm en cada contenedor con agarosa y se utilizaron el mismo día de su elaboración.

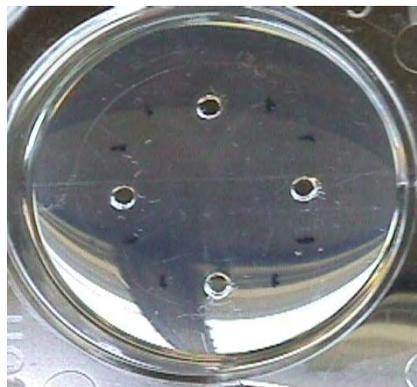


imagen 2. Foto que muestra un agar en el pozo de placa falcón con cuatro perforaciones de 3mm en el agar.

Procesamiento de la muestra

1. Se colocaron 5 µL de cada muestra problema en el orificio de los pozos de las placas.
2. Estos fueron identificados de acuerdo a la numeración que le toco a cada muestra.
3. Se colocó 5 µL el estándar de Ceruloplasmina de rata.
4. Las placas se refrigeraron durante 48 horas.

5. A las 48 horas se midió el halo de inhibición con una regla milimétrica.
6. Se colocaron las placas a dializar con solución salina por 24 horas.
7. Se colocaron a dializar las mismas placas en agua destilada por 24 horas.
8. Se tiñeron los agares de la placa falcón con la adición de colorante Azul de Commassie por 1 hora.
9. Transcurrido el tiempo, se procedió a desteñir las muestras con ácido acético al 5% con tres cambios a de este mismo decolorante por 2 días.
10. Ya desteñidos (véase imagen 3 en anexo) se procedió a medir nuevamente los diámetros de los halos con una regla milimétrica y consecutivamente se midieron los diámetros de los halos del estándar y se realizaron los cálculos.
11. Se utilizó el valor de referencia: 21.2 mg de Cp de rata /dL. Para 55 μ L (véase imagen 12 en anexo de imágenes, la inmunodifusión radial para estándar de ceruloplasmina de rata) de muestra correspondió a 1.06 mg de Cp de rata / dL.

Nota: Véase Anexo 1 obtención y cuantificación y purificación de Cp de rata así como el suero de conejo anti-Cp.

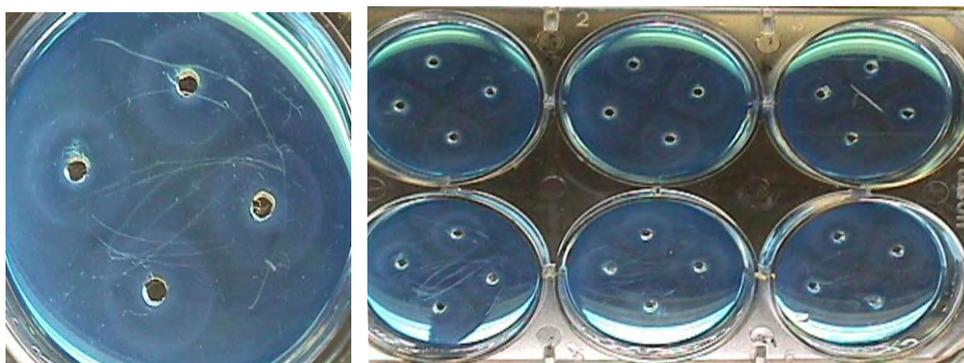


Imagen 3. Foto de los agares ya teñidos de la determinación de ceruloplasmina en rata por inmunodifusión radial ya teñidos con Azul de Commassie.

10.9. DETERMINACIÓN DE NITRITOS

Procedimiento

1. Se le adicionaron 300 μ L de agua destilada a 100 μ L de plasma (obteniendo una dilución 1:4), y se le agregaron 20 μ L de la solución de $ZnSO_4$, se agitaron (recordando que esta solución forma un precipitado de proteínas), por ello fue necesario centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.
2. A los tubos con el cadmio activado (véase anexo 1), se les tiro el NH_4Cl y se les adicio el sobrenadante de la centrifugación del paso 1.

3. Se taparon con parafilm y se colocaron en una plancha de agitación horizontal por 15 min.
4. Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 5 min., y se tomaron 200 μL del sobrenadante para el ensayo de la muestra siguiendo el paso de la tabla 3.
5. Se construyó la curva de calibración con el patrón (Tabla 3 y Grafica 3 en anexo).
6. Se determinó la concentración de nitritos en suero de ratas para los cuatro tratamientos y se reportaron los resultados con la utilización de la curva patrón de nitrito de sodio.

Tubo	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestras	200 del sobrenadante	700
Se adicionaron 50 μL de sulfanilamida. Incubar 10 min. (Temperatura ambiente)		
Se adicionaron 50 μL del reactivo de NED, se mezclaron e incubaron 30 min. (Temperatura ambiente)		
Se Leyeron a 540 nm.		

Tabla 3. Curva patrón. Concentración del estándar 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Nitrito de sodio y procesamiento de la muestra.

10.10. DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (MDA). MÉTODO DE TBA (ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)

Procedimiento

I. Procesamiento de muestras.

1. Se colectaron 100 μL de la muestra de plasma (de cada rata) en tubo Eppendorf, y se le agregaron 10 μL de BHT 2mM.
2. Se diluyó el plasma 1:5 con PBS (100 μL de plasma en 400 μL de PBS).
3. Se tomaron 400 μL de plasma con 50 μL de BHT 12.6mM y 400 μL de ácido ortofosfórico 0.2M.
4. Se mezclaron en Vortex por 10 seg., y se le adicionaron 50 μL de TBA 0.11M/L y se mezclaron de nuevo con Vortex.

II. Producción de color.

1. Se colocó la mezcla de reacción en un baño de agua a 90 °C por 15 min., los tubos se taparon con papel aluminio.
2. Se enfriaron en hielo, se agregaron 1000 µL de n-butanol y 100 µL de NaCl solución saturada y se agitaron vigorosamente por 30 seg.
3. Se centrifugó a 5000 rpm / 1 min., y se transfirió 500 µL de la fase de butanol a una celda.
4. Se realizó la lectura a 535 nm y a 572 nm, para con ello corregir la absorción.
5. Se realizó la curva estándar de MDA (Tabla 4 y Grafica 4, ver anexo), para posteriormente sacar las concentraciones de MDA y así reportar la peroxidación lipídica en suero de ratas para los cuatro tratamientos y así analizar los resultados.

Tubos	MDA (µmol/L)	TMP (µl)	H ₃ PO ₄ (µl)	TBA (µl)	Agua (µl)	Absorbancia
B	0	0	600	200	200	0
1	0.2	5	600	200	195	0.281
2	0.4	10	600	200	190	0.457
3	0.8	20	600	200	180	0.827
4	1.2	30	600	200	170	0.928
5	2.0	50	600	200	150	1.285
6	2.8	70	600	200	130	1.489
7	4.0	100	600	200	100	1.523

Tabla 4. Curva patrón. Concentración del estándar de peroxidación lipídica.

11. RESULTADOS

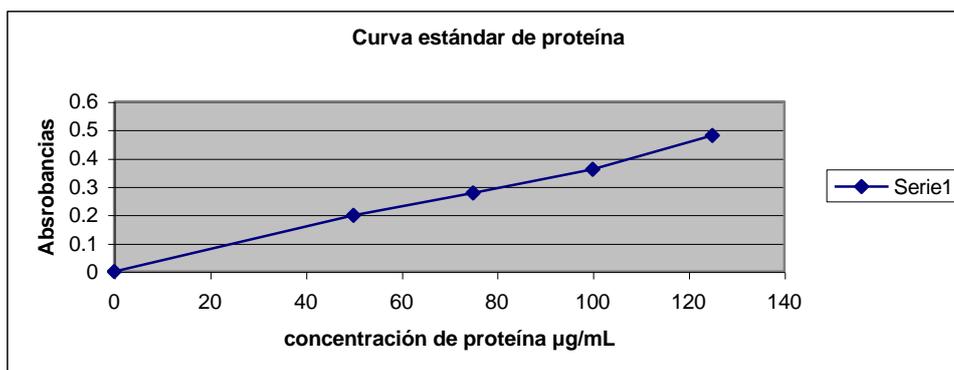
Curva patrón de proteína por el método de Lowry

Se determinó la concentración de ceruloplasmina por el método de Lowry. Estándar de proteínas 250µg/mL (BSA proteína albúmina).

Tubo	Concentración de proteína (µg/mL)	Volumen de estándar µL	Agua	Absorbancia a 600nm
B	0	0	1000	0
1	25	100	900	0.039
2	50	200	800	0.099
3	75	300	700	0.161
4	100	400	600	0.208
5	125	500	500	0.279
6	150	600	400	0.255
7	175	700	300	0.335
8	200	800	200	0.369
9	225	900	100	0.445
10	250	1000	0	0.445

r=0.998

Tabla 5. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry.



Gráfica 5. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry.

La muestra de ceruloplasmina obtenido dio lo siguiente:

Dilución	Absorbancia	Concentración de la Ceruloplasmina de rata
1:10	0.033	21.2 mg/dL

Identificación de Ceruloplasmina de rata por su peso molecular

Se realizó el corrimiento electroforético de la muestra de la ceruloplasmina de rata a la concentración obtenida y el marcador de peso molecular, de la siguiente manera:

Carril	Cantidad (μL)	Muestra
1	15	MPM
3	15	Ceruloplasmina

Estas son las cantidades usadas para la identificación de la Ceruloplasmina.

El gel se tiñó con Azul de Comassie y se observaron las siguientes bandas del carril 1 correspondientes al la muestra del marcador de peso molecular:

Nota: A la imagen se le cambio el color con Microsoft Office Picture Manager.

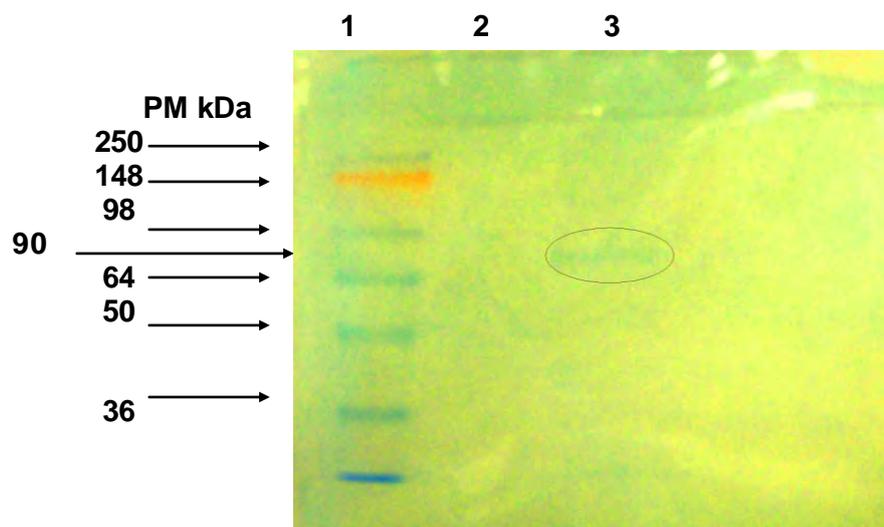


Imagen 4. Electroforesis. Identificación de al ceruloplasmina de rata.

Se observó que la banda de la Ceruloplasmina de rata del carril 3, se encuentra por encima de la banda de los 64 kDa, correspondiendo aproximadamente a peso molecular de 90 kDa, la cual es ceruloplasmina de rata degradada como se aprecia en la imagen 4.

Inmunoelectroforesis

Se realizó la inmunoelectroforesis para la confirmación de que se obtuvo el suero de conejo anticерuloplasmina de rata, después de un proceso de obtención y purificación, se utilizó esta técnica para la confirmación de que el anticuerpo este puro, como se ve en la imagen 5 y 6.



Imagen 5. Inmunoelectroforesis, en la cual se aprecia el precipitado de ceruloplasmina en el canal 1 con suero de conejo anti-Cp, y en el canal 2 se aprecia el precipitado al colocar anti-suero de rata.

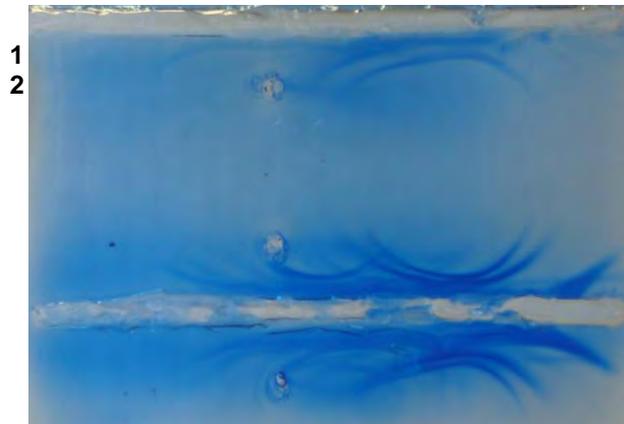


Imagen 6. Fotografía de la placa teñida con Azul de Comassie en los cuales se parecía con mas facilidad las bandas de ceruloplasmina 1 y 2 en la región α .

En el carril la ceruloplasmina se observa en dos bandas anchas (imagen 7), la número 2 corresponde a Ceruloplasmina de peso molecular 148 000 Daltons y la número 1 es la de menor peso molecular 125 000 Daltons, esto esta comprobado con un ensayo de electroforesis en suero humano para la determinación de la ceruloplasmina y se encontró como resultado lo ya mencionado.

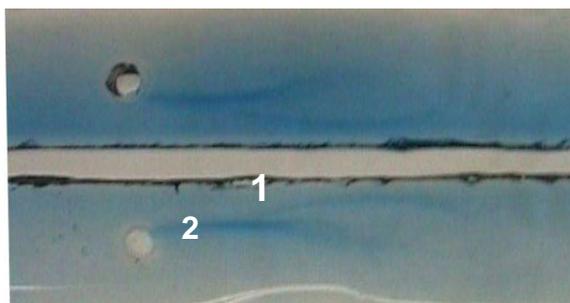


Imagen 7. Se aprecia la ceruloplasmina pura utilizando al anti-Cp y en los orificios se aplico la ceruloplasmina de rata pura y se observan las dos bandas.

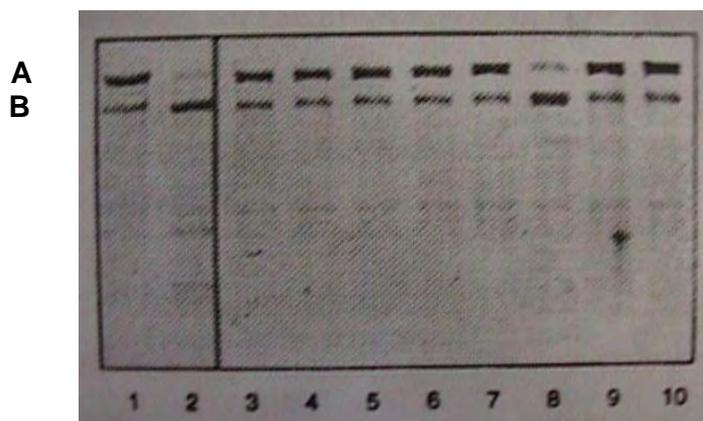


Imagen 8, Se aprecia dos bandas de ceruloplasmina en una electroforesis, con la cual se obtiene que hay ceruloplasmina 1 y ceruloplasmina 2.

Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de ceruloplasmina de rata (imagen 4). Los carriles marcan de izquierda a derecha, Marcador de PM y ceruloplasmina respectivamente que aparece en dos bandas corresponden a que en suero humano hay dos tipos de ceruloplasmina 1 y 2⁵⁸.

La ceruloplasmina no es homogénea; 80% de total corresponde a la fracción A con peso molecular de 148 000; la fracción D (PM 125 000) corresponde al 20 % restante (imagen 8) y se divide en tres subfracciones cuando menos, con PM menor de 100 000 Dalton. Parte de esta heterogeneidad (Imagen 4) puede deberse a una tendencia a formar polímeros⁵⁸.

Para el valor estándar de la ceruloplasmina fue un valor de referencia: 21.2 mg de Cp de rata /dL. Para 55 µL (véase imagen 12 en anexo de imágenes, la inmunodifusión radial para estándar de ceruloplasmina) de muestra correspondió a 1.06 mg de Cp de rata / dL. Que al medir los halos tuvieron un diámetro promedio de 0.42 y con estos dos valores se saca la concentración de ceruloplasmina para los distintos sueros.

11.1. Resultados del Análisis estadístico de las diferentes determinaciones

Se aplicó el programa estadístico SPSS-10 para Windows 10.0.

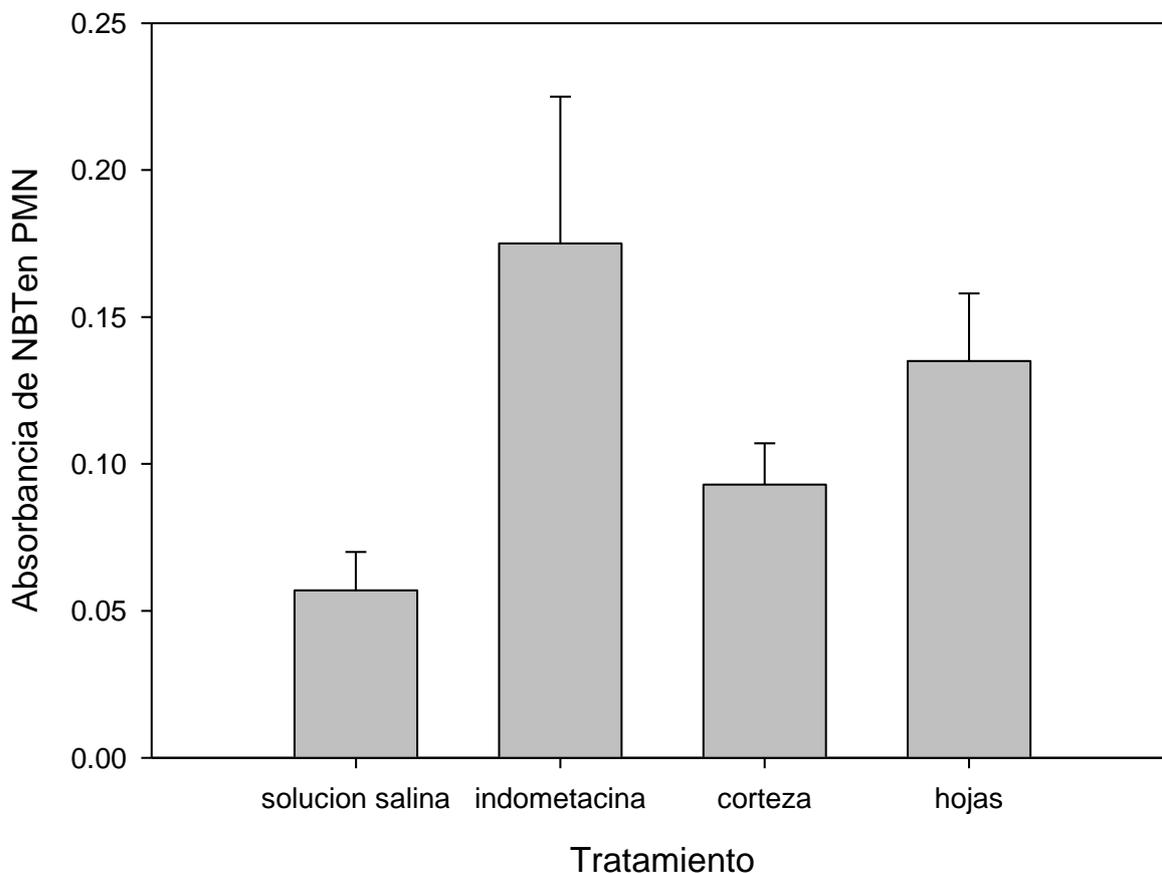
Comparación de medias entre los diversos parámetros determinados y tratamientos.

Prueba de diferencias significativas honesta (HSD) de Tukey para los parámetros determinados vs. tratamiento, con una $\alpha=0.05$.

Reducción de NBT en PMN

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	0.057875	0.0130390
Indometacina*	0.175667	0.0539220
Corteza	0.093500	0.0147660
Hojas	0.135286	0.0235025
Total	0.110759	0.0151513

Tabla 4. Comparación de medias de las absorbancia con respecto al tratamiento. Indometacina vs. solución salina *P=0.029.

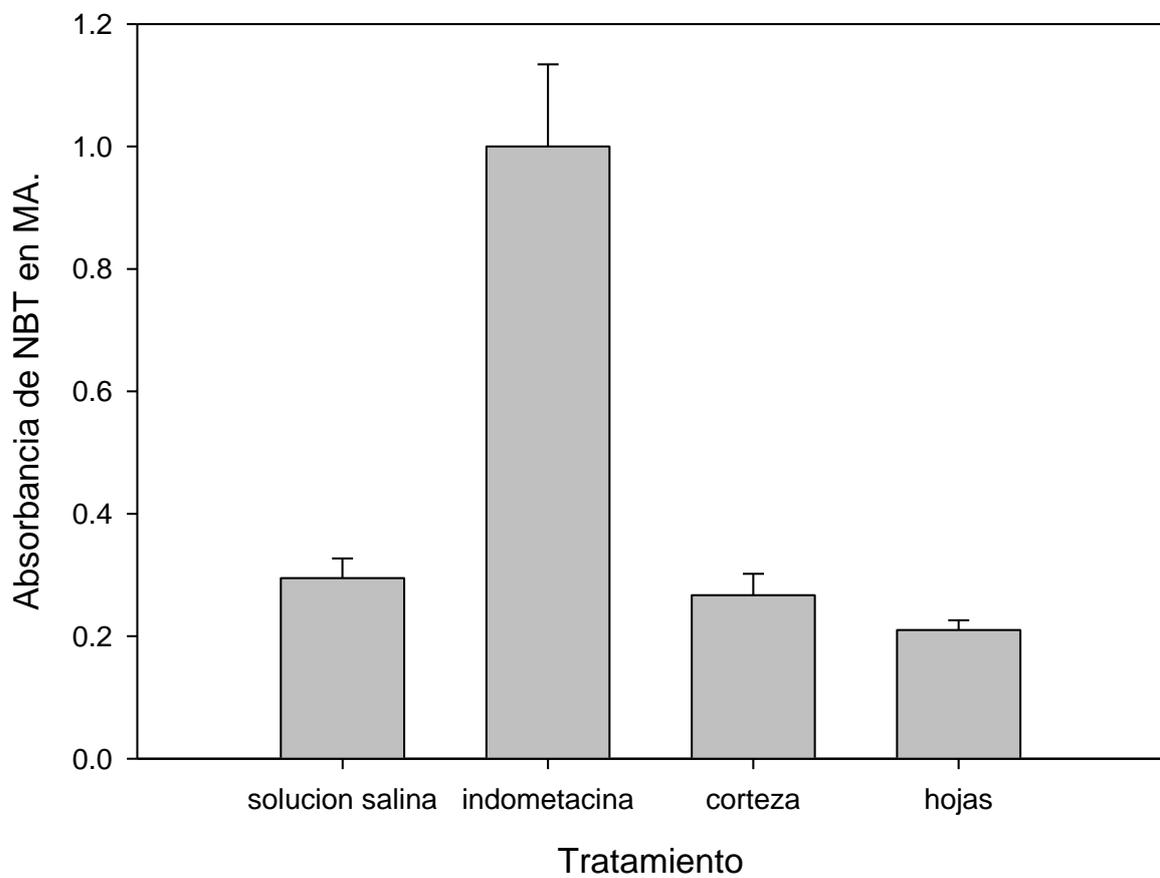


Gráfica 4. Comparación de las medias con su error estándar.

Reducción de NBT en Macrófagos

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	0.295625	0.0322590
Indometacina*	1.002000	0.1346432
Corteza	0.267375	0.0355085
Hojas	0.210857	0.0168854
Total	0.392500	0.0607729

Tabla 5. Comparación de medias de las absorbancia con respecto al tratamiento. Indometacina vs. solución salina, Corteza y Hoja *P= 0.000.

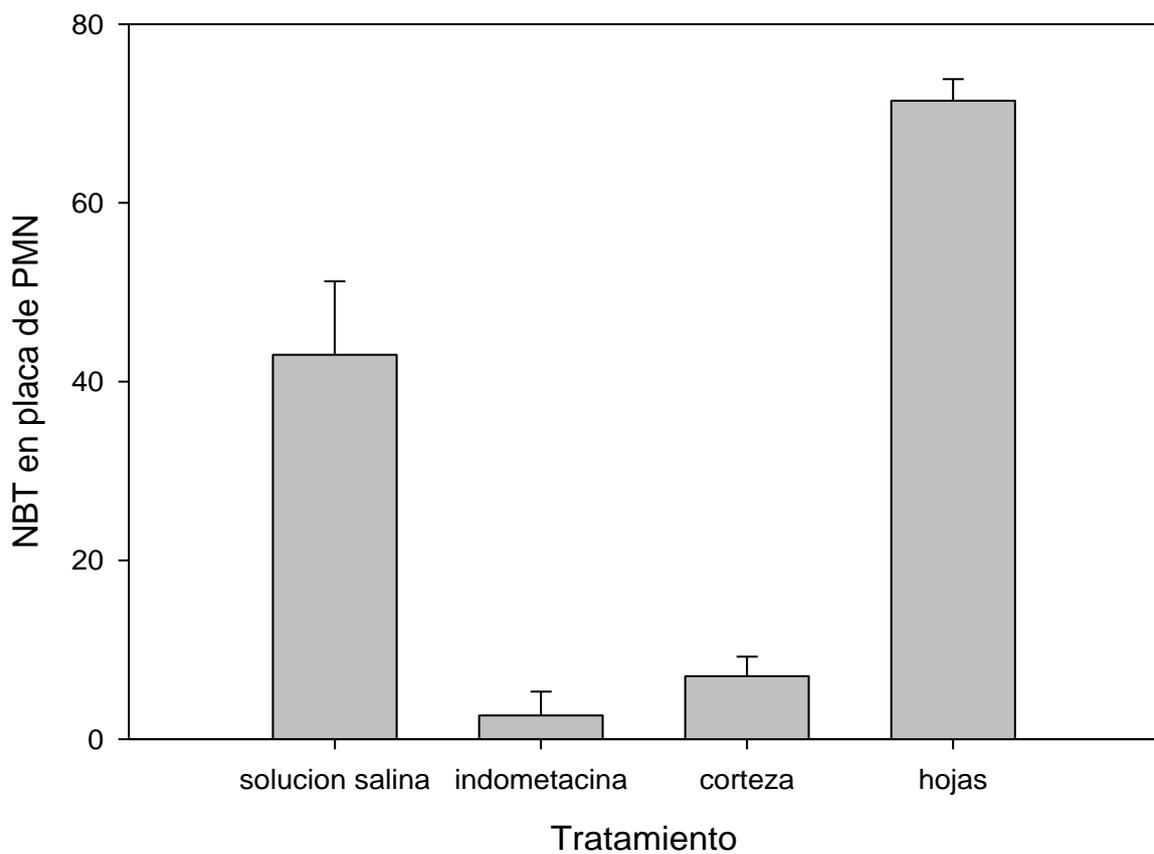


Gráfica 5. Comparación de las medias con su error estándar.

Reducción de NBT en placa de PMN

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina*	43.000	8.2318
Indometacina	2.667	2.6667
Corteza	7.025	2.1955
Hojas	71.429	2.4286
Total	31.186	5.8010

Tabla 6. Comparación de medias de la reducción de NBT en placa de PMN con respecto al tratamiento. solución salina vs. Indometacina y Corteza *P= 0.000, solución salina vs. Hojas *P=0.001.

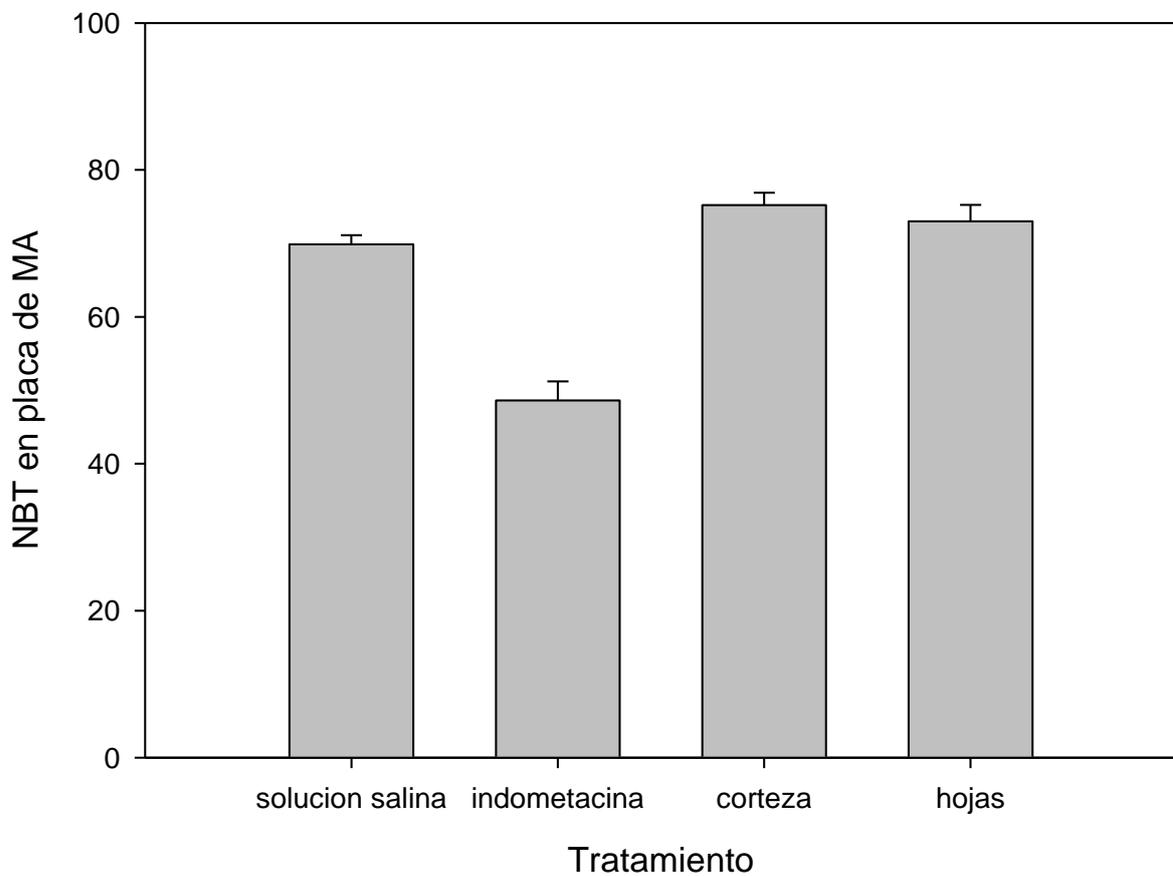


Grafica 6. Comparación de medias de la reducción de NBT en placa de PMN con respecto al tratamiento.

Reducción de NBT en Macrófagos

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	69.875	1.2455
Indometacina*	48.620	2.6028
Corteza	75.214	1.6968
Hojas	73.017	2.2227
Total	67.950	2.1169

Tabla 7. Comparación de medias de la reducción de NBT en placa de Macrófagos con respecto al tratamiento. Indometacina vs. solución salina, Corteza y Hojas *P=0.000.

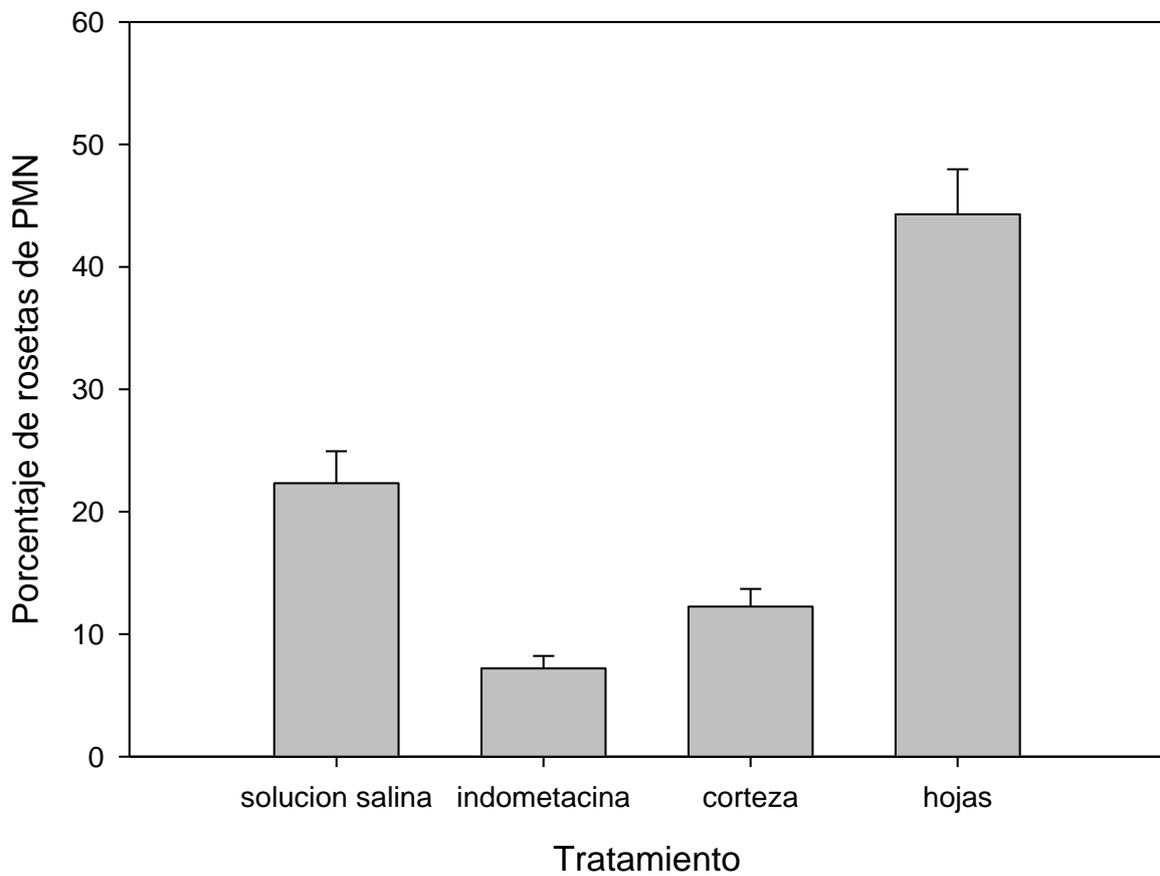


Grafica 7. Comparación de medias de la reducción de NBT en placa de Macrófagos con respecto al tratamiento.

Porcentaje de formación de rosetas con PMN

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina*	22.333	2.6034
Indometacina	7.200	1.0198
Corteza	12.250	1.4361
Hojas	44.286	3.6886
Total	22.231	3.0990

8. Comparación de medias del porcentaje de formación de rosetas en PMN con respecto al tratamiento. solución salina vs. Indometacina *P=0.004, solución salina vs. Corteza *P=0.038 y solución salina vs. Hoja *P=0.000.

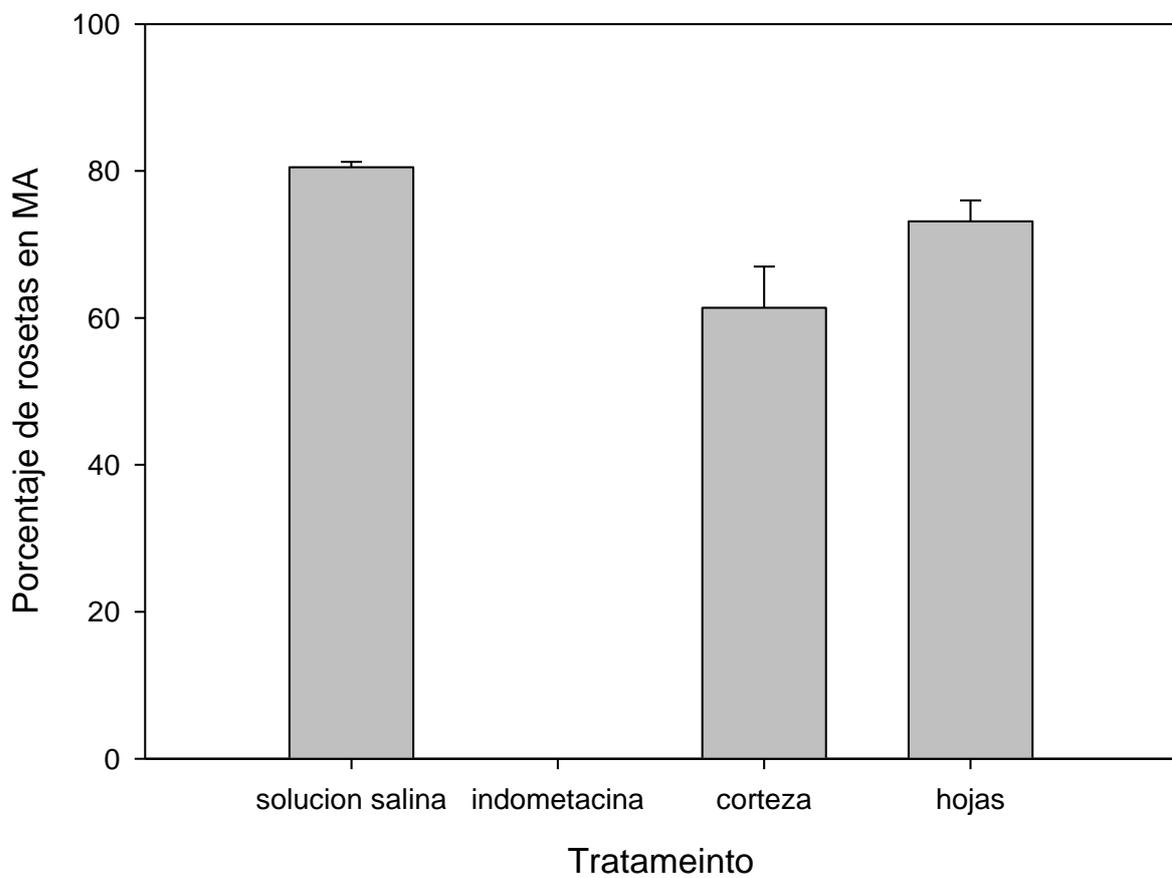


Grafica 8. Comparación de medias del porcentaje de formación de rosetas en PMN con respecto al tratamiento.

Porcentaje de formación de rosetas con Macrófagos

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	80.500	0.7319
Indometacina*	0.000	0.0000
Corteza	61.375	5.6155
Hojas	73.143	2.8571
Total	56.793	5.8750

Tabla 9. Comparación de medias del porcentaje de formación de rosetas en Macrófagos con respecto al tratamiento. Indometacina vs. solución salina, Corteza y Hojas *P=0.000.

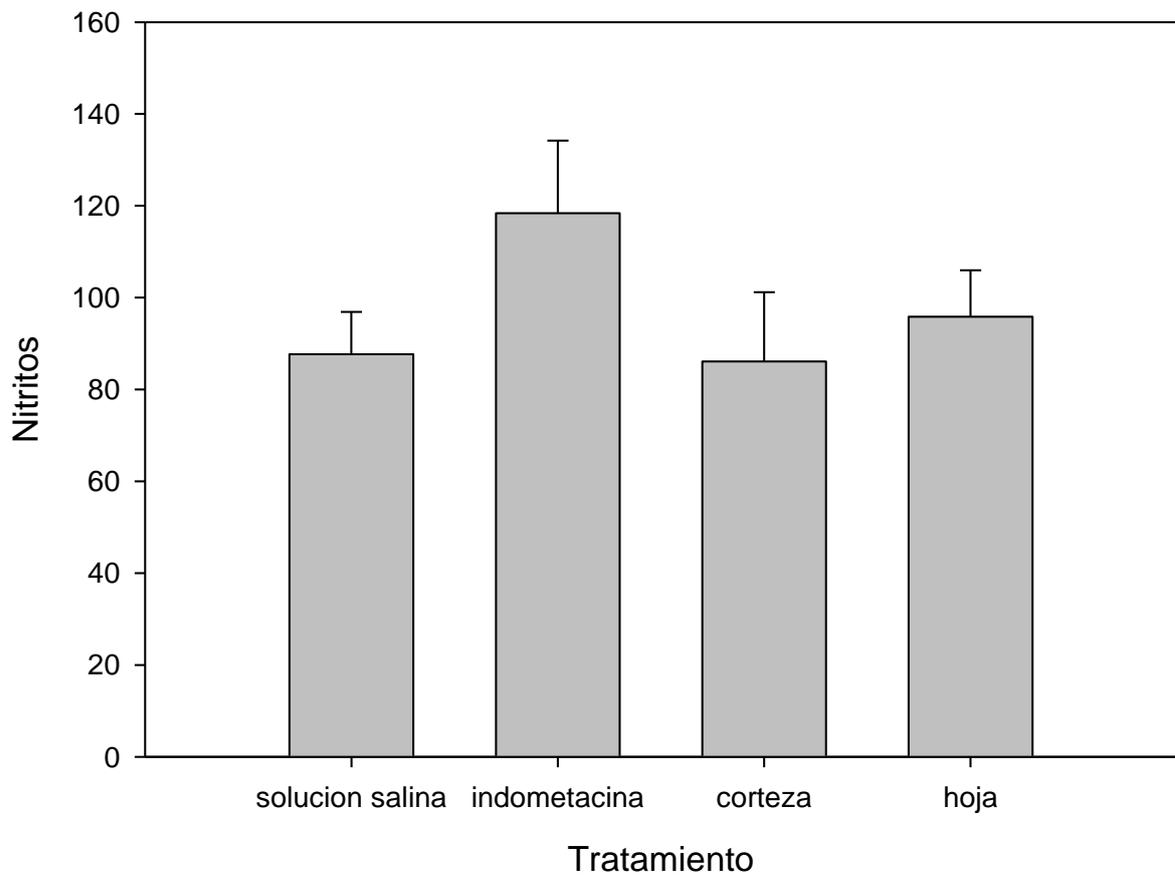


Gráfica 9. Comparación de medias del porcentaje de formación de rosetas en Macrófagos con respecto al tratamiento.

Nitritos

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	87.669125	9.2372328
Indometacina	118.32717	15.840805
Corteza	86.090875	15.112089
Hojas	95.847857	10.100625
Total	95.550966	6.4428389

Tabla 10. Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento.

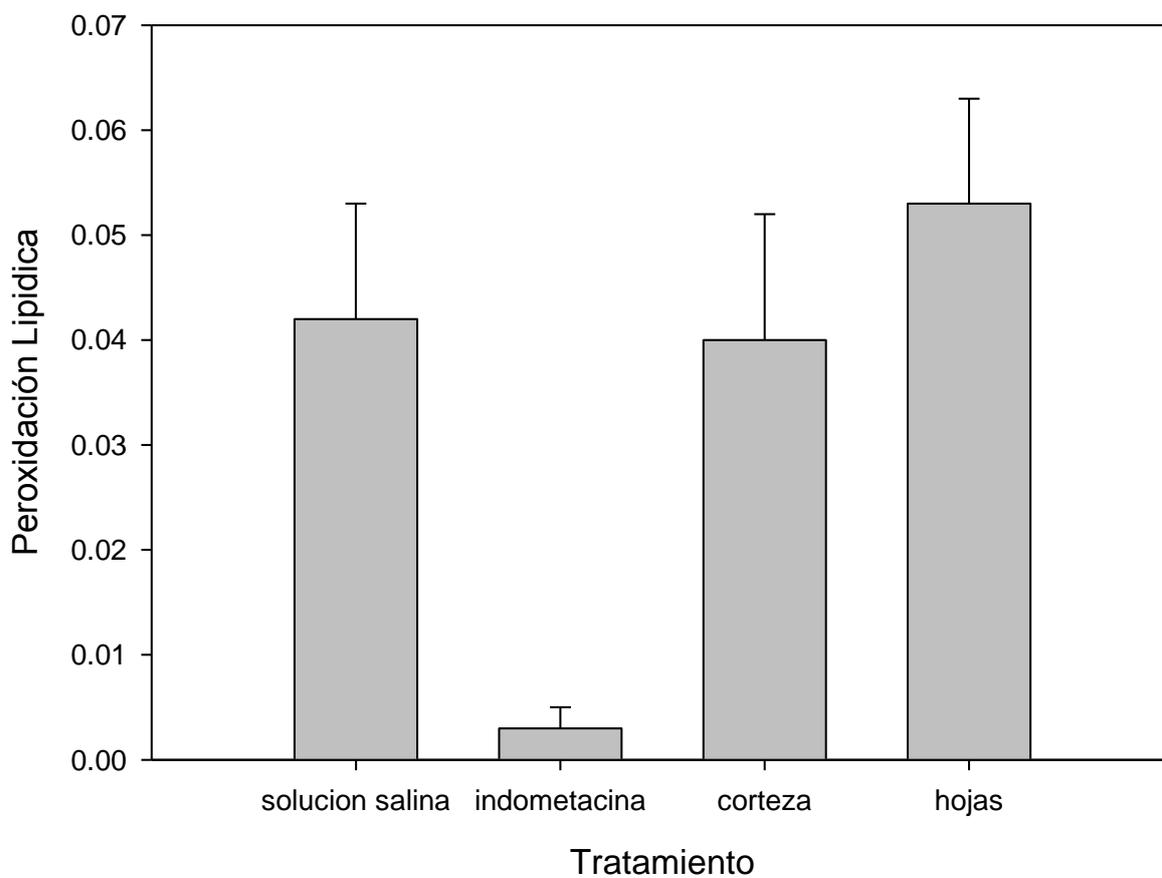


Gráfica 10. Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento.

Peroxidación Lipídica

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	0.42500	0.0114097
Indometacina	0.003417	0.0028930
Corteza	0.040963	0.0125727
Hojas	0.053114	0.0104020
Total	0.036552	0.0060666

Tabla 11. Comparación de medias de la peroxidación lipídica con respecto al tratamiento.

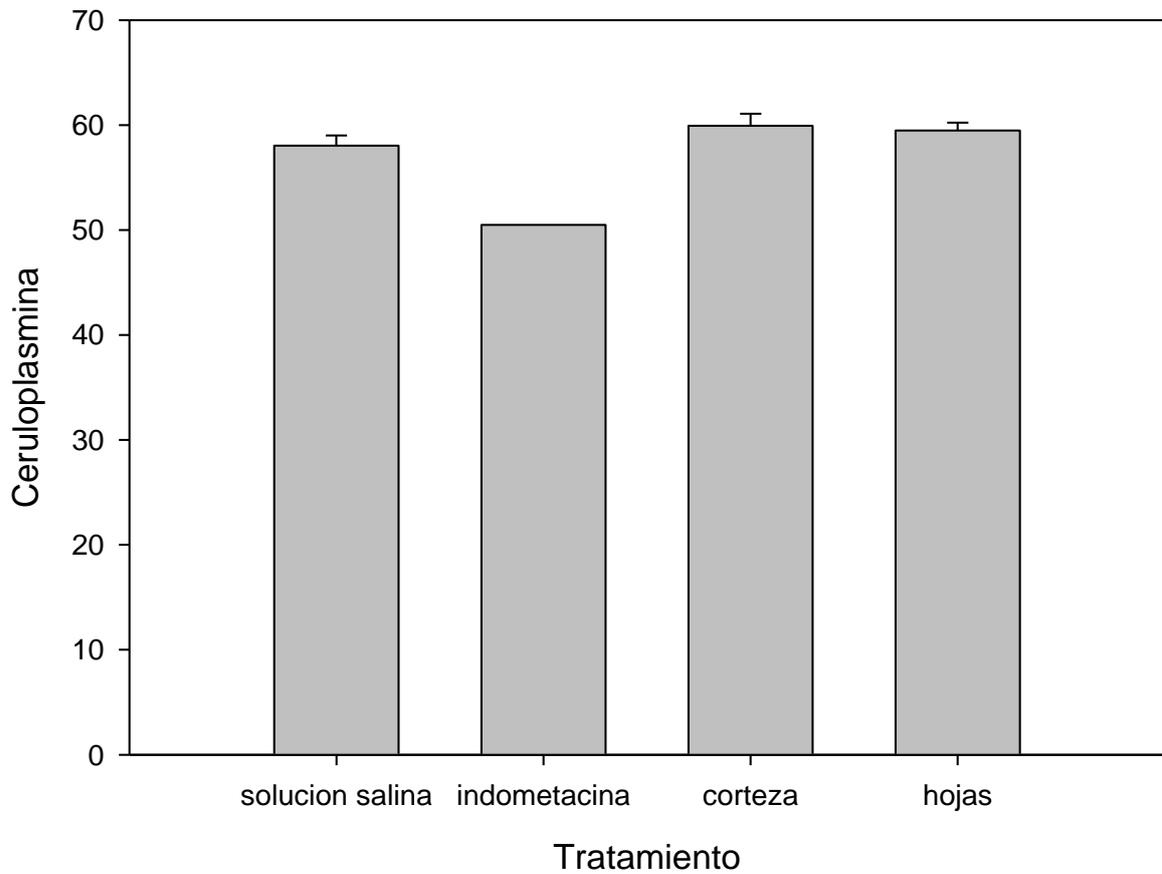


Gráfica 11. Comparación de medias de la peroxidación lipídica con respecto al tratamiento.

Ceruloplasmina

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	58.0450	.95436
Indometacina*	50.4800	0.0000
Corteza	59.9388	1.14424
Hojas	59.4886	0.75066
Total	57.3507	0.80076

Tabla 12. Comparación de medias de la concentración de ceruloplasmina con respecto al tratamiento. Indometacina vs. solución salina, Corteza y Hojas *P=0.000.

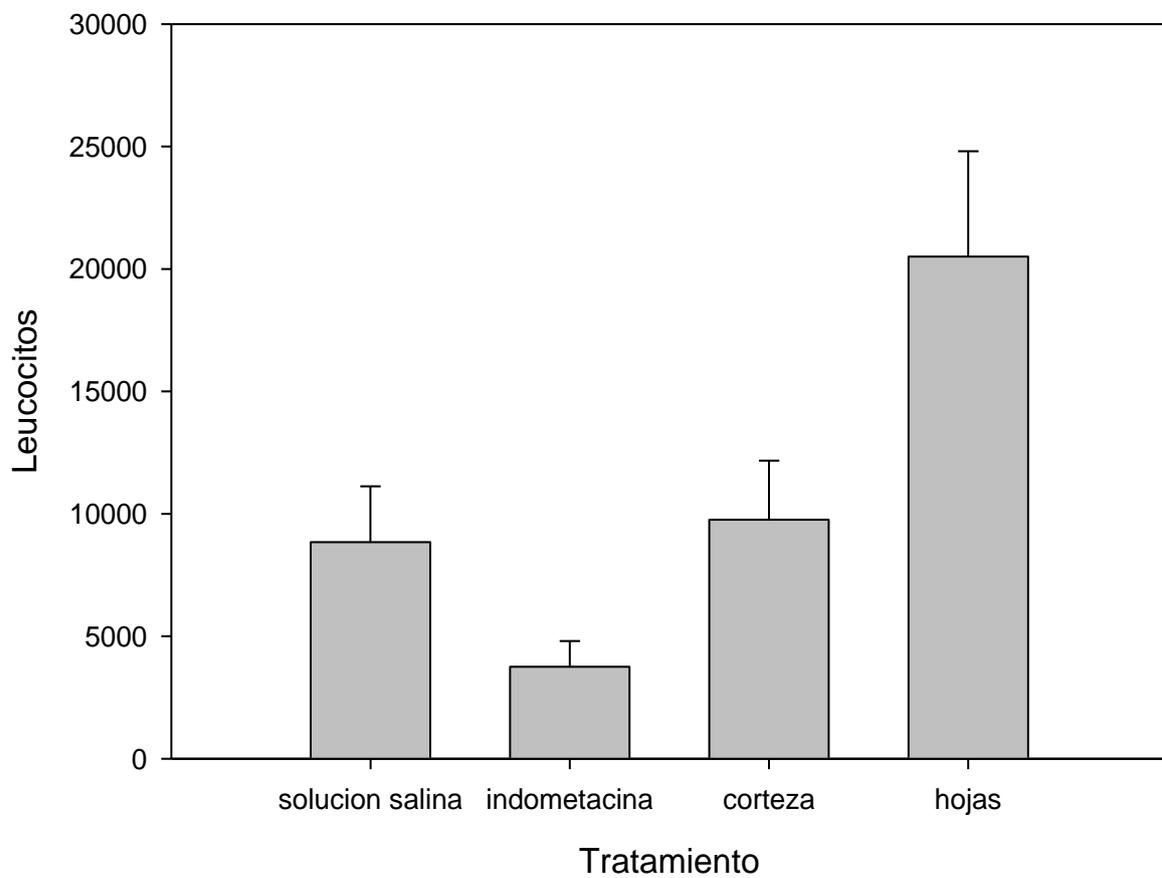


Gráfica 12. Comparación de medias de la concentración de ceruloplasmina con respecto al tratamiento.

Cuenta total de leucocitos

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	8842.86	2277.881
Indometacina	3758.33	1047.809
Corteza	9762.50	2412.704
Hojas*	20507.14	4299.065
Total	10932.14	1761.259

Tabla 13. Comparación de medias de la cuenta de leucocitos con respecto al tratamiento. Hojas vs. solución salina *P=0.036, Hojas vs. Indometacina *P=0.003 y Hojas vs. Corteza *P= 0.049.

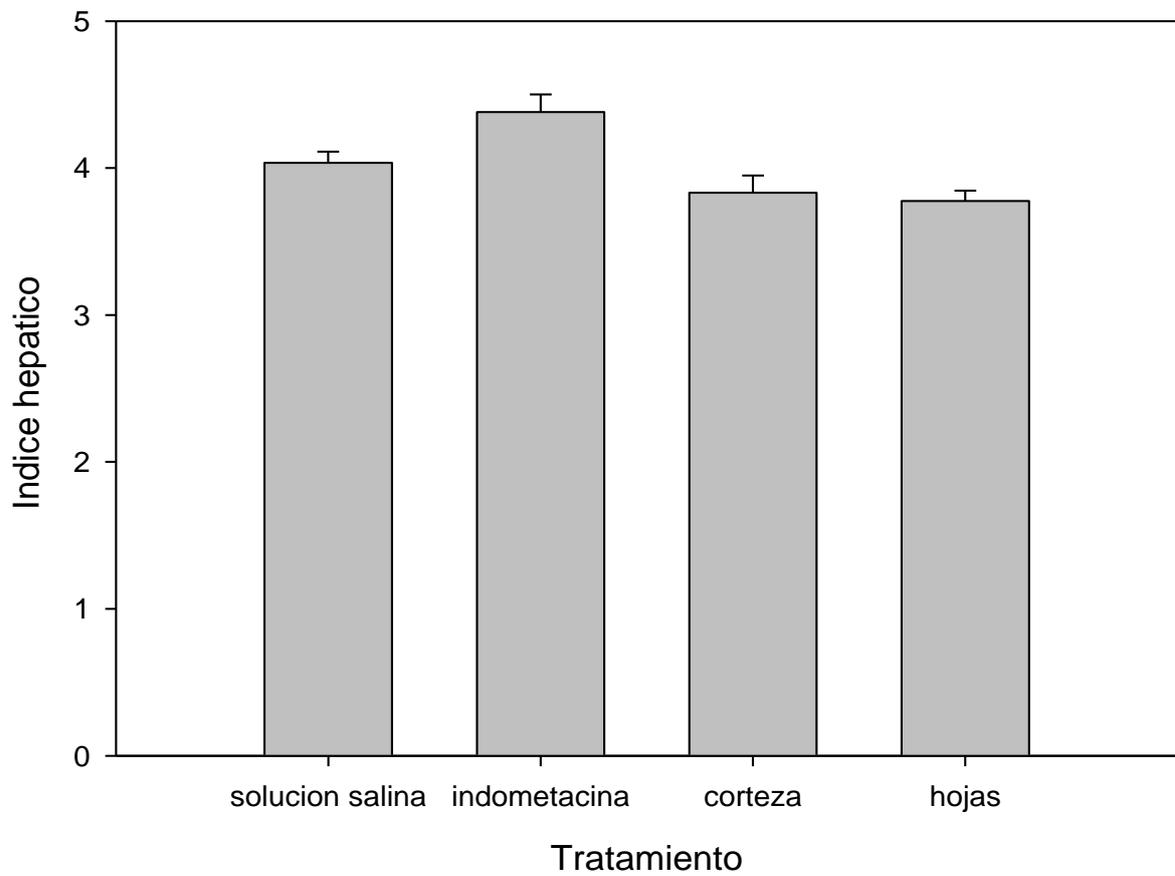


Gráfica 13. Comparación de medias de la cuenta de leucocitos con respecto al tratamiento.

Índice hepático

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	4.0352	0.07631
Indometacina	4.3811	0.12040
Corteza	3.8324	0.11851
Hojas	3.7768	0.07141
Total	3.9884	0.06290

Tabla 14. Comparación de medias del índice hepático con respecto al tratamiento.

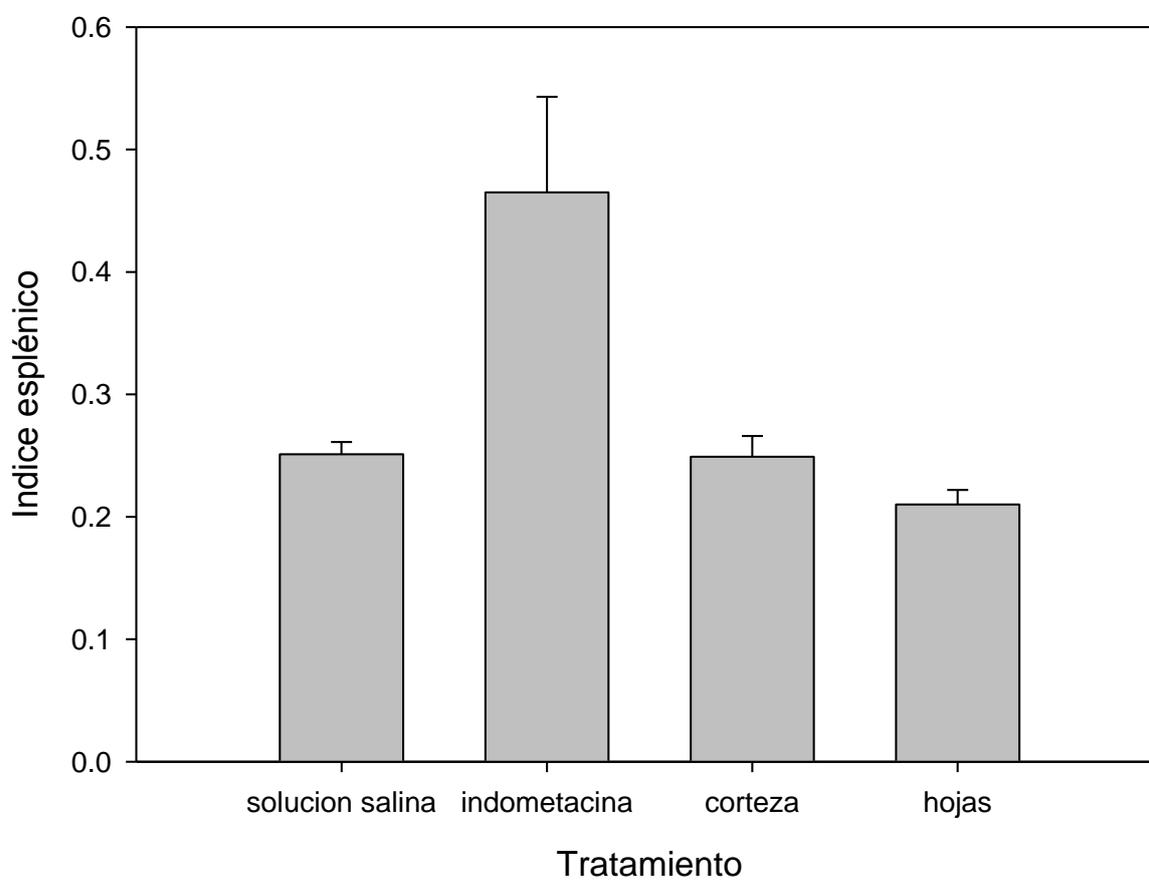


Gráfica 14. Comparación de medias del índice hepático con respecto al tratamiento.

Índice esplénico

Tratamiento	Medias	Error estándar
Solución salina	0.2512	0.01028
Indometacina	0.4659	0.07841
Corteza	0.2495	0.01732
Hojas	0.2109	0.01256
Total	0.2854	0.02400

Tabla 15. Comparación de medias del índice esplénico con respecto al tratamiento.



Gráfica 15. Comparación de medias del índice esplénico con respecto al tratamiento.

12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó el análisis comparativo de medias para cada determinación en los cuatro grupos de tratamiento que correspondieron a: Solución salina (ss), Indometacina, corteza de Barreta y hoja de Barreta, con esto también se obtuvo las diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para las siguientes:

En la determinación de reducción de NBT espectrofotométricamente (cuantitativo) de los PMN y Macrófagos, se encontró que la indometacina presentó efecto, en el cual se observó una mayor reducción de NBT $P=0.029$ hay mayor liberación de aniones superóxido, mientras que la indometacina inhibe el edema inducido en la pata por carragenina, en PMN y MA al estimularlo con zymosan opsonizado y aumenta la producción de aniones superóxido⁵⁹. En la determinación de reducción de NBT en placa (cualitativo) la indometacina, al igual que los extractos corteza y hojas tuvieron un efecto al disminuir la liberación de aniones superóxido, esto debido a que en el ensayo cuantitativo se usa KCN para inhibir cadena respiratoria y se registro sólo la vía de la hexosa-6-monofosfato, mientras que el ensayo cualitativo registra formación de formazan sin importar la vía, es decir es inespecífico^{1, 2}.

En la formación de rosetas EA que nos mide los receptores para Fc de inmunoglobulinas, en PMN se encontró que la indometacina y corteza presentaron una disminución en la formación de rosetas y en Macrófagos se observó que hay efecto sólo de la Indometacina al disminuir la formación de rosetas esto se puede deber a que los PMN muestran su arsenal de lisosomas siempre, mientras que los macrófagos sólo cuando están activados y el efecto de la indometacina es mayor que los extractos probados por lo que sólo se observan efectos con éste fármaco. También se está probado que los antiinflamatorios AINEs inhiben la capacidad de adherencia de las células PMN neutrófilos^{24, 25}.

En la determinación de concentración de nitritos en suero, se observó que no se presentó efecto significativo bajo ningún tratamiento; sin embargo esta reportado que la administración de indometacina produce un aumento en la concentración de nitritos, esto debido a que los antiinflamatorios AINEs estimulan la liberación de óxido nítrico y sus derivados así como también metabolitos citotóxicos^{19, 20, 26}.

En la determinación de peroxidación lipídica, no presentó efecto significativo, en ninguno de los tratamientos.

En la determinación de Ceruloplasmina, se observó que la indometacina disminuye la concentración de ceruloplasmina comparada con la solución salina, y los extractos de corteza y hojas. Esto se puede deber a que la ceruloplasmina se sintetiza en hígado, es una proteína de fase aguda que se eleva en procesos inflamatorios y la indometacina tiene un efecto antiinflamatorio y una actividad antioxidante⁶⁰, es catalogada como antiinflamatorio de fase aguda^{61, 62, 63} y tiene un papel activo en la regulación de la homeostasis del cobre y del hierro⁵⁶.

En la cuenta total de leucocitos se observó que ocurre una leucocitosis en extracto de hojas, mientras que la indometacina redujo la cantidad de leucocitos. Debido a que los antiinflamatorios permiten que las células epiteliales den la salida de estos fagocitos para cuando hay una inflamación estos comienzan a liberarse del torrente circulatorio, para ir al sitio de acción y entonces comenzar todo el proceso de la inflamación por lo cual se ve afectado la disminución de esto por tal es normal, ya que la indometacina es un derivado del indol, reduce la migración de neutrófilos y disminuye proliferación de linfocitos^{20, 26}.

En la determinación de índice hepático e índice esplénico presentaron aumento en el peso de los órganos, esto no por efecto del fármaco, esto se debió a que al administrar la dosis, la ratas perdieron un peso⁶³ promedio de 40g, presentaron diarrea y disminución de actividad física por lo cual se vio aumentado el índice esplénico.

13. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran claramente que el extracto de Corteza de Barreta en el método cualitativo y cuantitativo para PMN y MA presentó disminución en la reducción de NBT. En nitritos, peroxidación lipídica y ceruloplasmina no se presentó efecto. Por lo cual se confirma su efecto antiinflamatorio sobre las células que participan en la inflamación.

En el extracto de Hojas de Barreta no presentó efecto en la reducción de NBT ni en radicales libres.

Se necesitan estudios adicionales para determinar el compuesto activo en el extracto de Corteza de Barreta (*Helietta parvifolia*) y el mecanismo exacto a través del cual la producción de aniones superóxido es modulado.

14. ANEXO I

14.1 Obtención y purificación de Ceruloplasmina así como la obtención de suero de conejo anti-ceruloplasmina.

Tratamiento especial merecen los datos sobre ceruloplasmina, ya que en este caso particular se obtuvieron resultados adicionales en relación al método de análisis y sobre todo en la obtención de suero de conejo anti-ceruloplasmina en rata, ya que no se tenía el anticuerpo para rata; la técnica empleada para su determinación no tiene antecedentes en la literatura. La técnica establecida está basada en el método de inmunodifusión radial que facilita el análisis de esta proteína. La técnica es de bajo costo y de fácil ejecución.

Descripción de la técnica

El establecimiento de esta técnica tuvo por objetivo determinar ceruloplasmina (Cp) de rata.

El desarrollo de la técnica se basó en el método de inmunodifusión radial, por lo que fue necesario elaborar un anticuerpo para ceruloplasmina humana en conejo ya que este es considerado un modelo adecuado para tal fin⁶⁴.

A continuación se describe puntualmente el material y método empleado para el desarrollo de esta técnica.

Material y equipo

QAE A-50 Sephadex, (Sigma Chemical Company)

400 mL de plasma fresco humano certificado

Columna para tamices moleculares 54X 1X 100cm, (Sigma Chemical Company)

Soluciones de fosfato de potasio (0.1M, 0.2M, 0.3M y 0.5M), (Monterrey S.A.)

Sulfato de amonio al 30%, (Baker)

Espectrofotómetro, (Jenway 6305)

Centrífuga (Hamilton Bell V6500 BIOHAZARD)

Centrífuga (IEC B-20^a DAMON)

Membrana de diálisis PM 12 000-14 000. (Spectra)

Refrigerador (Whirlpool)

Tubos (Eppendorf)

Congelador (Revco)

Cronómetro (Timex)

Placa de agitación (Bellco Glass, Inc)

Tubos de ensaye (Kimax)

1 matraz Erlenmeyer de 250 mL (Kimax)

Procedimiento

Obtención de ceruloplasmina de rata.

1. Se colocaron 400 mL de plasma de rata y 200mL de QAE A-50 Sepadex en un recipiente limpio con agitación suave durante 4 horas a 4 °C.
2. Después del transcurso de este tiempo se colocó en una columna (véase imagen 9) y se eluyó con 0.1M de fosfato de potasio.

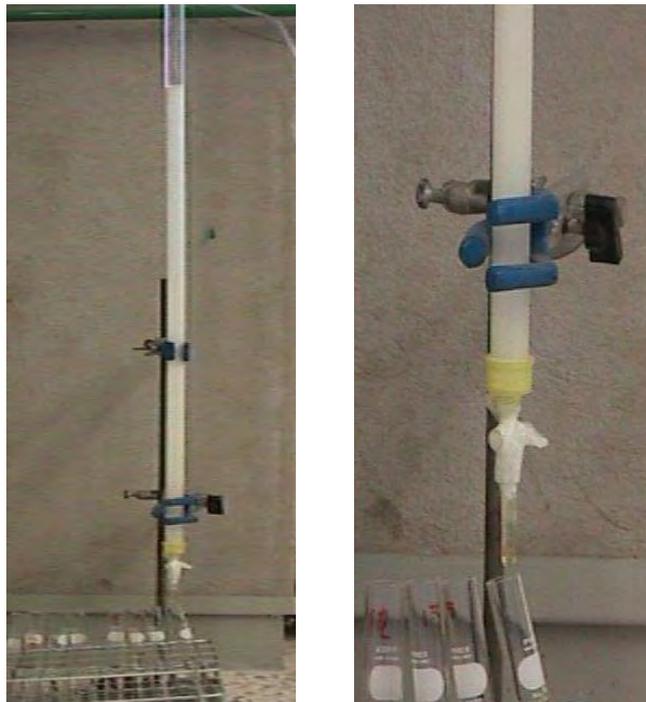


Imagen 9. Fotografía de la columna con Sephadex utilizada para la obtención de ceruloplasmina.

3. Se recolectó el eluido (cada 10mL) en tubos de ensaye limpio y seco, el contenido de estos tubos se leyó en espectrofotómetro a 280 nm.
4. Se detuvo la elusión hasta que ya no se presentó lectura en los tubos.

5. Posteriormente se eluyó con fosfato de potasio 0.2M de igual manera que el anterior.
6. Al término de esto se prosiguió con fosfato de potasio 0.3M, en el cual se recolectó la ceruloplasmina que salió en un tono azulado (Imagen 10) con un volumen de 11.6 mL. Se aprecia diferente a los otros tubos que serian mas claros, esto se hizo repitiendo el paso 3 y 4.

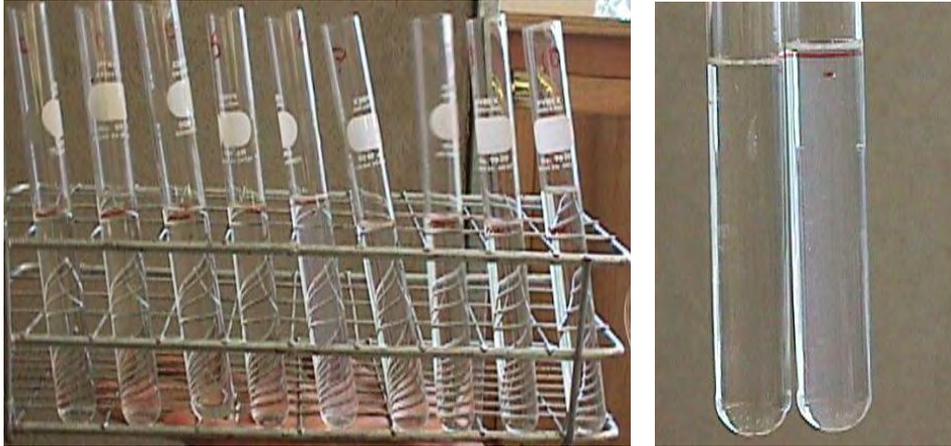


Imagen 10. Fotografía de la gradilla donde se recolectó el eluyente con el buffer de fosfato al 0.3M, en donde se aprecia que en el tubo 5 aparece la ceruloplasmina en un tono azulado.

7. Los tubos con volúmenes que presentaron mayor lectura (véase imagen 11) en el espectrofotómetro, se recolectaron en un vaso de precipitado de 250 mL y se precipitaron con sulfato de amonio al 33%.
8. El precipitado se centrifugó a 10 000 G (en centrifuga IEC B-20^a) durante 1 hora.
9. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 50% y se centrifugó de igual manera que el anterior.
10. Se resuspendió el precipitado con fosfato de potasio 0.05M y se colocó en la membrana de diálisis.
11. La membrana se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía buffer fosfato de potasio 0.05M durante 48 horas en refrigeración, el buffer se cambió cada 24 horas.
12. La muestra se colocó en tubo Eppendorf, y se congeló hasta su utilización.

Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de ceruloplasmina de rata.

Soluciones

Solución A. Monómero de acrilamida.

Acrilamida	29 g
Bis- acrilamida	1 g

Se lleva a 100 mL con agua destilada, aforar hasta que la solución este a temperatura ambiente. Filtrar la solución después de aforar y guardar a 4°C, no más de 1 mes.

Solución B. Amortiguador del gel separador, pH= 8.8

Trizma base	36.3 g
Ácido clorhídrico (HCl) 1N	40 mL
EDTA 0.2M pH= 8.0	5.3 mL

Se ajusta el pH con HCl 5N. Se afora a 100 mL. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución C. Amortiguador del gel concentrador, pH= 6.8

Trizma base	5.98 g
Ácido clorhídrico 5N	6 mL
EDA 0.2M, pH=8.0	5.3 mL

Se ajusta el pH con HCl 5N. Se afora a 100 mL. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución D. SDS al 10% (dodecil-sulfato de sodio)

SDS	10 g
Agua desionizada	100 mL

Se filtra con papel filtro después de aforar, Guardar a temperatura ambiente.

Solución E. persulfato de amonio (PSA) al 10%

Persulfato de amonio	200 mg
Agua desionizada	2000 µL

Solución F. TEMED

TEMED	1000 µL
-------	---------

Solución G. Amortiguador de muestra 4X

Solución C	300 µL
Solución D	200 µL
Glicerol 100%	400 µL

2- α -mercaptoetanol	50 μ L
Azul de bromofenol	50 μ L
Mezclar los componentes, colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y almacenar a -20°C.	
Solución H. Amortiguador de desarrollo (Tris-HCl 0.025M, pH= 8.3, glicina 0.192M, SDS 0.1%)	
Tris-base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	10 mL
Agua destilada	1 L
Solución 1. Colorante azul de Comassie R-250val 1% (stock)	
Azul de Commassie	1.0 g
Agua destilada	100 mL
Colorante: azul de Commassie R-250 0.125% (MeOH 50%, ácido acético 10%)	
Azul de Commassie	62 mL de la solución stock
MeOH	250 mL
Acido acético	50 mL
Agua destilada	500 mL
Solución decolorante 1. (MeOH 50%, acido acético 10%)	
MeOH	500 mL
Acido acético	100 mL
Agua destilada	1000 mL
Solución decolorante 2. (MeOH 5%, acido acético 7%)	
MeOH	700 mL
Acido acético	500 mL
Agua destilada	10 L

Material

Vidrios de 12 X 11 Y 12 x10
 Separadores de teflón de 0.05 mm.
 Agarosa al 2%.
 Gel separador
 Agua bidestilada (Theissier)

Gel concentrador
Peine para electroforesis
Amortiguador 4x
Tubo Eppendorf 600 microlitros
Amortiguador de corrimiento
Marcador de peso molecular (Sigma Chemical Company)

Equipo

Baño maría
Centrifuga
Cámara de electroforesis miniprotean (Bio-Rad)
Secador de geles (Bio-Rad)

Procedimiento

I. Formación del gel separador.

1. Se unieron dos cristales de 12 X 11 y 12 X 10 cm y dos empacadores de teflón de 0.5 mm.
2. Se montó el soporte donde se formó el gel de poliacrilamida.
3. Se sellaron los extremos, parte inferior y lados, con agarosa al 2% cuidadosamente de no dejar espacios sin cubrir.
4. En un vaso de precipitado de 40 mL se mezclaron las siguientes cantidades para un gel al 10% :

Agua bidestilada	3.232 mL
Solución A	2.333 mL
Solución B	1.316 mL
Solución D	70 µL
Solución E	36 µL
Solución F	10 µL

5. Se mezcló perfectamente, cuidando que no haya formación de burbujas, se vació la mezcla al armazón de tal forma que quedó un espacio de 4cm aproximadamente sin cubrir en la parte superior, inmediatamente se agregó agua hasta el borde del cristal (cuando el gel polimerizó se observó dos fases, una del gel y otra del agua).
6. Una vez que el gel polimerizó se desalojó el agua, se lavó la superficie del gel con agua bidestilada y se dejó reposar unos minutos.

II. Formación del gel separador

1. En un vaso e precipitados de 40 mL se agregaron las siguientes cantidades para un gel al 10%.

Agua bidestilada	2.350 mL
Solución A	0.690 mL
Solución C	0.870 mL
Solución D	41.4 μ L
Solución E	41.4 μ L
Solución F	6 μ L

2. Se mezclaron evitando la formación de burbujas, se llenó el espacio restante en el armazón y se insertó el peine ciego cuidando de no generar burbujas bajo los dientes de este, se dejó reposar el gel unos 10 minutos.

III. Tratamiento de la Muestra.

1. Se combinaron 15 μ L de la muestra de ceruloplasmina, con 45 μ L amortiguador de muestra 4X (solución G), en un tubo Eppendorf.

2. Este tubo se colocó en un baño de agua hirviendo por 2 minutos y finalmente se centrifugó a 2000 rpm por 30 segundos.

IV. Corrido del Gel.

1. Se retiró el peine suavemente del gel ya polimerizado, se llenaron los pozos con agua y se drenaron invirtiendo el dispositivo, se repitió el lavado de 2 a 3 veces para evitar la formación de redes de gel en los pozos.

2. Se colocó el armazón en la cámara de electroforesis y se llenó la cámara interna y cada pozo con el amortiguador de corrimiento (solución H), se llenó el pozo mas grande con 15 μ L de la muestra y el otro pozo pequeño se dispuso para colocar 15 μ L del marcador de peso molecular (MPM).

3. Se llenó el compartimiento inferior de la cámara de electroforesis con el amortiguador de corrimiento (solución H), se conectó a la fuente de poder y se corrió a 80 volts de corriente constante hasta que llegó al gel separador, entonces se subió el

voltaje a 120 volts de corriente continua y se detuvo hasta que el colorante quedó unos 0.5 cm antes del límite inferior de los cristales.

V. Tinción, decoloración y secado.

1. Se desensambló el dispositivo y se sacó el gel con cuidado, este se colocó en la solución colorante Azul de Commassie (solución J) por 1 hora.
2. Pasado este tiempo se colocó en la solución decolorante 1, por 1 hora a agitación constante y posteriormente se transfirió a la solución decolorante 2 el tiempo conveniente hasta que se obtuvo la decoloración deseada.
3. Ya decolorado el gel se colocó entre 2 plásticos resistentes al calor y se llevó al secador de geles a 60° C por 1 hora y así se obtuvo la laminilla de la electroforesis (véase imagen 4).

Determinación de la concentración de ceruloplasmina de por el método de Lowry.

Reactivo 1

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)	5 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	1 g
Tartrato de sodio y Potasio ($\text{KNaC}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.067 g
Agua Bidestilada	250 mL

Reactivo 2.

Sulfato de cobre anhidro (CuSO_4)	0.024 g
Agua bidestilada	50 mL

Reactivo de Lowry.

Reactivo 1	50 mL
Reactivo 2	1 mL
Reactivo de Folin-Ciocalteu	
Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.5 mL
Patrón de albúmina	
Albúmina	25 mg
Agua destilada	100 mL

Procedimiento.

Curva patrón de proteína por el método de Lowry.

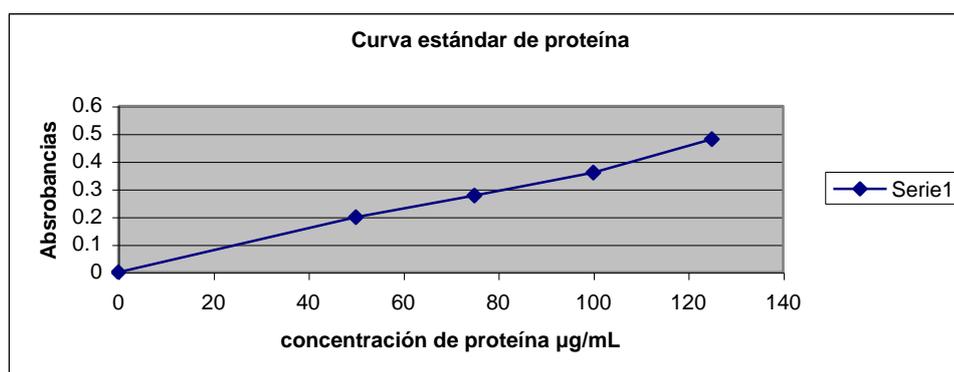
1. Curva patrón de albúmina:

Se determinó la concentración de ceruloplasmina de rata (obtenida en la técnica de obtención y purificación de ceruloplasmina) por el método de Lowry. Estándar de proteínas (BSA (proteína Albúmina), 250 μ g/mL).

Tubo	Concentración de proteína (μ g/mL)	Volumen de estándar μ L	Agua	Absorbancia a 600nm
B	0	0	1000	0
1	25	100	900	0.039
2	50	200	800	0.099
3	75	300	700	0.161
4	100	400	600	0.208
5	125	500	500	0.279
6	150	600	400	0.255
7	175	700	300	0.335
8	200	800	200	0.369
9	225	900	100	0.445
10	250	1000	0	0.445

$r=0.998$

Tabla 3. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry.



Grafica 3. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry.

2. Muestra:

Se hizo una dilución de la muestra 1:10 (obtenido en la técnica de obtención y purificación de ceruloplasmina), de tal forma que se obtuvo 1 mL de volumen final, se agregó a cada dilución, 3 mL de reactivo de Lowry. Se dejó reposar por 10 min. Pasado el periodo de tiempo, se agregó 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, y se dejó reposar por 30 min. Se leyó a 600 nm.

Se construyó la curva patrón (véase tabla 3, grafica 3) con las absorbancia y las concentraciones registradas de albúmina de suero de bovino (250 µg / mL). La concentración de ceruloplasmina se interpoló y se obtuvo la concentración siguiente:

Dilución	Absorbancia	Concentración de la Ceruloplasmina de rata
1:10	0.033	21.2 mg/dL

A esta ceruloplasmina se le administró un cocktail inhibidor de proteasas. Para evitar degradación del antígeno (Cp).

Inmunización del conejo (para obtener suero de conejo anticерuloplasmina)

Material

Conejo de 8 meses de edad y 2.5 Kg de peso

1 caja de madera

Torunda con alcohol

Jeringa estéril para insulina

Solución salina

Adyuvante completo de Freund

Vaso de precipitado de 100, 250 y 500 mL (Kimax)

Probeta graduada de 100 mL (Kimax)

Azida de sodio (Sigma)

Pipeta Pasteur

Bulbo para pipeta Pasteur

Refrigerador

Baño de agua a temperatura de 37 °C

Procedimiento

1. El conejo se inmovilizó en una caja de madera y esta se colocó verticalmente.
2. Se limpio el lomo en el margen exterior con una torunda de alcohol.

3. Se le inyectó la ceruloplasmina con una jeringa de insulina de acuerdo al esquema siguiente:

Día 0	Se colocó en un tubo de ensaye 1 mg de ceruloplasmina, 1 mL de solución salina y 1 mL de adyuvante completo de Freund, se homogenizó y se le aplicó al conejo en sitio múltiples por vía subcutánea.
Día 14	Se colocó 1 mg de ceruloplasmina, 1 mL de solución salina y 1 mL de adyuvante incompleto de Freund, se homogeneizaron y se le aplicó en sitio múltiples por vía subcutánea.
Día 35	Se colocaron 0.5 mg de ceruloplasmina, 1 mL de solución salina, se homogenizaron y se le aplicó en sitios múltiples, por vía subcutánea.
Día 40	Se aplicó igual que el paso anterior.
Día 45	Se sangró el conejo en blanco.

4. La sangre del conejo se colocó en un vaso de precipitado y se colocó en un baño de agua a temperatura de 37 °C durante horas.

5. Posteriormente se colocó en refrigeración a 4 °C para que se retrajera el coagulo.

6. Una vez retraído el coagulo se separó el suero por centrifugación y se colocó en una probeta graduada para observar el volumen.

7. Se transfirió a un frasco boca ancha color ámbar de 250 mL y se le agregó una pizca de azida de sodio para evitar la contaminación de bacterias.

8. El suero de conejo anticeruloplasmina de rata, se refrigeró hasta su utilización en la técnica de inmunodifusión radial.

Inmunoelectroforesis

La inmunoelectroforesis ha resultado con éxito los principales inconvenientes de la inmunodifusión ordinaria, el largo tiempo de resolución y la formación de más de una línea de precipitación. La inmunoelectroforesis tiene dos partes: la electroforesis y la interacción de antígeno-anticuerpo. La electroforesis separa las proteínas en sus constituyentes de acuerdo a sus diferentes propiedades iónicas. Los distintos componentes migran a diferentes velocidades y presentan diferentes movibilidades en un campo eléctrico creado en varios medios de soporte amortiguado tales como agarosa, agar, geles de poliacrilamida y acetato de celulosa. Se basa en la migración proteica, la interacción de la corriente y la distancia entre los polos catódicos y anódicos. En amortiguador básico, la albúmina se mueve más rápidamente hacia el ánodo, mientras

que la gamma globulina se comportan como cationes, precedidas hacia el ánodo por las β , α_2 , α_1 –globulinas.

Es un método de resolución excelente, ya que combina dos técnicas: la electroforesis y la inmunodifusión y es muy difícil que dos sustancias tengan el mismo corrimiento electroforético y a la vez la misma velocidad de difusión. Se emplea para observar pureza en antígenos y anticuerpos.

Material

Portaobjeto con agarosa al 1 %

Perforador con canal

Amortiguador de barbituratos

Fuente y equipo de electroforesis

Antisuero humano

Suero de rata,

Suero de conejo anti ceruloplasmina

Ceruloplasmina de rata, obtenida de precipitación con sulfato de amonio al 33%

Procedimiento

1. Se preparó agarosa al 0.1% para barnizar la placa y otra de agarosa al 1 % la cual será la base.
2. Se realizaron dos perforaciones y un canal en la parte central sin quitar al agar. En ambos orificios se colocó el suero de rata y se marcó con una pizca de azul de bromofenol, como indicador de corriente de la proteína.
3. Colocó en la cámara de electroforesis y le aplico 30 miliamperes, hasta que el colorante se desplaza $\frac{3}{4}$ partes del portaobjeto.
4. Se colocó en el primer canal el suero de conejo anticerculoplasmina de rata y en el segundo canal el antisuero de rata. Se dejó la muestra en cámara húmeda por 24 horas a temperatura de ambiente y observó la banda de precipitación (véase imagen 5).
5. Se dializó la placa con solución salina al 0.85% por 24 horas.
6. Se dializó la placa con agua destilada por 24 horas.
7. La placa se tiñó con Azul de Commassie por una hora.

8. Se colocó la placa a desteñir en solución ácido acético al 5% por dos días y con ello se apreció mejor las bandas (véase imagen 6).

Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial.

Procedimiento

Preparación de las placas

1. Se peso 0.3g de agarosa, en una balanza analítica.
 2. Se colocaron en un matraz de 250 mL, se les agregó 30 mL de PBS.
 3. Se colocó el matraz en olla Express de 21L a temperatura de 125 °C, para disolver la agarosa.
 4. Se colocaron 2 mL de agarosa con una pipeta graduada a 13 tubos de ensaye etiquetados.
 5. Se colocaron en baño María a 45 °C durante 10 min.
 6. A cada tubo se le agregó 150µL de suero de conejo anti-ceruloplasmina y se agitaron.
 7. Cada uno de los tubos fue vaciado en un pozo de las placas de Falcon, evitando la presencia de burbujas.
 8. Las placas se dejo reposar hasta alcanzar la solidificación.
9. Se realizaron 4 perforaciones de 3mm en el agar y se utilizaron el mismo día de su elaboración.

Procesamiento de la muestra estándar de ceruloplasmina de rata

1. Se colocó 5 µL el estándar de Ceruloplasmina de rata en el orificio de los pozos de las placas.
2. Estos fueron identificados de acuerdo a su código de numeración.
3. Las placas se refrigeraron durante 48 horas.
4. A las 48 horas se midió el halo de inhibición con una regla milimétrica.
5. Se colocaron las placas a dializar con solución salina por 24 horas.
6. Se colocaron a dializar las mismas placas en agua destilada por 24 horas.

7. Se tiñeron los agares de la placa Falcon con la adición de colorante Azul de Commassie por 1 hora.
8. Transcurrido el tiempo, se prosiguió a desteñir las muestras con ácido acético al 5% con tres cambios a de este mismo decolorante por 2 días.
9. Ya desteñidos (véase imagen 12 en anexo) se prosiguió a medir nuevamente los diámetros de los halos con una regla milimétrica y consecutivamente se midieron los diámetros de los halos del estándar y se realizaron los cálculos.

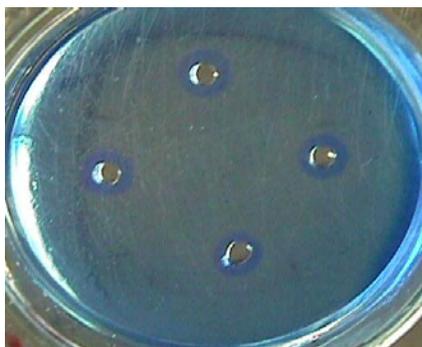


Imagen 12. Fotografía de la inmunodifusión radial para la ceruloplasmina de rata con la cual se sacó la medición de los halos con una regla milimétrica y así sacar los valores de las ceruloplasminas de los sueros de las ratas.

11. Se utilizo el valor de referencia: 21.2 mg de Cp de rata /dL. Para 55 μ L (véase imagen de inmunodifusión radial para estándar de ceruloplasmina) de muestra correspondió a 1.06 mg de Cp de rata / dL.

14.2 Preparación de reactivos

Para la reducción de NBT espectrofotométrica y en placa.

Solución de Krebs-Henseleit. pH 7.4

NaCl (0.154M)	100 mL
KCl (0.154M)	4 mL
CaCl ₂ (0.11M)	3 mL
KH ₂ PO ₄ (0.154M)	1 mL
MgSO ₄ • 7H ₂ O (0.154M)	1 mL
Glucosa	250 mg / 130 mL

Preparar 0.272g de NaHCO_3 en 21 mL de agua destilada, de esta solución agregar 10 mL a la solución de Krebs-Henseleit, los 11 mL restantes, se burbujan con CO_2 , por un minuto y se agrega a la solución de Krebs-Henseleit.

Solución amortiguadora de salina fosfato (PBS)

Cloruro de sodio	8.0g
Fosfato de potasio	0.2g
Fosfato de sodio (12 moléculas de H_2O)	2.9g
Cloruro de potasio	0.2g
Agua bidestilada (cbp)	1000 mL

Solución de nitro azul de tetrazolium (NBT) al 0.1 %.

NBT	30 mg
NaCl	0.255g
Agua destilada (cbp)	30 mL

Prepara 30 mg de NBT en 30 mL de agua destilada, mezclar bien y posteriormente pesar 0.255g de NaCl.

Solución de ácido clorhídrico 2.5 N.

Mezclar ácido clorhídrico 7.6 Ml y adicionarlo 100 mL de agua destilada.

Solución de cianuro de potasio 0.01M.

Cianuro de potasio	0.0650g
Agua destilada (cbp)	100 mL

Safranina para tinción de Gram.

Safranina	5.0g
Fenol	25g
Alcohol de 95%	50 mL
Agua destilada	500 mL

Se disuelve la safranina en fenol con un poco de agua en baño de agua hirviendo, se añade el alcohol y se mezcla, se añade el resto del agua y se filtra antes de usarse. Se guarda a temperatura ambiente.

También puede usarse la safranina preparada comercialmente para la tinción de Gram.

Solución Salina 0.85%.

Cloruro de sodio	0.85 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL

Solución Salina Citratada.

Cloruro de sodio	0.85g
------------------	-------

Citrato de sodio	0.4g
Agua destilada (cbp)	100 mL
Solución siliconizada 1 %.	
Sigmacote	1 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL

Para formación de rosetas Fc.

Solución A de hemolisina

Hemolisina	0.080g
PBS	1 mL

Solución B de Glóbulos rojos de carnero al 2%

Glóbulos rojos de carnero	0.4 mL
PBS	19.6 mL

Solución C suspensión al 1 % de glóbulos rojos sensibilizados.

De la solución A tomar 1 mL en 15 mL de PBS y adicionarle 16 mL de la solución B, e incubar en baño metabólico a 20 minutos a 37°C, lavar los eritrocitos con PBS y centrifugamos la muestra a 3500 rpm por 5 minutos, al precipitado se le coloca 16 mL de PBS.

Solución siliconizada 1 %.

Sigmacote	1 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL

Para la determinación de Ceruloplasmina por inmunodifusión radial.

Agarosa al 1%

Agarosa	1g
PBS	100 mL
Suero anticерuloplasmina	
Suero anticерuloplasmina	150µL
PBS	2 mL

Para determinación de Nitritos.

Cadmio metálico	
Cadmio metálico	500 mg
Solución acuosa de sulfato de cobre al 5%	
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	500 mg
Agua destilada	100 mL
Solución acuosa de cloruro de amonio al 5% pH=9	
Cloruro de amonio (NH ₄ HCl)	500 mg
Agua destilada	100 mL
Se ajusta el pH con borato de sodio.	
Solución acuosa de sulfato de zinc	
Sulfato de zinc (ZNSO ₄)	300 g
Agua destilada	1 L
Solución acuosa de ácido acético al 15% (V/V)	
Ácido acético	15 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL
Reactivo de sulfanilamida	
Sulfanilamida	500 mg
Ácido acético 15%	150 mL
Guardar en un frasco oscuro y protegerlo de la luz.	
Reactivo NED. N-(1-naftil)-etilendiaminodiclorhidratado	
NED	200 mg
Ácido acético 15%	150 mL
Guardar en un frasco oscuro y protegerlo de la luz.	
Estándar de Nitritos	
Nitrito de sodio (NaNO ₂)	200 µg / mL

Plateamiento del cadmio:

- a. En tubos de 13X100 se colocó 0.5g de cadmio metálico y se agregarán 2mL de sulfato de cobre al 5%, se agito en un Rocker por 10 minutos.
- b. Posteriormente se lavó 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre y se le dio un último lavado con ácido clorhídrico 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno.
- c. Después se lavó el cadmio con cloruro de amonio al 5% pH=9, y se guardo con esta solución hasta su utilización.

Para la determinación de Peroxidación lipídica (MAD) por el método de TBA (Ácido tiobarbiturico).

Estándar: 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMP)

Solución madre: 1mM / L de TMP (17 µL de TMP en 100 mL de agua bidestilada).

Solución de trabajo: 0.2mM / L (1 mL de TMP 1mM / L y añadir 4 mL de agua bidestilada)

Ácido ortofosfórico 0.2M.

H₃PO₄ 1.07 mL

Agua destilada 100 mL

Solución de TBA (ácido tiobarbiturico) al 0.11M / L

TBA 800 mg

NaOH (0.1M) 50 mL

Solución de NaOH (0.1M).

NaOH 200 mg

Agua destilada 50 mL

Solución de n-butanol. 50 mL

Solución de Butiril-hidroxitolueno (BHT) al 12.6mM.

BHT 277 mg

Etanol 100 mL

Solución de Butiril-hidroxitolueno (BHT) al 2mM.

BHT 44 mg

Etanol 100 mL

Solución saturada de NaCl 100 mL

Agua destilada 1L

TABLAS Y GRAFICAS DE CURVAS ESTANDAR

DETERMINACIÓN DE NITRITOS

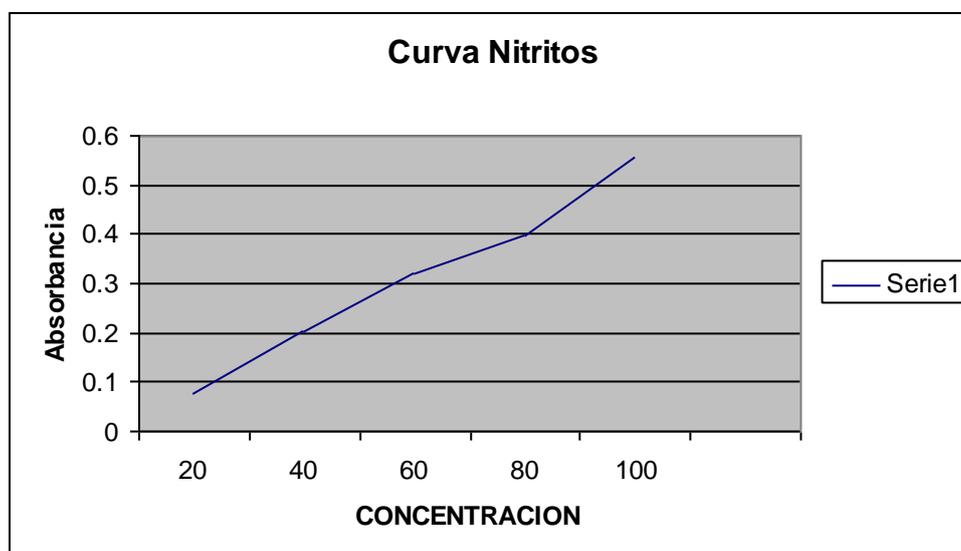
Tubo	Concentración de Nitritos (μg)	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)	Absorbancias
1	0	0	900	0
2	20	100	800	0.078
3	40	200	700	0.204
4	60	300	600	0.322
5	80	400	500	0.398
6	100	500	400	0.559

Se adicionaron 50 μL de sulfanilamida. Incubar 10 min. (Temperatura ambiente)

Se adicionaron 50 μL del reactivo de NED, se mezclaron e incubaron 30 min. (Temperatura ambiente)

Se Leyeron a 540 nm.

Tabla 3. Curva patrón. Concentración del estándar 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Nitrito de sodio y procesamiento de la muestra.

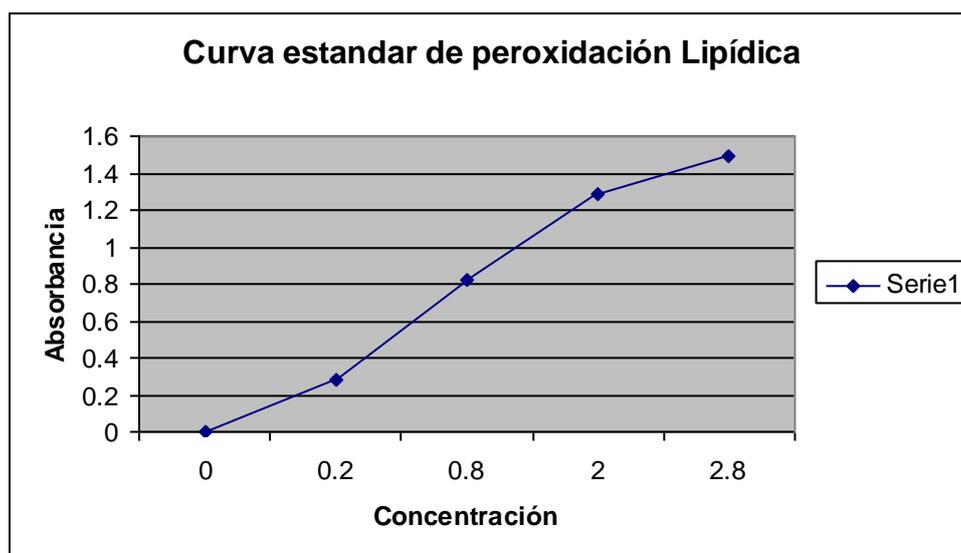


Grafica 3. Curva estándar de nitritos.

DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (MDA). MÉTODO DE TBA (ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)

Tubos	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TMP (μl)	H ₃ PO ₄ (μl)	TBA (μl)	Agua (μl)	Absorbancia
B	0	0	600	200	200	0
1	0.2	5	600	200	195	0.281
2	0.4	10	600	200	190	0.457
3	0.8	20	600	200	180	0.827
4	1.2	30	600	200	170	0.928
5	2.0	50	600	200	150	1.285
6	2.8	70	600	200	130	1.489
7	4.0	100	600	200	100	1.523

Tabla 4. Curva patrón. Concentración del estándar de MDA para peroxidación lipídica.



Grafica 4. Grafica de las concentraciones estándar de MDA para peroxidación lipídica.

15. REFERENCIAS

1. Fonseca MJ, Estudio comparativo de la utilidad de la técnica de reducción de NBT en placa, para determinar % de fagocitosis e índice fagocítico, y la técnica espectrofotométrica de reducción de NBT, para uso en recién nacidos. [Tesis]. México: FES Zaragoza. UNAM.; 1998.
2. Del Rey-Pineda G, Gómez-González MV, Solorsono-Santos F, Arredondo-García JL. Assessment of the functional Capacity for Intracellular Death and Phagocytosis of Polymorphonuclear Cells in Healthy Neonatos. Arch Med Res. 1997; 28: 401.
3. Baehner RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. N. Engl J Med. 1968; 287: 971.
4. Susan EP, William TS. Aspectos de laboratorio de inmunología. Inmunología Clinical pediatrics of Norteamérica. 1994; 4: 661.
5. Nhatan FC. Secretory products of macrophages. J. Clin. Invest. 1987; 79: 319.
6. Hartger FC, Figdor CG. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. Immunol. Today. 2000; 21: 542-545.
7. Dawson RCM, Elliott DC. Data for Biochemical Research. Oxford university Press. USA 1969.
8. WHO/IARC Special technical report. Identification enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Scand. J. Immunol. 1974; 3: 521-532.
9. Hunt SV. Separation of lymphocyte sub-populations. Cellular immunology. Blackwell Scientific Publications 1986.
10. Shortman K, Wu L. Early T lymphocytes progenitors. Annual reviews of immunology 1996; 14: 29-47.
11. Albright JF, Albright JW. Aging, immunity and infection. Humana Press. Totowa, New Jersey 2003.
12. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 199; 257: 1220-1224.
13. Samocha-Bonet D, Gal S, Schnitzer E, Linchtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation in the presence of albumin, inhibitory and prooxidative effects, Free Radic Res 2004; 38: 1173-1181.
14. Ehrenwald E, Fox PL. Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of a plasma metalloproteinase. Archives of Biochem and Biophysics 1994; 309: 392-395.
15. Das D, Tapryal N, Goswami SK, Mukhopadhyay CK. Regulation of Ceruloplasmin in human Hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. Biochem 2007; 402: 135-141.
16. Banha J, Marques L, Oliveira R, Martins MF, Paxão E, Pereira D, Malho D, Costa L. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism. Free Radical Biology and Medicine 2008; 44: 483-492.
17. Tortora GJ, Anagnostakos NP. Principios de anatomía y fisiología. Sexta edición. Harla 1993; 3: 25- 46.
18. Donald WM, Stewart J. Inmunología. Segunda edición. Manual moderno 1995.
19. Manual de práctica para el laboratorio de análisis bioquímico clínico I, Manual de Hematología. FES Zaragoza UNAM 2000; 84-91.
20. Tortora GJ, Anagnostakos NP. Principios de anatomía y fisiología. Sexta edición. Harla 1993.
21. Rivera-Ordóñez Arizbe, AINEs: Su mecanismo de acción en el Sistema Nervioso Central, Revista Mexicana de Anestesiología 2006; 29, 36-40.

22. Boyce, Eric G., Takiya, Liza. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Review of factors guiding formulary selection 2004 Jun 1; 125 (11): 25-30.
23. Caballero Callejas, J. Indicaciones de los AINEs vía parenteral en dolor agudo. Supuestos practices 2005.
24. Marjoribanks J. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea (Cochrane Review). In: the Cochrane Library, Issue 4, 2003.
25. M. R. Moreno Brea y J. A. Micó, Inhibidores de la COX-2: Mecanismo de acción, Revista Sedolor, Reunión Científica de la Sociedad Española del Dolor, España, 2000:3-6.
26. Rivera-Ordóñez Arizbe, AINEs: Su mecanismo de acción en el Sistema Nervioso Central, Revista Mexicana de Anestesiología, 2006; 29:36-40.
27. Evans WC. Farmacognosia. Edinburgo W. B. Saunders; 2002: 3-4, 47, 137-139, 206.
28. Grabley S, Thiericke R. The impact of natural products on drug discovery. In: Grabley S, Thiericke R. Drug discovery from nature. Springer. 2000: 5, 20-21.
29. Domínguez XA, Canales A, Garza J, Gómez E, Garza L. Constituents of leaves and branches of *Helietta parvifolia*. [consultado 22 Nov 2007]. <http://www.sciencedirect.com/science_ob>
30. Reyes LE. Valoración de la actividad antiinflamatoria y antimicótica de un extracto acuoso de *Helietta parvifolia* (Barreta). [Tesis]. México FES Zaragoza. UNAM. 2008; 3-24, 53-54.
31. De la Torre Mr, Rodríguez Mr. Vías de administración y protocolos. En: De la Torre R. "Guía Práctica del Dolor Agudo Postoperatorio". Ed. Arán S.A. 2001; 99-118.
32. Stites PD, Terr IA. Inmunología humana y básica. Editorial manual moderno. México 1994.
33. Abul KA, Andrew HL. Inmunología celular y molecular. Segunda edición. Editorial Interamericana. Madrid España 1995.
34. Bucala R, Cerama A. Advanced glycolastion: chemistry, biology and implication for diabetes and aging, Adv pharmacology. 1992; 23: 1-34.
35. Stites PD, Terr IA. Inmunología humana y básica. Editorial manual moderno. México 1994.
36. Abba IT. Inmunología básica y clínica. Novena edición. El manual moderno, México 1998.
37. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins. Patología estructural y funcional. 6ª ed. Colombia: McGraw-Hill Interamericana; 2000: 53-89.
38. Pardo FJ. Anatomía patológica. Madrid: Harcourt; 1997: 53-54, 178-205.
39. Milles AA, Milles EM. The value and duration of defense reaction of the skin to the primary lodgement of bacteria. Brit J Exper 1957; 38: 79.
40. Lara SJ. Papel de los fagocitos en infecciones. Infectología 1988; 8: 325.
41. Jerry AW, Robert HD. Fagocitosis, el proceso normal y sus anormalidades clínicamente significativas. The pediatric Clinics of North America. 1974; 21: 551.
42. Alper Ca, Blok KJ. Inactivador of the third component of complement as an anhibitor in the propedin pathway. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1972; 69: 2910.
43. Johnston RB, Klempere MR. The enhancement of bacterial phagocytosis by serum. The role of complement components and two cofactors. J Esper Med. 1969; 120: 1275.
44. Milles AA, Milles EM. The value and duration of defense reaction of the skin to the primary lodgement of bacteria. Brit J Exper 1957; 38: 79.
45. Remington JS, Kelein JO. Infectious diseases of the fetus y newborn infant. Cuarta edición, Editorial WB Saunders Compani USA; 1995.

46. Woolf N. Cell, tissue and disease. 3rd edn. Edinburgo: W.B. Saunders; 2000: 57-82.
47. Robbins S L, Vinoy K, Ramzi S C. Patología estructural y funcional. México: Interamericana-McGraw-Hill 2000.
48. Curnutte JT, et al. Chronic granulomatous disease due to a defect in the cytosolic factor required for nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase activation. *J. Clin Invest* 1988; 81: 606.
49. Kumar V, Addas A. Patología estructural y funcional. Séptima edición. Madrid: CLSEVIER; 2005: 3-87.
50. Stauton E, Todd WE, Mason HS, Van Bruggen JT. Bioquímica medica. Cuarta ed. Interamericana; 1966.
51. Cotran R, Kumar V. Patología estructural y funcional. Sexta edición. USA: McGraw-Hill. Interamericana; 1999: 1-95.
52. Yamamoto K, Fazle Akbar MD, Masumoto T, Onji M. Increased nitric oxide (NO) production by antigen-presenting dendritic cells is responsible for low allergenic mixed leucocyte reaction (MLR) in primary biliary cirrhosis (PBC). *Blackwell Science (Japan)*. 1998; 114: 94-101.
53. Hokari A, Zeniya M, Esumi H, Kawabe T, Gershwin ME, Toda G. Detection of serum nitrite and nitrate in primary biliary cirrhosis: possible role of nitric oxide in bile duct injury. *Pub Med*. 2002; 17(3): 308-315.
54. Stevens A, Lowz J. Anatomía patológica. Segunda edición. Madrid: Harcourt; 2001 1-58, 141-148.
55. Das D, Tapryal N, Goswami SK, Fox, PL, Mukhopadhy CK. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem J*. 2007; 402: 135-141.
56. Sogawa K, Yamada T, Suzuki Y, Masaki T, Watanabe S, Uchida Y et al. Elevation of ceruloplasmin activity involved in changes of hepatic metal concentration in primary biliary cirrhosis. *Pub Med*. 1994; 84(3): 367-370.
57. Worwood M, Taylor DM, Hunt AH. Copper and Manganese Concentrations in Biliary Cirrhosis of Liver. *Med. J (Brit)*. 1968; Agosto: 344-346.
58. Eduardo E, Paul L. Isolation of Nonlabile Human Ceruloplasmin by Chromatographic Removal of a Plasma Metalloproteinase. *Pub Med*. 1994; 309: 392-395.
59. Ahmed e., Mina T. In vitro effects of aqueous seeds extract of *Acacia cyanophylla* on the opsonized zymosan-induced superoxide anions production by rat polymorphonuclear leukocytes. *Pub Med*. 2004; 5: 35-36.
60. Goode CA, Dinh CT, Linder MC. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1989; 258: 133-141.
61. Vulpe C, Levinson B. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet*. 1993; 3: 7-13.
62. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulzer R, Lomeli N. Copper transport. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67: 965S-971S.
63. Yang CC, Wu ML, Deng JF. Prolonged hemolysis and methemoglobinemia following organic copper fungicide ingestion. *Vet Hum Toxicol*. Dec 2004; 46 suppl 16: 321-3.
64. Marroquín R, Flores M. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.; 2002: 23-25, 48-49.