



---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto inmuno-regulador del  
extracto acuoso del fruto noni (*Morinda citrifolia*  
L.) en ratones CD1.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

**GONZÁLEZ GARCÍA SARA ELIZABETH**

Director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor de tesis: MC. Maurilio Flores Pimentel



México, D.F. 2014



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.

## Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Conceptos de inmunología	3
3.1.1 Anticuerpo	3
3.1.2 Antígeno	5
3.1.3 Determinantes antigénicos	5
3.2 Tipos de inmunidad	6
3.3 Células del sistema inmunitario	7
3.3.1 Células linfoides	7
3.3.1.1 Linfocitos B	8
3.3.1.2 Linfocitos T	9
3.4 Cuantificación de células productoras de anticuerpos	12
3.5 Reacción de hemaglutinación	13
3.6 Ceruloplasmina	15
3.7 Peroxidación lipídica	17
3.8 Proteínas totales y electroforesis	18
3.9 Biomarcadores de daño orgánico	20
3.10 Herbolaria en México	22
3.10.1 Descripción de la planta	22
4. Planteamiento del problema	24
5. Objetivos	26
6. Hipótesis	27
7. Diseño experimental	28
7.1 Tipo de estudio	28
7.2 Población de estudio	28
7.3 Criterios de aceptación, exclusión y eliminación	28
7.4 Variables	28
7.5 Material	29
7.6 Métodos	30

---

7.7 Diseño estadístico	36
8. Resultados	37
9. Análisis de resultados	40
10. Conclusiones	43
11. Perspectivas	44
12. Referencias	45
13. Anexos	51

## 1. Resumen

Desde tiempos ancestrales se han empleado las plantas, flores y frutos con fines curativos por diversas culturas, pero hasta hace pocas décadas se comenzó a investigar el efecto, eficacia y toxicidad de los extractos más utilizados como materia prima de productos que se comercializan ampliamente en el país bajo la etiqueta de “suplementos alimenticios” que prometen cura a diversas enfermedades, aumento de energía y fortalecimiento del sistema inmune principalmente.

Este es el caso del jugo de noni (*Morinda citrifolia L.*), al que se le han atribuido propiedades inmuno-reguladoras entre muchas otras. Con el fin de evaluar el efecto que el extracto acuoso de frutos de noni ejerce sobre el sistema inmunitario se diseñó un estudio en un modelo *in vivo* conformado por dos grupos de ratones CD1, que se dividieron en tratados y testigos. Después de 26 y 34 días de administración se aplicaron pruebas celulares y humorales como hemaglutinación, cuantificación de células formadoras de anticuerpos por bazo, proteínas séricas totales, electroforesis y ceruloplasmina; además, se realizó el cálculo de índices cardíaco, esplénico, renal y hepático para determinar cambios orgánicos y se cuantificaron niveles de enzimas cardíacas para determinar daño en el corazón. Los resultados obtenidos sugieren que el extracto acuoso de frutos de noni genera un efecto regulador del sistema inmune y no parece producir efectos tóxicos.

---

## 2. Introducción

El sistema inmunológico es la defensa del organismo humano, que se compone de una fracción humoral y una celular, que puede verse afectado por varios sucesos, como la presencia de agentes patógenos, tratamientos médicos inmunodepresores o enfermedades autoinmunes.

Los linfocitos son las células más importantes del sistema inmunitario y sus niveles pueden medirse para determinar la eficiencia del sistema inmune de algún organismo y así generar inferencias sobre los factores que interfieren en su desempeño.

Se han reportado indicios de que es posible regular y mejorar la función del sistema inmune consumiendo diferentes tipos de alimentos de origen vegetal, por ejemplo el jugo de frutos de noni (*Morinda citrifolia* L.), del que se presumen propiedades inmuno-potenciadoras hasta el punto de ser considerado un anticancerígeno natural en algunas regiones de Asia.

A pesar del amplio consumo de este suplemento alimenticio en la población mexicana, hasta el momento no se han diseñado estudios que demuestren el efecto que este fruto ejerce sobre el sistema inmune en modelos in vivo.

Con el objeto de evaluar el efecto inmuno-regulador de este fruto se preparó un extracto acuoso que se administró a un grupo de ratones CD1 y se determinaron ciertos marcadores humorales y celulares como conteo de células formadoras de

---

anticuerpos por bazo utilizando la técnica de Jerne, hemaglutinación, ceruloplasmina, proteínas totales, electroforesis, enzimas cardíacas y cálculo de índices orgánicos.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Conceptos de inmunología

La inmunología estudia los mecanismos mediante los cuales el cuerpo se defiende de agentes infecciosos y otras sustancias extrañas en su ambiente; cubre muchas líneas de defensa, incluso las barreras físicas como piel, sustancias químicas protectoras en la sangre y líquidos tisulares, y las reacciones del organismo propio hacia la lesión o infección. Las células y moléculas actúan en conjunto en una red dinámica denominada sistema inmunitario.<sup>1-3</sup>

El sistema inmunitario surgió por evolución para proteger a los organismos multicelulares de los agentes patógenos generando una enorme variedad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar de manera específica a cada uno de los invasores.

Además, está capacitado para reconocer células propias alteradas que pueden desembocar en cáncer. Típicamente, el reconocimiento de un agente patógeno por el sistema inmunitario activa una reacción efectora, que suprime o neutraliza al invasor por medio de células especializadas llamadas anticuerpos.<sup>2,4</sup>

##### 3.1.1 Anticuerpo

Son las proteínas que se unen a un antígeno, se encuentran en la membrana de las células B y los secretan las células plasmáticas. El anticuerpo unido a la membrana confiere especificidad antigénica en las células B, la proliferación de

---

clonas de células B específicas de antígeno se activa por la interacción del anticuerpo de membrana con antígeno. Los anticuerpos secretados circulan en la sangre, en donde sirven como los efectores de la inmunidad humoral; allí buscan y neutralizan antígenos o los marcan para su eliminación.

Por lo regular, el sistema inmunitario responde al liberar anticuerpos contra varios epítopos en el antígeno, ésta reacción requiere la incorporación de varias clonas de células B; sus secreciones son anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales une de forma específica un determinante antigénico aislado. En conjunto, estos anticuerpos monoclonales constituyen la respuesta sérica de anticuerpo policlonal y heterogénea a un antígeno inmunizante.

Las moléculas de anticuerpo tienen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas, esta estructura se integra con dos cadenas ligeras (L) idénticas y polipeptídicas, con un peso molecular aproximado de 25 000, y dos cadenas pesadas (H), también idénticas y peptídicas aunque más grandes, con peso molecular de 50 000 o mayor. Al igual que las moléculas de anticuerpo que constituyen, las cadenas H y L también se llaman inmunoglobulinas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro y por interacciones no covalentes, como uniones de sal y enlaces de hidrógeno e hidrófobos, para formar un heterodímero (H-L). Las dos combinaciones idénticas de cadena pesada y ligera (H-L) están unidas entre sí por interacciones no covalentes similares y por puentes disulfuro para formar la estructura de anticuerpo básica de cuatro cadenas (H-L)<sub>2</sub>, un dímero de dímeros.

Alrededor de los 110 primeros aminoácidos de la región terminal de una cadena ligera o pesada varían de modo considerable entre anticuerpos de distinta especificidad. Estos segmentos de secuencia muy variable se conocen como regiones V: V<sub>L</sub> en las cadenas ligeras y V<sub>H</sub> en las pesadas. Todas las diferencias de especificidad que poseen los distintos anticuerpos pueden seguirse hasta variaciones en las secuencias de aminoácidos de las regiones V llamadas regiones determinantes o complementarias (CDR); estas CDR, sea en la cadena ligera o en la pesada, son las que constituyen los sitios de unión de antígenos de la molécula de anticuerpo, las regiones de secuencias relativamente constante

---

más allá de las regiones variables se han designado regiones C: C<sub>L</sub> en la cadena ligera y C<sub>H</sub> en la pesada. Los anticuerpos son glucoproteínas con pocas excepciones, los sitios de fijación de carbohidratos están restringidos a la región constante.

En la parte constante de las proteínas se encuentran cinco patrones de secuencia básicos, que corresponden a cinco diferentes regiones constantes de cadena pesada (C) ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\alpha$ ). Cada una de estas cinco distintas cadenas se conoce como isotipo, la longitud de las regiones constantes es de unos 330 aminoácidos para  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha$  y de 440 aminoácidos para  $\mu$  y  $\epsilon$ , las cadenas pesadas de una molécula de anticuerpo particular determinan la clase de ese anticuerpo: IgM ( $\mu$ ), IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgD ( $\delta$ ) o IgE ( $\epsilon$ ).

La estructura de la molécula de inmunoglobulina la determinan las organizaciones primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.<sup>3, 4</sup>

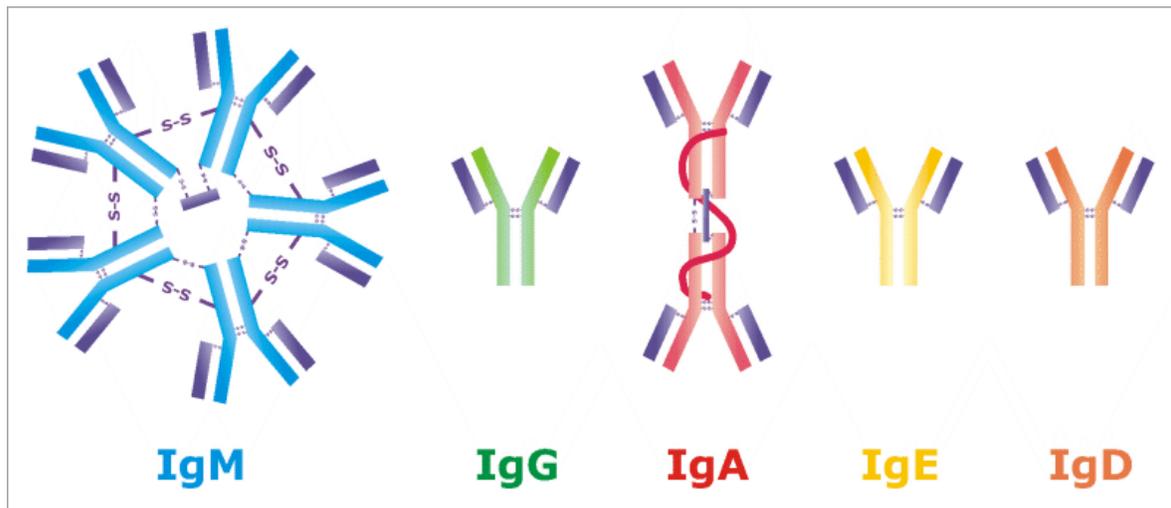


Figura 1. Estructura de los diferentes tipos de anticuerpos.<sup>5</sup>

### 3.1.2 Antígeno

Tradicionalmente, un antígeno se ha definido como todo aquel material, propio o extraño, soluble o particulado, que es capaz de despertar una respuesta inmunitaria en un individuo inmunológicamente competente, el antígeno debe ser capaz de interactuar específicamente con los productos (anticuerpos y/o

---

linfocitos sensibilizados) de la respuesta engendrada. Aquellos antígenos que en determinadas condiciones referentes a la especie animal, a la dosis del antígeno y a la vía de su administración, son capaces de inducir respuestas inmunitarias, se describen como inmunógenos.<sup>3, 5-7</sup>

### 3.1.3 Determinantes antigénicos

La inoculación de un antígeno en un animal provoca a éste la producción de anticuerpos. El análisis molecular de los anticuerpos producidos demuestra que no se trata de un solo tipo de anticuerpo sino de muchos, todos aquellos capaces de reaccionar con el antígeno usado en la inmunización. El número de moléculas diferentes de anticuerpo producido será mayor mientras más grande sea la complejidad del inmunógeno empleado, es decir, la variedad de anticuerpos obtenidos al inyectar un microorganismo es más grande que la variedad de los anticuerpos producidos contra una sola molécula extraña.<sup>6-8</sup>

### 3.2 Tipos de inmunidad

La **inmunidad innata** (o natural) se refiere a todas las medidas de resistencia congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un patógeno (cualquier microorganismo capaz de causar daño a tejidos o enfermedades); este tipo de inmunidad no requiere de un encuentro o exposición previa a tal agente, ni tampoco se modifica significativamente con exposiciones repetidas al patógeno durante toda la vida de un individuo.

La **inmunidad adquirida** se refiere a la resistencia del cuerpo que en el primer contacto con un patógeno es débil o ausente, pero que se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes al mismo patógeno específico.

Ambos sistemas inmunes se componen de numerosos elementos que tienen la capacidad de llevar a cabo diferentes funciones protectoras. Algunos de estos elementos son células especializadas que tienen la habilidad para reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias dañinas; las defensas suministradas por tales células se conocen como inmunidad mediada

---

por células o inmunidad celular. El resto de los componentes son macromoléculas solubles (generalmente proteínas) que circulan en la sangre y en el líquido extracelular, haciendo a estos fluidos inhóspitos para los organismos invasores extraños, aún en ausencia de todos los tipos de células defensoras; las defensas de este tipo, libres de células, se denominan inmunidad humoral. Generalmente ambos tipos de inmunidad actúan de manera coordinada y sinérgica.<sup>3</sup>

### 3.3 Células del sistema inmunitario

Los linfocitos que portan receptores de antígeno son las células centrales de la inmunidad adaptativa y son las responsables de sus propiedades características de diversidad, especificidad y memoria. Si bien los linfocitos son importantes, otros tipos de glóbulos blancos también tienen funciones esenciales en inmunidad adaptativa, presentación de antígenos, secreción de citocinas y fagocitosis y destrucción de microorganismos. Además, el sistema inmunitario innato, que comparte muchas células con el adaptativo, realiza un indispensable papel de colaboración para inducir respuestas adaptativas. El complemento se sintetiza principalmente en el hígado, aunque los fagocitos mononucleares sintetizan pequeñas cantidades del mismo. Cada célula sintetiza y secreta solamente un conjunto determinado de citosinas o mediadores de la inflamación, además existen dos tipos de células dendríticas que tienen importancia para la presentación de antígenos a los linfocitos.<sup>1, 2</sup>

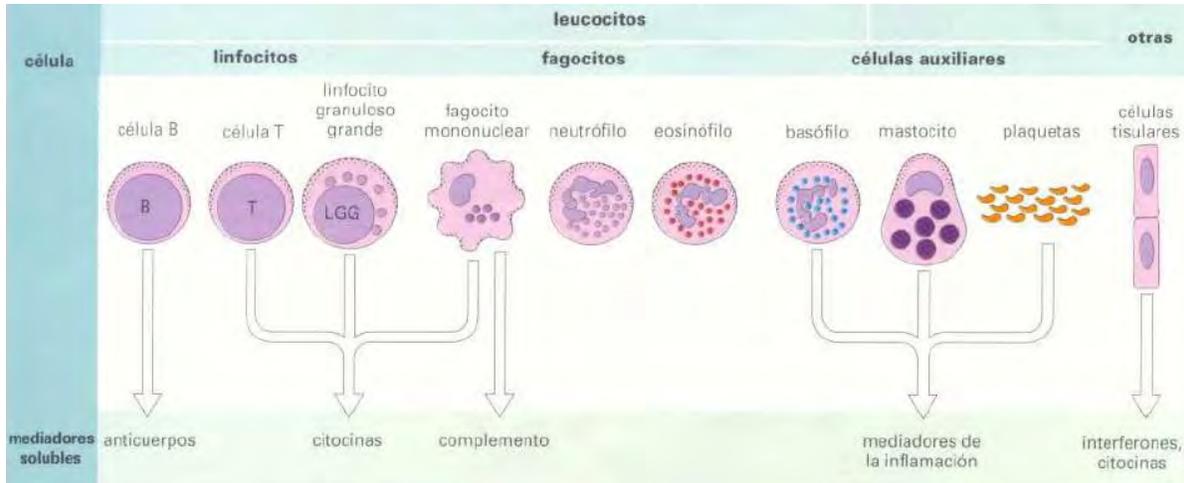


Figura 2. Principales células del sistema inmune. <sup>1</sup>

### 3.3.1 Células linfoides

Los linfocitos son uno de los muchos tipos de glóbulos blancos que se producen en la médula ósea por el proceso de hematopoyesis, constituyen 20 a 40% de los glóbulos blancos del cuerpo y 99% de las células de la linfa; hay alrededor de un billón de linfocitos en el cuerpo humano, que salen de la médula ósea, circulan continuamente en la sangre y la linfa y son capaces de migrar hacia espacios tisulares y órganos linfoides, por lo que constituyen un puente entre distintas partes del sistema inmunitario.

Las **células asesinas naturales (células NK)** son linfocitos granulares grandes que forman parte del sistema inmunitario innato y no expresan el grupo de marcadores de superficie característico de las células B o T. Los linfocitos B y T que no han interactuado con antígeno (a los que se denomina vírgenes, inocentes o no cebados) son células pequeñas móviles no fagocíticas que no es posible diferenciar entre sí a nivel morfológico. En su estado inactivo, permanecen en la fase de reposo ( $G_0$ ) del ciclo celular. Dichas células, que se llaman asimismo linfocitos pequeños, sólo tienen alrededor de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro; su citoplasma forma anillos apenas discernibles alrededor del núcleo. En condiciones apropiadas, la interacción de los linfocitos pequeños con antígeno induce a estas células a avanzar en el ciclo celular de  $G_0$  a la fase de crecimiento ( $G_1$ ) y más adelante a S (replicación de ADN),  $G_2$  (segunda fase de crecimiento celular) y M

(división celular). A medida que experimentan el ciclo celular, los linfocitos crecen hasta convertirse en células de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro llamadas linfoblastos; éstos muestran una relación citoplasma:núcleo más alta y mayor complejidad de organelos que los linfocitos pequeños. Los linfoblastos proliferan y al final se diferencian en células efectoras o bien en células de memoria.<sup>2-4</sup>

#### 3.3.1.1 Linfocitos B

Cuando los linfocitos B han madurado dentro de la médula ósea y la abandonan, cada uno expresa un receptor de unión de antígeno único en su membrana. Los extremos aminoterminal de los pares de cadena pesada y ligera forman una hendidura dentro de la cual se unen los antígenos.

Cuando una célula B virgen (la célula que no ha encontrado antes algún antígeno) halla por primera vez el antígeno que corresponde a su anticuerpo unido a la membrana, la unión del antígeno al anticuerpo da lugar a que la célula se divida con rapidez y su progenie se diferencie en células B de memoria y células B efectoras llamadas células plasmáticas. Las células B de memoria tienen un periodo de vida más prolongado que las células vírgenes y expresan el mismo anticuerpo unido a membrana que su célula B original. Las células plasmáticas producen el anticuerpo en una forma que puede secretarse y no tienen anticuerpo unido a membrana, o muy poco, se estima que una célula plasmática aislada puede liberar más de 2000 moléculas de anticuerpos por segundo y los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral.<sup>3, 8</sup>

#### 3.3.1.2 Linfocitos T

A diferencia de las células B, que maduran dentro de la médula ósea, las células T migran a la glándula timo para madurar, durante la maduración dentro del timo, la célula T comienza a expresar en su membrana una molécula de unión de antígeno única, la denominada receptora de la célula T. Al contrario de los anticuerpos unidos a membrana en las células B, que pueden reconocer antígenos aislados, los receptores de la célula T únicamente pueden identificar antígenos unidos a

---

proteínas de membrana celular llamadas moléculas del complejo de mayor histocompatibilidad (MHC). Las moléculas del MHC que actúan en este fenómeno de reconocimiento, que se conoce como “presentación de antígenos”, son glucoproteínas polimórficas que se encuentran en las membranas celulares. Existen dos tipos principales de moléculas de MHC: moléculas del MHC clase I, que expresan casi todas las células nucleadas de las especies de vertebrados y que poseen una cadena pesada unida a una proteína invariable pequeña llamada microglobulina beta y moléculas del MHC clase II, integradas por una cadena de glucoproteína alfa y una beta, que sólo las expresan las células presentadoras de antígeno. Cuando una célula T virgen encuentra antígeno combinado con una molécula de MHC en una célula, la célula T prolifera y se diferencia en célula T de memoria y varias células T efectoras.

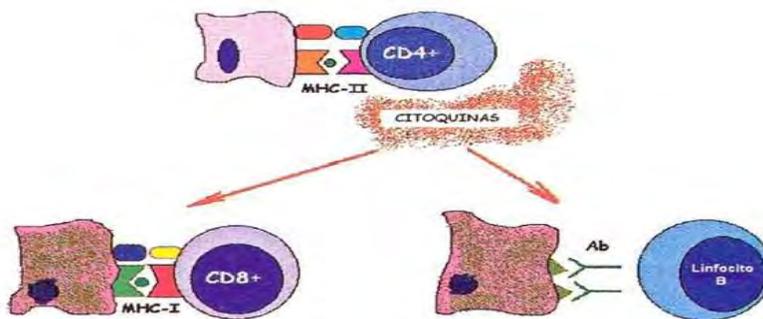


Figura 3. Representación de la acción de linfocitos.<sup>9</sup>

Existen dos subpoblaciones de células T bien definidas: células T colaboradoras ( $T_H$ ) y células T citotóxicas ( $T_C$ ). Estos tipos de células pueden diferenciarse entre sí por la presencia de glucoproteínas de membrana CD4 o CD8 en su superficie. Las células T que muestran CD4 suelen funcionar como células  $T_H$ , en tanto que las que evidencian CD8 lo hacen casi siempre como células  $T_C$ .

Una vez que la célula  $T_H$  reconoce un complejo de antígeno y molécula de MHC clase II e interactúa con él, se activa la célula –se convierte en una célula efectora

que secreta varios factores de crecimiento conocidos en conjunto como citocinas. Las citocinas secretadas tienen una función importante en la activación de células B, células T<sub>C</sub>, macrófagos y varios tipos celulares más que intervienen en la reacción inmunitaria. Las diferencias en el patrón de citocinas producidas por células T<sub>H</sub> activadas tienen como resultado tipos de respuesta inmunitaria diferentes.

Bajo la influencia de citosinas derivadas de T<sub>H</sub>, una célula T<sub>C</sub> que reconoce un complejo de antígeno y molécula de MHC clase I prolifera y se diferencia hacia una célula efectora llamada linfocito T citotóxico (CTL). En contraste con la célula T<sub>C</sub>, el CTL no suele secretar muchas citocinas y, por el contrario, muestra una actividad destructora de células o citotóxica. El CTL tiene una función vital en la vigilancia de las células del cuerpo y la eliminación de cualquiera que muestre antígeno, como las células infectadas por virus, las células tumorales y las células de un injerto de tejido extraño. Las células que muestran antígeno extraño en complejo con una molécula de MHC clase I se denominan células propias alteradas y son blancos de los linfocitos T citotóxicos.<sup>3, 4</sup>

Durante la respuesta de fase aguda, el hígado incrementa temporalmente la síntesis de más de 30 proteínas séricas diferentes, a menudo llamadas proteínas de fase aguda. Muchas de éstas como los factores del complemento C3, factor B, MBL, LBP, proteína C reactiva y la proteína P sérica, participan en la defensa antimicrobiana; otras proteínas son los factores de la coagulación, como el fibrinógeno, el factor estimulante de colonias de granulocitos, antioxidantes, así como proteínas séricas de unión a metales que secuestran hierro, zinc y cobre, de manera que los microorganismos invasores no pueden disponer de estos nutrientes esenciales para sus funciones.

La respuesta de fase aguda tiene lugar cuando los hepatocitos se exponen a citosinas particulares, en especial, interleucinas liberadas localmente o hacia la circulación sanguínea por otras células huésped. Uno de los inductores más potentes de estas citosinas, en coordinación con mecanismos nerviosos originan fiebre, somnolencia, pérdida del apetito, etc.<sup>2- 4</sup>

---

El bazo es un órgano linfoide secundario, un ganglio capaz de drenar antígenos de la sangre. Formado por dos fracciones que se han denominado pulpa roja y pulpa blanca. La pulpa roja participa en la destrucción de eritrocitos deteriorados y en la mielopoyesis de eritrocitos, granulocitos y plaquetas. Por otra parte, la pulpa blanca constituye el tejido linfoide que participa en la generación de respuestas inmunes frente a antígenos llegados hasta él por vía sanguínea, en el bazo se encuentran todos los tipos celulares necesarios para generar respuestas inmunes celulares y humorales (linfocitos T, linfocitos B, células Natural Killer, macrófagos, etc.) además del entramado hístico necesarios para su correcta interacción mutua. Los linfocitos T y B también se activan y proliferan cuando se incuban con anticuerpos dirigidos contra ciertas moléculas presentes en su membrana. Los anticuerpos anti-TCR por ejemplo, estimulan la proliferación de las células T, mientras que los anticuerpos anti-BCR estimulan la proliferación de los linfocitos B. La agregación, por entrecruzamiento, de los receptores para antígeno es la señal que inicia la activación y proliferación de estas células.<sup>3, 10, 11</sup>

La determinación cuantitativa de los niveles de cada inmunoglobulina por inmunodifusión radial es quizá la medida más sencilla de la actividad de las células B, el método clásico consiste en medir la cantidad de Ig sintetizada y secretada por las células linfoides presentes en la sangre periférica al cabo de 6 o 7 días de estimulación el cultivo. La técnica más utilizada para determinar la presencia de células productoras de anticuerpos es la hemólisis localizada en gel, descrita inicialmente por Jerne, donde se observa principalmente IgM. También es posible obtener una medida de la potencia de la respuesta del sistema inmunitario ante un estímulo cuantificando el número de anticuerpos mediante la técnica de hemaglutinación, y determinando cantidades de proteínas séricas e inmunoproteínas mediante electroforesis.

A continuación se mencionan los fundamentos de algunas técnicas que permiten determinar el perfil inmunitario, además se explican pruebas como cálculo de índices esplénico, renal, hepático y cardiaco que, junto con la cuantificación de

---

enzimas del corazón proporcionan algún indicio de toxicidad o daño orgánico de los organismos en experimentación.

### 3.4 Cuantificación de células productoras de anticuerpos (Técnica de Jerne)

La técnica más utilizada para determinar la presencia de células productoras de anticuerpos es la hemólisis localizada en gel, descrita inicialmente por Jerne, donde se observa principalmente IgM. Se utiliza para visualizar las células productoras de anticuerpo y para cuantificarlas. Tomando en cuenta el número de placas líticas, el número de células usadas en el ensayo y el número total de células en el bazo, se puede tener una idea muy aproximada del número de células productoras de anticuerpo en el bazo entero.



Figura 4. Detección de células productoras de anticuerpo según la técnica de Jerne clásica.<sup>13</sup>

La técnica de Jerne detecta principalmente células productoras de anticuerpos de la clase IgM (técnica directa), y se requiere de una incubación previa a la adición de complemento, con un antisuero (de conejo, por ejemplo) contra inmunoglobulinas de ratón, para detectar las células productoras de anticuerpos de la clase IgG (técnica indirecta).<sup>12, 13</sup>

### 3.5 Reacción de hemaglutinación

---

La interacción entre el anticuerpo y un antígeno particulado resulta en un agrupamiento visible llamado aglutinación. Los anticuerpos que producen estas reacciones se denominan aglutininas. Las reacciones de aglutinación son similares en principio a las reacciones de precipitación; dependen del enlace cruzado de antígenos polivalentes. Del mismo modo que en un exceso de anticuerpo inhibe las reacciones de precipitación este exceso también puede inhibir las reacciones de aglutinación; tal inhibición se denomina efecto prozona. Ya que los efectos prozona pueden encontrarse en muchos tipos de inmunoensayos, comprender la base de este fenómeno tiene importancia general. Diversos mecanismos pueden causar el efecto prozona. Primero, a concentraciones altas de anticuerpo, el número de sitios de unión de anticuerpo puede exceder en grado considerable el de epítomos. Como resultado, casi todos los anticuerpos se unen a antígeno sólo de manera univalente en lugar de multivalente.

Los anticuerpos que se unen de manera univalente no pueden enlazar en forma cruzada un antígeno con otro. Los efectos prozona se diagnostican con facilidad al valorar una diversidad de concentraciones de anticuerpo (o antígeno); conformese diluye a una concentración óptima de anticuerpo, se observan valores más altos de aglutinación o cualquier parámetro que se mida en la valoración que se utilice, el efecto prozona también puede ocurrir por otra razón cuando se emplean anticuerpos policlonales. Es posible que el antisuero contenga concentraciones altas de anticuerpo que se unen a antígeno pero no inducen aglutinación; estos anticuerpos, llamados anticuerpos incompletos, a menudo son de la clase IgG. A concentraciones altas de IgG, los anticuerpos incompletos pueden ocupar la mayor parte de los sitios antigénicos y bloquear así el acceso de la IgM, que es una buena aglutinina. Este efecto no se presenta con anticuerpos monoclonales aglutinantes.

La sensibilidad y la sencillez de las reacciones de aglutinación pueden extenderse a antígenos solubles con la técnica de hemaglutinación pasiva. En este método se preparan glóbulos rojos cubiertos con antígeno mediante la mezcla de un antígeno soluble con los eritrocitos que se trataron con ácido tánico o cloruro de cromo,

---

porque ambas sustancias promueven la adsorción del antígeno a la superficie de las células. El suero que contiene anticuerpo se diluye de manera seriada en fosos de una placa de microtítulos y luego se añaden glóbulos rojos recubiertos con antígeno a cada foso; la aglutinación se valora por el tamaño del patrón de diseminación característico de los glóbulos rojos aglutinados en el fondo del foso, igual que el patrón que se observa en las reacciones de aglutinación.<sup>2, 12, 14</sup>

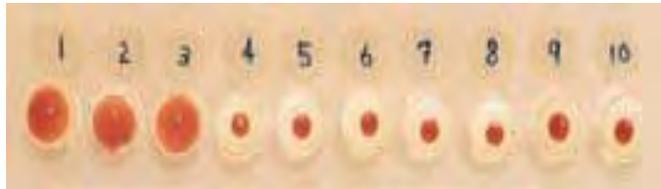


Figura 5. Reacción de hemaglutinación pasiva.<sup>2</sup>

### 3.6 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Cp) se sintetiza principalmente en hígado como una cadena polipeptídica simple y se secreta como una  $\alpha$  2-glicoproteína a nivel plasmático, pertenece a la familia de las multicuprooxidases, estas enzimas constituyen un grupo de proteínas evolutivamente conservado, se caracterizan desde el punto de vista estructural por presentar tres tipos de sitios de unión para el cobre con características espectroscópicas diferentes y, desde el punto de vista funcional, por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin la liberación de intermediarios potencialmente tóxicos ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ); su actividad oxidasa es inespecífica y participa en reacciones de oxidación de diversos sustratos orgánicos e inorgánicos *in vitro*, como por ejemplo:  $Fe^{2+}$ , bencidina, p-fenilendiamina, N,N'- dimetilfenilendiamina y otros, sin embargo, sólo el ión  $Fe^{2+}$  se considera un sustrato biológico para esta enzima. El hígado es la mayor fuente de Cp sérica y un aumento en el *pool* hepático de cobre resulta en un aumento sostenido en la concentración de Cp, mientras que en el suero de individuos que presentan deficiencia nutricional de este oligoelemento, se observa una disminución en la concentración de Cp circulante.

La ceruloplasmina es una proteína de color azul debido a su contenido de cobre y transporta el 90% de este metal presente en el plasma, con un peso de 132 kDa, punto isoeléctrico de 4.4, movilidad electroforética de 4.6; clasificada dentro de las proteínas de cinética de evolución lenta, ya que aumenta su concentración en un 50% sobre su nivel basal, alcanzando un pico detectable de 3-4 días, con una vida media de entre 3-6 días y retornando a la normalidad de 10 a 15 días; se sabe que la ceruloplasmina juega un papel de ferroxidasa que ayuda en la importación y exportación del hierro a través de la membrana celular, catalizando la conversión de hierro ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) a su forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ).

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 de hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de  $\text{Fe}^{+2}$  tóxico en  $\text{Fe}^{+3}$  no tóxico.

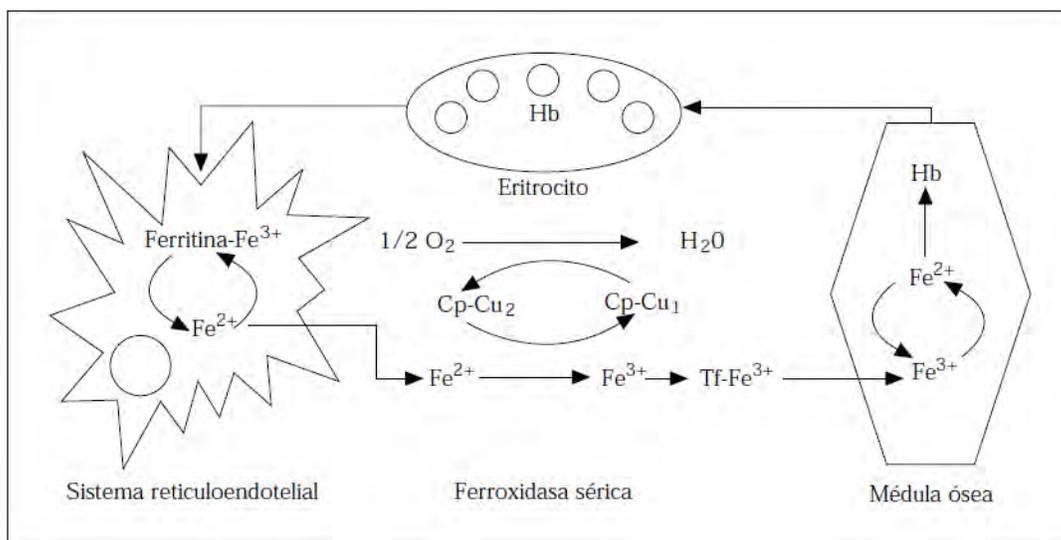


Figura 6. Papel de la ceruloplasmina como plasmferroxidasa<sup>17</sup>

La Cp es una proteína multifuncional; la función que la misma cumpla dependerá de los cambios en las condiciones fisiológicas y patológicas presentes en el organismo frente a una situación determinada, aunque su aumento después de procesos inflamatorios y traumáticos se usó para clasificarla como proteína de fase aguda, su función fisiológica puede ser amplia y variada, además de participar en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidantes frente a varias aminos; en circulación, la proteína se encuentra como apoceruloplasmina y holoceruloplasmina, la primera de estas formas corresponde a la enzima sin actividad, mientras que la segunda corresponde a la enzima activa, la incorporación de cobre en su estructura proteica promueve un cambio conformacional esencial desde la forma apo hacia la de holoenzima, la apoceruloplasmina contribuye aproximadamente en un 10% a la concentración proteica total de Cp en adultos presumiblemente sanos; esta proteína es abundante en suero pero no en la barrera hematoencefálica por lo que no es posible su detección directamente en el SNC, al haber gran cantidad de  $Fe^{+2}$  se incrementa el daño secundario y una disminución de la funcionalidad, originando una neurodegeneración; se ha encontrado que los niveles de Cp sérica y la actividad del cobre se incrementan en enfermedades autoinmunes o en las de daño celular, el transporte de cobre en los conductos biliares es interrumpido por el colapso de estos y por tanto el cobre se acumula en el hígado, así es probable que los niveles de Cp aumenten para metabolizar los acúmulos de cobre en el hígado, sin embargo, los niveles de Cp en suero no son significativos para diagnosticar enfermedades autoinmunes, pero si en cicatrización del hígado por ejemplo cuando se encuentra dañado por factores físicos, químicos o biológicos.<sup>18,</sup>

19

### 3.7 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso que se relaciona con la formación de radicales libres reactivos e inestables, mediante reacciones en cadena que causan la degradación de lípidos, en particular su acción es a nivel de la membrana celular; los peróxidos lipídicos alteran la estructura primaria de moléculas

---

endógenas por medio del entrecruzamiento y fragmentación de moléculas, este proceso se relaciona con diversas alteraciones patológicas como la inflamación, toxicidad hepática, trastornos vasculares y envejecimiento y es catalizada por enzimas o por mecanismos no enzimáticos (radiaciones, catalizados por metales). Todas las células están rodeadas por una membrana celular que las separa del medio extracelular; la membrana celular contiene enzimas, canales, receptores y antígenos que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y otros agentes reguladores del líquido extracelular, la estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva, éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres. De particular importancia son las reacciones mediadas por radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica, esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado ( $\text{R}\cdot$ ), este último reacciona con oxígeno para formar peróxidos cíclicos y radicales hidroperóxidos ( $\text{ROO}\cdot$ ) que propagan esta reacción en cadena; se forman igualmente radicales alcoxilicoslipofílicos ( $\text{RO}\cdot$ ); la peroxidación lipídica puede seguir propagándose en presencia de metales de transición ( $\text{Me}^{n+}$ ) existentes en el plasma, los que son catalizadores oxidativos. <sup>15</sup>

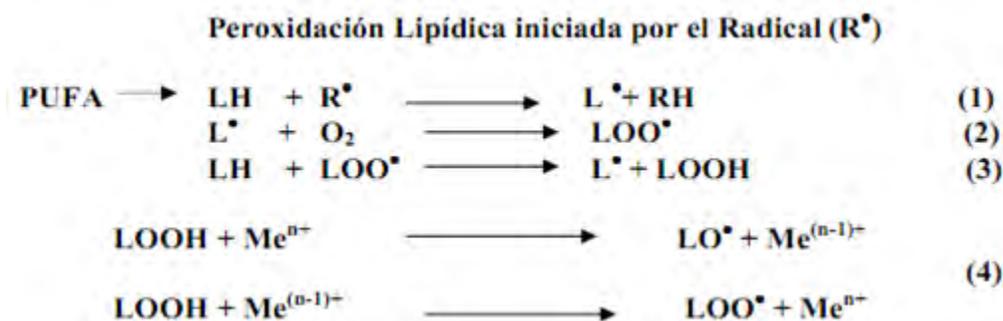


Figura 7. Representación de las reacciones de peroxidación Lipídica. <sup>15, 16</sup>

### 3.8 Proteínas totales y electroforesis

Tras un daño tisular (traumático, infeccioso, inflamatorio, etc.), el organismo lleva a cabo una serie de complejas reacciones que son:

- Aislar e inactivar el agente causal.
- Prevenir daño tisular.
- Activar los mecanismos de reparación necesarios para retornar a la normalidad.

El proceso llamado inflamación y las reacciones inmediatas que se llevan a cabo tras el daño tisular constituyen la respuesta de la fase aguda, que es desencadenada por la acción de varias citocinas sobre el SNC, las principales son la IL-1, IL-6 y TNF; estas citocinas son liberadas a partir del foco de inflamación y su concentración aumenta en el plasma, estos eventos provocan cambios en la síntesis de proteínas de fase aguda que aumentan en su nivel plasmático durante la inflamación; la síntesis de estas proteínas se lleva a cabo principalmente en el hígado, ya que los hepatocitos incrementan la biosíntesis de estas proteínas incrementando consecuentemente su concentración, por lo que son llamados reactantes positivos de fase aguda y a su vez los hepatocitos disminuyen la síntesis de otras proteínas llamadas reactantes negativos de fase aguda; entre las proteínas de fase aguda que son reactantes positivos tenemos la globulina alfa, que se dividen en los grupos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Dentro de las globulinas  $\alpha 2$  encontramos la ceruloplasmina, su síntesis es inducida por la acción de IL-6, por lo que es llamada proteína de fase aguda tipo 2.

Las proteínas son separadas en la electroforesis de zona casi exclusivamente sobre la base de su carga eléctrica superficial. El medio de sostén es en teoría inerte y no impide ni estimula el flujo de las moléculas en el campo eléctrico. Generalmente se utiliza tiras de acetato de celulosa; éstas tienen la ventaja de presentar mayor rapidez en la migración electroforética. De manera adicional el acetato de celulosa es transparente, pueden aplicarse microcantidades de proteínas y es adaptable a los procedimientos histoquímicos de tinción. En la técnica las muestras son colocadas en el origen y separadas por electroforesis durante 45 a 90 minutos, empleando soluciones amortiguadoras alcalinas. Entonces se tiñen las tiras para la búsqueda de proteínas y se separan en un densitómetro. En el densitómetro la tira teñida se pasa se pasa a través de un haz de luz. La absorción es variable debida a las concentraciones proteicas diferentes

---

y es descubierta por una celdilla fotoeléctrica, luego, reproducida por un registrador análogo como un trazo. La separación convierte la configuración de la banda proteica en picos y permite la determinación cuantitativa de los principales picos. El suero humano normal es separado en 5 principales bandas electroforéticas por este método, la albúmina,  $\alpha_1$ -globulina,  $\alpha_2$ -globulina,  $\beta$ -globulina y  $\gamma$ -globulina, en cambio, para ratones sólo se muestran típicamente cuatro bandas: albúmina, alfa, beta y gamma globulinas.<sup>20, 21</sup>

La albúmina sérica constituye la más abundante de las proteínas séricas, sin embargo, casi el 60% del total de la albúmina se localiza fisiológicamente en el espacio extravascular, se le ha asignado un papel como “reserva” de aminoácidos y desde luego destaca su participación en el transporte de numerosas moléculas, iones e incluso drogas: ácidos grasos, hormonas, metales, calcio, bilirrubina, triptófano, etc.

La disminución en la concentración sérica de albúmina o hipoalbuminemia es un dato de alteración notable en el metabolismo de proteínas. La hipoalbuminemia puede tener como origen una menor síntesis de la proteína o un aumento en su eliminación.<sup>21</sup>

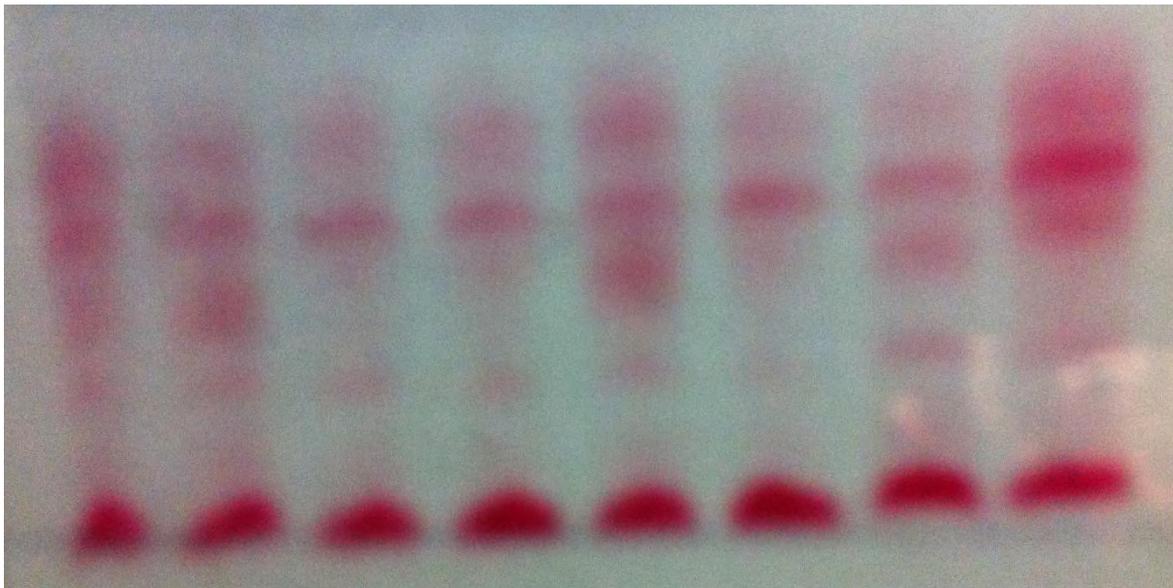


Figura 8. Placa de electroforesis en acetato de celulosa coloreada con rojo de Ponceau

Dado que se ha adjudicado de forma empírica al fruto maduro de noni un efecto sobre el sistema cardiovascular, es importante determinar algunos marcadores que proveen información tanto de cambios estructurales como de daño en el corazón, hígado o riñón, a continuación se explica el fundamento de estos indicadores.

### 3.9 Biomarcadores de daño orgánico

Un biomarcador es una prueba clínica de laboratorio que es útil para detectar la disfunción de un órgano. Los marcadores cardiacos se utilizan para detectar enfermedades cardiacas que pueden ser:

- a) Síndrome coronario agudo resultante de una isquemia miocárdica
- b) Falla cardiaca congestiva debido a disfunción ventricular

Los diferentes marcadores se usan para:

- I. Detectar isquemia miocárdica tempranamente
- II. Monitorear la progresión de la condición
- III. Predecir el riesgo de disfunción cardíaca

### **Creatinasa (CK)**

Los niveles de creatinasa son utilizados para el diagnóstico y tratamiento del infarto al miocardio o enfermedades del músculo esquelético como distrofia muscular del tipo Duchene.

La creatinasa es una enzima dimérica compuesta por dos subunidades: subunidad B (cerebro) y subunidad M (músculo). Como la forma activa es un dímero, sólo pueden existir tres diferentes parejas de subunidades: BB, MB y MM. El corazón es el único tejido que contiene cantidades significativas de CK-MB y su medida es considerada un indicador específico de daño del músculo cardiaco y por lo tanto es usado para el diagnóstico y monitoreo de infarto cardiaco.

### **Lactato deshidrogenasa (LDH-P)**

La actividad de la lactato deshidrogenasa está presente en todas las células del organismo y se presentan en el citoplasma de las células presentando una

---

concentración máxima en el músculo esquelético, el hígado, el corazón, el riñón y los glóbulos rojos.

Un aumento de la actividad de la LDH se produce en las enfermedades hepáticas tales como la hepatitis viral aguda, la cirrosis y el carcinoma metastásico, las enfermedades cardíacas tales como infarto al miocardio y tumores de pulmón o riñón.

Dado que la LDH no es una enzima específica de tejido, la determinación de sus isoenzimas resulta importante para el diagnóstico diferencial.<sup>23 - 25</sup>

Se han encontrado vestigios en zonas arqueológicas de los continentes asiático y americano que demuestran que la herbolaria es una ciencia que se ha practicado en América desde hace 3000 o 4000 años y en Asia desde hace un poco más, en estos territorios se encuentra la mayor diversidad tanto animal como vegetal de todo el planeta, por esta razón no es raro encontrar millones de remedios naturales basados principalmente en plantas.<sup>26</sup>

### 3.10 Herbolaria en México

La curación con hierbas es una práctica muy expandida en México, dada la gran variedad de flora en el país, se han desarrollado remedios tradicionales para el tratamiento de los síntomas que se presentan en las enfermedades más comunes por ejemplo la tos, el dolor abdominal o la inflamación.<sup>27</sup> Existen plantas que son conocidas en toda la república por sus propiedades curativas, como el té de tila para calmar los nervios, la manzanilla para el dolor abdominal o algunas otras infusiones de plantas. Pero también se han importado varias plantas de otros lugares del mundo, por ejemplo el *Ginkgo biloba* o el *Ginseng* que presuntamente favorecen la longevidad o son poderosos antioxidantes.

Con el aumento de la prevalencia en la población mexicana de enfermedades autoinmunes como el cáncer y la comercialización en auge de productos milagro como “el jugo de noni” se hace necesario comprobar la eficacia e inocuidad de este tipo de suplementos alimenticios que prometen protección contra diversas enfermedades de muy variadas etiologías.<sup>27, 28</sup>

---

### 3.10.1 Descripción de la planta: *Morinda citrifolia* L.

El noni es el nombre Hawaiano que recibe la fruta de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). El noni es originario de la región comprendida desde el sureste asiático hasta Australia y se cultiva en Polinesia, India, el Caribe, México, América Central y la parte sur de América del Sur. Los polinesios han usado durante más de 2000 años la planta de noni con propósitos alimenticios y medicinales. En la farmacopea tradicional, la fruta es recomendada para prevenir y curar diversas enfermedades; principalmente se usa para estimular el sistema inmune y de esa forma combatir bacterias, virus, parásitos e infecciones fúngicas, así como para prevenir la formación y proliferación de tumores, incluyendo algunos de tipo maligno. El fruto del noni se consume principalmente en forma de jugo, aunque también se pueden utilizar las hojas, flores, corteza y raíz de la planta.

En México el principal estado productor de noni es Nayarit, con una superficie de 28 hectáreas y una producción de 204 toneladas.<sup>29, 30, 31</sup>

El género *Morinda* (Rubiaceae), que incluye la especie de *Morinda citrifolia* L., está formado por alrededor de 80 especies. *Morinda citrifolia* L. es un arbusto o árbol pequeño, de 3 a 10 m de altura, con abundantes hojas anchas elípticas (5-17 cm de largo, 10 a 40 cm de ancho). Sus flores aromáticas están dispuestas en cabezuelas globosas, con el cáliz truncado y la corola tubular de color blanco. El fruto de noni (3-10 cm largo, 3-6 cm de ancho) es oval, su color varía de verde a amarillo hasta casi blanco al momento de su recolección, con una cáscara cubierta de pequeñas protuberancias, cada una de las cuales contiene una semilla. El fruto maduro despiden un fuerte olor a rancio semejante al del ácido butírico; la pulpa es jugosa y amarga, de color amarillo opaco o blanco y aspecto gelatinoso, presentando numerosas cavidades triangulares de color marrón rojizo los cuales contienen cuatro semillas.<sup>32, 33</sup>



Figura 9. Frutos maduros de *Morinda citrifolia* L.<sup>29</sup>

#### 4. Planteamiento del problema

La curación con hierbas es una práctica muy expandida en México, y debido a la gran diversidad de flora en el país se han desarrollado remedios herbolarios que se aplican comúnmente, por ejemplo, infusiones de manzanilla o tila.

También se importan remedios y plantas curativas de otras partes del mundo, como *Ginkgo biloba* y *Ginseng* de Asia, que se han hecho famosos por sus propiedades antioxidantes y favorecedoras de vitalidad y longevidad para sus consumidores.

Otro remedio muy conocido y que se ha puesto de moda es el consumo de frutos de *Morinda citrifolia* L., que es comercializado principalmente como “jugo de noni”, al que se le atribuyen efectos antioxidante, analgésico, antiinflamatorio, antibacteriano, antiviral, antitumoral, inmuno-regulador, hipotensor, antihelmíntico

e insecticida, entre otros. Actualmente no se han reportado estudios encaminados a evaluar el efecto que el extracto acuoso de frutos de noni produce sobre el sistema inmunitario en modelos *in vivo*.

Con el aumento de la prevalencia en la población mexicana de enfermedades autoinmunes como el cáncer y la comercialización en auge de productos milagro como “el jugo de noni”, además, de otras presentaciones del mismo extracto en forma de polvos y cápsulas como suplementos dietéticos, limpiadores faciales, geles de baño, jabones y otros productos empleados en la cosmética se hace necesario comprobar la eficacia e inocuidad de este tipo de productos que prometen protección contra diversas enfermedades de muy variadas etiologías.<sup>34,</sup>

38

Desde hace varios cientos de años se ha consumido el jugo del fruto noni en Asia Sudoriental y se han reportado más de 40 remedios herbolarios que contienen ya sean tallos, hojas, flores o frutos de *Morinda citrifolia* L.<sup>35</sup>, se dice que el efecto inmuno-regulador de noni se presenta principalmente en los frutos maduros, sin embargo estos efectos no se ha comprobado del todo, por lo cual se plantea la siguiente pregunta: ¿Presentará el extracto acuoso de frutos de *M. citrifolia* L. un efecto sobre el sistema inmune en un modelo de ratones CD1?

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que el extracto acuoso del fruto de noni (*Morinda citrifolia L.*) ejerce en el sistema inmune, utilizando un modelo in vivo en ratones CD1 mediante la aplicación de pruebas celulares y humorales.

### 5.2 Objetivos específicos

- Aplicar las técnicas de Jerne y hemaglutinación en grupos de ratones CD1 tratados y testigos para cuantificar la producción de anticuerpos.

- Determinar cambios en los niveles de proteínas en los grupos de ratones mediante la cuantificación de proteínas séricas totales y la técnica de electroforesis de proteínas en acetato de celulosa.
- Calcular índices renal, esplénico, cardíaco y hepático de cada animal para determinar cambios orgánicos.
- Cuantificar biomarcadores de daño orgánico como ceruloplasmina, CK, CK-MB y HLD-P para determinar inocuidad y seguridad del extracto.

## 6. Hipótesis

De acuerdo con antecedentes teóricos y empíricos que sugieren que el jugo de frutos de noni es capaz de ejercer un efecto regulador sobre el sistema inmunitario, la administración de un extracto acuoso de *Morinda citrifolia L.* a un grupo de ratones CD1 durante un periodo determinado producirá cambios en parámetros inmunológicos como hemaglutinación, cuantificación de células productoras de anticuerpos y niveles de proteínas séricas.

## 7. Diseño experimental

### 7.1 Tipo de estudio

Experimental

### 7.2 Población de estudio

Ratones CD1, machos, de entre 35 y 50 g. de peso.

### 7.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterio de inclusión: Animales que sean machos y que estén dentro del rango de peso preestablecido.

Criterio de exclusión: Animales enfermos.

Criterios de eliminación: Muerte del animal.

#### 7.4 Variables

Independiente: tratamiento al que esté sometido el grupo (solución salina para testigos y extracto acuoso de noni 50 mg/Kg de peso para tratados).

Dependiente: Resultados obtenidos de las pruebas de hemaglutinación, ceruloplasmina, cuantificación de células formadoras de placa, cuantificación de proteínas séricas totales, electroforesis, enzimas cardiacas y cálculo de índices orgánicos de cada uno de los animales de experimentación.

#### 7.5 Material, instrumentos y equipo

- Material.

- Tubos Eppendorf
  - Vasos de precipitados de 50mL
  - Tubos de ensayo 13 X 100 mm
  - Tubos de ensayo 15 X 180 mm
  - Cajas Petri de vidrio chicas
  - Caja Falcon
  - Gradillas
  - Mechero Fisher
  - Termómetro
  - Estuche de disección
  - Pipeta Pasteur
  - Pipeta graduada 1, 2, 5 y 10 mL
-

- Papel parafilm
- Matraz aforado 1000 mL
- Celdas para espectrofotómetro
- Navaja de disección estéril
- Buffer de alta resolución Electra® HRBuffer. Helena Laboratories Tris-Barbital-sodiumbarbital pH= 8.6-9.0
- Tiras de acetato de celulosa Sepraphore® III 2.25" X 5.68". Gelman Instrument Company.
- Cloruro de sodio. Mallinckrodt Chemical Works.
- TMP. Tetramethoxypropane 99 %. Aldrich®.
- 1-butanol. J.T. Baker®.
- Agarosa No. A-6013. Sigma®.
- Azida de sodio. Beaker®.

#### **Equipo.**

- Balanza analítica (Explorer Pro Ohaus)
  - Refrigerador(Mabe)
  - Congelador(Tor-rey)
  - Agitador rocker (rocker Platform Bellco Glass)
  - Agitador Vórtex (MIXER Scientific industries)
  - Baño María (Precision)
  - Báscula para animales(TecnoCor)
  - Centrífuga para Eppendorf (HERMLE Z 233 M-2)
  - Centrífuga (Hamilton Bell)
  - Espectrofotómetro (JENWAY 6305 UV/VIS)
  - Estufa (ShellLab)
  - Micro pipeta 5-40 µL
  - Micro pipeta 10-100 µL
  - Micro pipeta 100-1000µL
  - Cámara de Electroforesis (Sepratek® No. 51156. Gelman Sciences).
-

- Fuente de poder (BRL Model 500 Life Technologies Inc).
- Aplicador de 8 muestras para Sepratek®. (Gelman Sciences Inc).

## 7.6 Métodos

- **Obtención del extracto acuoso:**

Se separaron los frutos de *Morinda citrifolia L.* de las hojas, las ramas y tallos, éstos se licuaron con agua purificada y la mezcla se dejó reposar durante 24 horas, esta mezcla se filtró, primero a través de una gasa y luego al vacío. El extracto se obtuvo con ayuda de un rotavapor a 50°C y vacío durante 5 días, prácticamente hasta sequedad, luego el matraz que contenía el extracto se colocó dentro de una estufa para eliminar el agua casi por completo y así se obtuvo una pasta semisólida que sirvió para preparar las soluciones de prueba que se administraron a los animales.

- **Preparación de los animales:**

Se separaron en dos grupos de 16 ratones (de entre 35 y 50 g de peso) cada uno, al primero, el grupo tratado se le administró 50mg/kg de peso de una solución preparada con el extracto de *M. citrifolia L.*, al segundo, el grupo testigo se le administró con 0.2 mL de solución salina fisiológica por vía oral con ayuda de una cánula intra-gástrica, diariamente y a la misma hora, durante 34 días.

- **Técnica de Jerne:**

Después de 21 días de administración oral del extracto acuoso de noni (50mg/Kg), se sensibilizó a todos los ratones por vía intraperitoneal con 0.2 mL de una suspensión al 10% de glóbulos rojos de carnero, utilizando una jeringa tipo tuberculina, cinco días después de la sensibilización, se sacrificaron los animales

---

mediante dislocación cerebral para obtener muestras de sangre de cada individuo en estudio. La sangre se centrifugó y se obtuvo el suero de cada uno de los animales, además se extrajo el hígado, corazón, riñones y bazo, éste último se colocó en una caja Petri chica de vidrio y se agregaron 4 mL de MEM (medio mínimo esencial de Eagle). Se separaron las células del estroma del bazo con ayuda de un colador de malla fina y un tubo de ensayo de 13x100mm, luego se colectaron las células con ayuda de una pipeta Pasteur en un tubo de ensayo limpio y se dejó sedimentar un minuto, luego se transfirió el sobrenadante de células a un segundo tubo.

De éste último tubo se realizaron diluciones 1:20 y 1:30 en MEM y se colocaron alícuotas de 0.1 mL de las diluciones de las células, en tubos que contenían 2 mL de agarosa al 0.6%, en MEM y se habían mantenido en baño María a 45° C, también se adicionaron 0.2 mL de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10%, cada tubo se mezcló rápido en un Vórtex y se vació en cajas de Petri chicas, que se dejaron solidificar sin mover durante 10 minutos.

Se incubaron las placas a 37° C por 45 minutos y una vez transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada placa 2 mL de complemento de cobayo fresco diluido 1:10 en MEM. De nuevo se incubaron las placas a 37° C por 30 minutos más; una vez cumplido el tiempo se desechó el complemento diluido y se sustituyó por 2 mL de MEM frío para detener la reacción.

Se contó el número de células formadoras de placa y se realizó un cálculo para reportarlas por bazo.

- **Hemaglutinación:**

Se colocaron 50 µL de PBS en cada uno de los pozos de una placa de microtitulación. Con un dilutor de 50µL, el cual fue flameado al rojo vivo como si fuera un asa de siembra se tomaron 10 µL de suero de cada ratón y se mezclaron con 90 µL de PBS, de ésta mezcla se tomaron 50 µL y se colocaron en el pozo número 1 y se pipeteó 10 veces la mezcla para homogeneizar antes de pasar una alícuota de 50 µL al siguiente pozo, así se obtuvo una serie de 7 diluciones y al final, se dejó un pozo como testigo negativo de la prueba. Después se agregaron

---

50 µL de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 1% mezclando bien. Luego, la placa se incubó a 37°C por una hora y transcurrido este tiempo se leyó el título de aglutinación. Los títulos se reportaron como la inversa de la dilución.

- **Cuantificación de proteínas totales:**

Solución A: se colocaron 2.0 g de carbonato de sodio en 100 mL de NaOH al 0.4%. Solución B<sub>1</sub>: se pesó 1.0 g de tartrato de sodio y potasio y se disolvió en 50 mL de agua. Solución B<sub>2</sub>: se pesó 0.5 g de CuSO<sub>4</sub> y se disolvió en 50 mL de agua destilada. La solución de trabajo C se preparó colocando 50 mL de solución A, 0.5 mL de solución B<sub>1</sub> y 0.5 mL de solución B<sub>2</sub>. En un tubo de ensayo se colocó 0.1 mL de muestra de suero, se agregó 0.8 mL de agua destilada y 3 mL de la solución C, se mezcló durante 5 segundos en un Vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se agregó 0.1 mL de Folin Cioateau y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro utilizando como patrón una solución de doscientos microgramos de albúmina de huevo por mililitro.

- **Electroforesis de proteínas séricas en acetato de celulosa:**

Se humedeció una tira de acetato de celulosa en el buffer de alta resolución que contiene el kit Sepratek<sup>®</sup> que se utilizó para el ensayo. Se sacó la tira del recipiente que contenía el buffer con ayuda de unas pinzas y se eliminó el exceso de humedad colocando la tira entre dos capas de papel filtro. Se colocó la tira de acetato de celulosa en la cámara de electroforesis y se aplicaron las muestras con ayuda del aplicador especial para esta operación.

Se conectaron los electrodos, se prendió la fuente de poder y se dejó correr durante 25 minutos a 200 volts. Transcurrido este tiempo, se apagó la fuente de poder, se desconectaron los electrodos y se desmontó la tira de acetato de celulosa.

La tira se colocó en el colorante rojo de Ponceau al 5% durante diez minutos para revelar, después se pasó a una solución de ácido acético al 5% para decolorarla hasta que se observaron las bandas sobre un fondo blanco, utilizando varios

recipientes que contenían esta solución. Después la tira se colocó durante 5 minutos en una solución clarificadora de N-metilpirrolidona al 40%.

La tira se colocó sobre un vidrio libre de grasa y se secó hasta que se tornó transparente y no pegajosa, con ayuda de una secadora de cabello. Se dejó reposar unas horas y se despegó del vidrio, para después ser almacenada hasta su posterior interpretación en un densitómetro.

- **Cálculo de índices orgánicos:**

Antes del sacrificio se pesó a cada ratón, luego, se pesó en una balanza analítica cada órgano diseccionado de cada animal (bazo, corazón, hígado y ambos riñones juntos), registrando hasta la cuarta cifra después del punto decimal.

Se aplicó la siguiente fórmula para determinar el índice de los órganos:

$$\text{Índice del órgano} = (W_{\text{órgano}} (\text{g}) / W_{\text{ratón}} (\text{g})) * 100$$

- **Determinación de ceruloplasmina:**

Se colocaron seis tubos de ensayo en una tina de baño María a 45°C.

**Preparación de las placas.** Se preparó agarosa al 1%, pesando 0.2 g de ésta y disolviendo en 20 mL de PBS, se dejó reposar a temperatura ambiente por 20 minutos.

Posteriormente se sometió a tres ciclos de 10 segundos cada uno, en el horno de microondas, enseguida se agregó 1 mg de azida de sodio. Se colocaron 2 mL de la agarosa preparada en cada uno de los tubos de ensayo, y a cada tubo se le agregaron 150 µL de suero de conejo anti ceruloplasmina, cada tubo se mezcló en un Vórtex durante 10 segundos.

El contenido de cada tubo se vertió en cada uno de los círculos de la caja Falcon y se dejó gelificar por 4 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se le realizaron cuatro orificios pequeños en sentido de las manecillas del reloj a cada círculo de la caja Falcon.

**Procesamiento de la muestra.** Se colocaron 5  $\mu$ L de cada muestra en los orificios de la placa, los cuales fueron numerados de acuerdo a cada muestra. La placa se mantuvo en refrigeración durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, se midió el halo de precipitación en milímetros de cada uno de los pozos y se calculó la concentración de éstos, tomando como referencia una concentración de 21.6 mg/dL de ceruloplasmina con un halo de precipitación de 4 mm de diámetro.

- **Determinación de peroxidación lipídica. Método de TBA (ácido tiobarbitúrico):**

Colectadas las muestras de 100  $\mu$ L de suero de cada ratón en tubos Eppendorf, cada muestra se diluyó con 400  $\mu$ L de PBS. Se les agregaron 50  $\mu$ L de BHT 12.6 nM y 400  $\mu$ L de ácido ortofosfórico 0.2 M. Se mezclaron en Vórtex durante 10 segundos y posteriormente se le adicionaron 50  $\mu$ L de TBA 0.11 M y nuevamente se mezclaron en el Vórtex durante 10 segundos.

**Determinación de color.** Se colocaron las muestras con reactivos en un baño de agua a 90°C en tubos tapados con papel aluminio durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se colocaron en un baño de hielo y se les agregaron 1000  $\mu$ L de n-butanol y 100  $\mu$ L de NaCl solución saturada a cada tubo.

Después se agitaron en Vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos.

Posteriormente se transfirieron 500  $\mu$ L de la fase butanólica a una celda, y se realizará la lectura de cada muestra en un espectrofotómetro a 535 nm y a 572 nm para corregir la absorbancia. Se realizó una curva estándar como se muestra en el cuadro:

---

<b>Tubo</b>	<b>TMP</b>	<b>H3PO4</b>	<b>TBA</b>	<b>Agua</b>	<b>MDA</b>	<b>Abs.</b>
-------------	------------	--------------	------------	-------------	------------	-------------

---

	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ mol/L)	( $\mu$ mol/L)
Blanco	0	600	200	200	0.0	0.0
1	5	600	200	195	0.2	0.023
2	10	600	200	190	0.4	0.285
3	20	600	200	180	0.8	0.535
4	30	600	200	170	1.2	0.743
5	50	600	200	150	2.0	1.21
6	70	600	200	130	2.8	1.49
7	100	600	200	100	4.0	1.947

Cuadro 1. Construcción de la curva de calibración para peroxidación lipídica por el método de MDA.

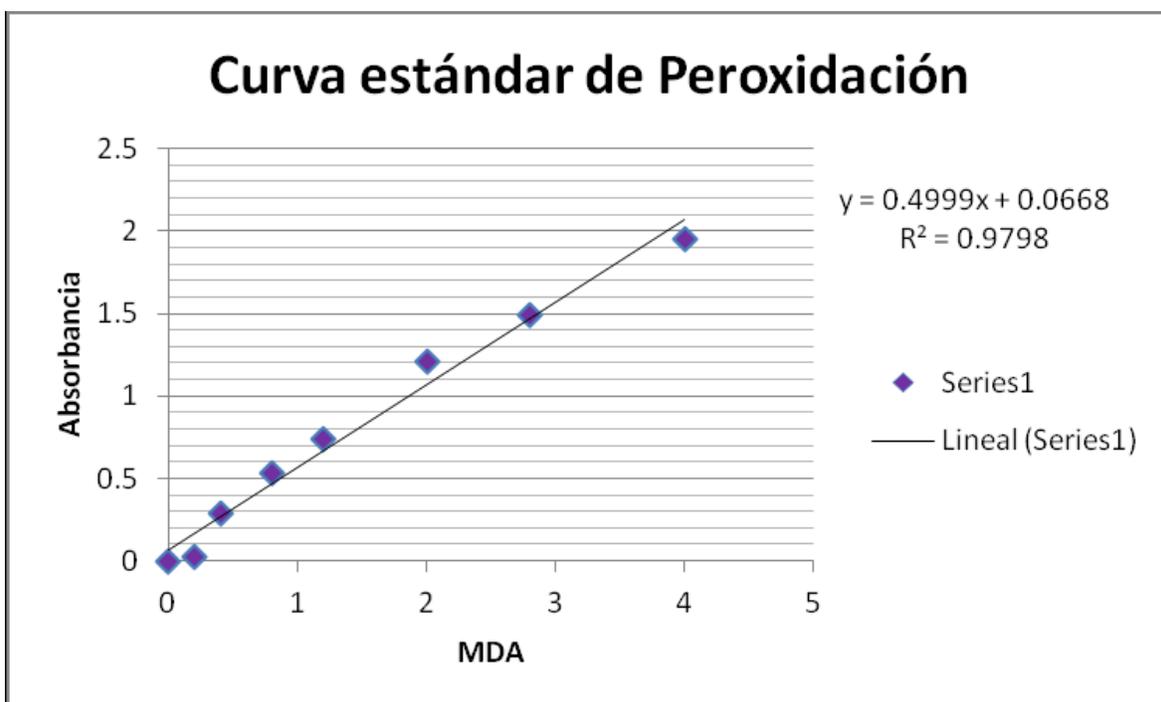


Figura 10. Curva estándar de peroxidación Lipídica (MDA).

### 7.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por t de Student utilizando el programa estadístico SPSS para ambiente de Windows versión 20 con un nivel de significancia al 95%.

## 8. Resultados

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas que se aplicaron para cuantificar anticuerpos en los ratones. Se encontró una disminución en la cantidad de células productoras de anticuerpos por bazo cuando se aplicó la técnica de Jerne después de 26 días de tratamiento.

Se observa un aumento en el tamaño del bazo con respecto al peso total de cada ratón después de 34 días de tratamiento con extracto acuoso de frutos de noni.

En el cuadro 2 se muestran los niveles de proteínas séricas totales después de 26 y 34 días de tratamiento con extracto de *Morinda citrifolia* L. donde se puede observar un aumento significativo de proteínas séricas. Para analizar los resultados de electroforesis se procesaron las imágenes obtenidas de las tiras de acetato de celulosa con el programa ImageJ® y se aplicó una prueba t de Student para muestras independientes en el paquete estadístico SPSS® versión 20 y los resultados arrojan que para alfa-globulina se obtuvo un aumento al final del tratamiento, mientras que para la gamma-globulina se obtuvo una disminución después de 34 días de administrar el extracto acuoso de noni y no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para albúmina y gamma-globulina en los grupos tratados y testigos, ya que para ambas variables se obtuvo una  $p > 0.05$ .

---

En el cuadro 3 se muestran los índices cardíaco, renal y hepático calculados para cada grupo de ratones después de 26 y 34 días de tratamiento, además de los niveles de enzimas cardíacas y ceruloplasmina como biomarcadores de daño al hígado, riñón y corazón. No se obtuvieron diferencias significativas cuando se compararon contra el grupo de ratones testigo, salvo un aumento en la masa cardíaca después de 26 días de administrar diariamente el extracto de noni.

Cuadro 1. Resultados de pruebas para cuantificar anticuerpos después de 26 y 34 días de tratamiento.

	26 días		34 días	
	Extracto de noni	Solución salina	Extracto de noni	Solución salina
	N=7	N=8	N=8	N=8
CFP/ bazo	18228 ± 47690*	36000 ± 4339		
Hemaglutinación	125 ± 34	130±14	125±16	200±37
Índice esplénico	0.38±0.07	0.48 ± 0.03	0.47±0.04	0.36 ± 0.03*

Los valores corresponden a media ± desviación estándar

\*Prueba t de Student para muestras independientes. La diferencia de medias es significativa  $p < 0.05$ .

Cuadro 2. Niveles de proteínas séricas totales e inmunoproteínas después de 26 y 34 días de tratamiento.

	26 días		34 días	
	Extracto de noni	Solución salina	Extracto de noni	Solución salina
	N=7	N=8	N=8	N=8
Proteínas totales	10974 ± 598	10369±364	11721 ± 408	9886 ± 219*
α-globulina			14± 2*	8±1

$\beta$ -globulina	38 $\pm$ 2	36 $\pm$ 0.6
$\gamma$ -globulina	17 $\pm$ 1*	22 $\pm$ 1
Albúmina	31 $\pm$ 3	33 $\pm$ 1

Los valores corresponden a media  $\pm$  desviación estándar

\*La diferencia de medias es significativa a  $p < 0.05$

Cuadro 3. Índices y marcadores de daño orgánico.

	26 días		34 días	
	Extracto de noni	Solución salina	Extracto de noni	Solución salina
	N=7	N=8	N=8	N=8
Índice renal	1 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.06	1 $\pm$ 0.04	2 $\pm$ 0.05
Índice hepático	6 $\pm$ 0.1	6 $\pm$ 0.2	6 $\pm$ 0.05	6 $\pm$ 0.1
Índice cardiaco	0.5 $\pm$ 0.02*	0.4 $\pm$ 0.01	0.6 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.03
CK	224 $\pm$ 77	347 $\pm$ 127	344 $\pm$ 124	285 $\pm$ 70
CK-MB	127 $\pm$ 17	143 $\pm$ 28	127 $\pm$ 24	138 $\pm$ 13
LDH-P	2589 $\pm$ 77	347 $\pm$ 127	1956 $\pm$ 244	1881 $\pm$ 149
Ceruloplasmina	36 $\pm$ 2	35 $\pm$ 4	32 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3
Peroxidación Lipídica	391 $\pm$ 96	440 $\pm$ 97	135 $\pm$ 100	274 $\pm$ 56

Los valores corresponden a media  $\pm$  desviación estándar

\*La diferencia de medias es significativa a  $p < 0.05$

## 9. Análisis de Resultados

Después de 26 días de tratamiento con extracto acuoso de frutos de noni (*Morinda citrifolia* L.) se observó que la administración diaria produjo una disminución en el conteo de células productoras de anticuerpos con respecto al grupo de animales a los que sólo se les administró solución salina isotónica, es decir, que el número de células que producen inmunoglobulinas del tipo M se vio significativamente reducido ( $p=0.016$ ). Estos resultados sugieren la capacidad de los componentes del fruto para regular el sistema inmunitario de los ratones, al menos desde el punto de vista celular, produciendo un declive significativo en la cantidad de células capaces de producir IgM en el bazo y, así atenuar la capacidad de respuesta del sistema inmunitario.

Como se analizaron los datos obtenidos de la prueba de hemaglutinación pasiva después de 26 y 34 días de tratamiento con el extracto y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, puede suponerse que la administración del extracto no produjo cambios en la cantidad de anticuerpos generados por el organismo respecto a los que se generan normalmente en un grupo de ratones testigo.

Después de 26 días se observa también un aumento significativo en el índice esplénico promedio del grupo de ratones tratados con extracto acuoso de noni, es decir, un crecimiento en masa de uno de los ganglios más importantes del sistema inmune que puede deberse a un cambio orgánico que generalmente implica daño

---

al tejido o bien, aumento en la producción de anticuerpos; tomando en cuenta las otras pruebas (CFP y hemaglutinación) es más probable que se trate de un cambio orgánico de adaptación a los componentes del extracto que a una potenciación del sistema inmune.

Para proteínas totales después de 34 días de tratamiento se encuentra un aumento en los niveles séricos si se compara con los obtenidos para el grupo de ratones testigo con  $p= 0.001$ , así que puede sugerirse que la administración del extracto produce un aumento en la respuesta inmunitaria humoral, al menos aumentando el número de anticuerpos que circulan por la sangre.

Con el análisis de los electroferogramas fue posible determinar que se produjo una alteración de los niveles de alfa y gamma globulinas de los ratones tratados con extracto de frutos de noni, en el caso de  $\alpha$ -globulina se presentó una disminución comparando con el nivel que presentan los animales que sólo fueron tratados con solución salina, en cambio, para  $\gamma$ -globulina se encontró que la administración del extracto durante 34 días produjo un aumento significativo en los niveles de esta proteína, lo que indica un aumento en los niveles de inmunoglobulinas séricas o anticuerpos, es decir, mayor cantidad de células de defensa en el organismo.

Para albúmina y  $\beta$ -globulina, las otras dos bandas características para ratones no se encontraron diferencias significativas en la cantidad presente en suero de los animales tratados con solución salina isotónica y los que recibieron el extracto de noni.

Se observó que para los ratones que fueron administrados con el extracto acuoso en estudio se obtuvo un aumento en el promedio de los índices cardiacos calculados para cada animal, si se compara con la media calculada para los ratones del grupo testigo después de 26 días de tratamiento. La cardiomegalia puede presentarse por varias causas, entre ellas, infarto al miocardio, por esta razón se realizaron cuantificaciones de tres biomarcadores cardiacos indicativos de enfermedades cardiacas e infartos (CK, CKMB y LDH), pero no se obtuvieron

---

diferencias significativas cuando se compararon contra los niveles de los ratones testigos.

Después de 34 días de tratamiento no se observó este aumento en el tamaño cardíaco en los ratones tratados, así que el crecimiento inicial podría atribuirse a un periodo de adaptación del corazón y su funcionamiento a los cambios que los componentes del fruto de noni producen en otras zonas del organismo del ratón que reflejan su efecto en la función cardíaca. Además, el hecho de que los marcadores séricos de daño cardíaco no se elevaran sugiere que el uso del extracto no causa daño tisular a este órgano.

Así mismo, no se observan diferencias significativas para los índices renal y hepático calculados para cada grupo de estudio, y es posible tomar estos datos para proponer que el extracto no resulta tóxico al ser administrado al menos por un mes, pues no hay crecimiento renal o hepático que sugieran daño en estos órganos vitales que generalmente son los que muestran los primeros signos cuando se presenta algún tipo de intoxicación en el organismo.

Esta idea puede apoyarse en el hecho de que marcadores de daño como ceruloplasmina, peroxidación lipídica y LDH-P no muestran cambios en sus niveles después de 26 y 34 días de tratamiento con el extracto si se comparan con los niveles obtenidos en el grupo de testigos.

Con estos datos es posible sugerir que el extracto no presenta algún tipo de toxicidad en el organismo de los ratones CD1 que fueron tratados durante poco más de un mes con el extracto acuoso de frutos de noni.

En el análisis estadístico no se observa diferencia significativa entre el peso corporal de los ratones en tratamiento con extracto acuoso de noni y los ratones que sólo recibieron solución salina, así que puede deducirse que el extracto de frutos de *Morinda citrifolia L.* no produce cambios en la masa corporal.

## 10. Conclusiones

Se evaluó el efecto inmuno-regulador del extracto acuoso del fruto de noni (*Morinda citrifolia L.*) en un modelo *in vivo* en ratones CD1 y si se administra al menos por 34 días el extracto produce un aumento significativo en los componentes humorales de la respuesta inmune, más no en la fracción celular que interviene en la reacción de defensa del organismo.

No se muestran indicios que sugieran que el extracto acuoso de frutos de noni presenta toxicidad.

## 11. Perspectivas

Los resultados del estudio justifican:

Diseñar un ensayo aplicando pruebas más específicas para cada tipo de inmunoglobulina que permita determinar con mayor precisión qué tipo de células afecta y así el mecanismo con que actúan los componentes del extracto.

Diseñar un ensayo utilizando más grupos de ratones, donde se administren al menos tres diferentes dosis para determinar la mínima efectiva y la dosis letal.

Diseñar un ensayo que sólo tenga como objetivo evaluar la seguridad de los componentes del extracto.

## 12. Referencias

1. Roitt I Brostoff J Male DK. Inmunología. 4ª ed. Madrid: Harcourt Brace; 2003.
2. Kuby J. Inmunología. 3ª ed. Nueva York: Ed. Freeman & Co.; 2000.
3. Regueiro JR. Inmunología, biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2008.
4. Golsby R Kindt T Osborne B. Inmunología clínica. 6ª ed. México: Mc Graw Hill; 2007.
5. Abbas AK Lichtman AJ Pober J. Inmunología celular y molecular. 3ª ed. Madrid: Ed. Interamericana-Mc Graw Hill; 1999.
6. Arce JC. Anticuerpos monoclonales específicos de inmunoglobulina G canina: caracterización y aplicación en inmunoensayos. Universidad de Córdoba: 2001. [Consultado 13 Septiembre 2013]. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/305>
7. Rojas W. Inmunología básica. 13ª ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2004.

8. Tristram G Parslow DP Stites. Inmunología básica y clínica. 10<sup>a</sup> ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2002.
9. Recavarren AS. Gastritis Crónicas atróficas: Mecanismos patogénicos por hipersensibilidad celular. Revista de Gastroenterología de Perú [Serie en internet] 2002. [consultado 17 Julio 2013]; 22(3). Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol\\_22n3/images/pag203\\_fig3g.jpg&w=600&h=369&ei=m5D8UI2NLcXZ2QXbh4G4Cw&zoom=1&iact=rc&dur=31&sig=117218400057564660817&page=1&tbnh=142&tbnw=231&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:11,s:0,i:178&tx=81&ty=75](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol_22n3/images/pag203_fig3g.jpg&w=600&h=369&ei=m5D8UI2NLcXZ2QXbh4G4Cw&zoom=1&iact=rc&dur=31&sig=117218400057564660817&page=1&tbnh=142&tbnw=231&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:11,s:0,i:178&tx=81&ty=75)
10. Escobar V Loreto A. Distribución de las poblaciones de linfocitos y macrófagos en nódulo linfático mandibular y bazo de cerdos inoculados con el VPPC. Chillan 2001; [consultado 20 Septiembre 2013]. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=027457>
11. Ramis A Ramos J. Estudio Histoquímico e Immunohistoquímico del Tejido Linfoide Porcino: Ganglio Linfático, Bazo y Timo. Anatomía, histología, embriología 2007; 20(2) 154-168.
12. Rojas EO. Inmunología (de memoria). 3<sup>a</sup> ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2006. [consultado 15 Junio 2013]. Disponible en: <http://books.google.com.mx/books?id=CtWACreo-BkC&pg=PA143&lpg=PA143&dq=tecnica+de+jerne&source=bl&ots=Yi287CA1th&sig=z16nAv1iMRPsQGZMHierlQjRsKE&hl=es&sa=X&ei=9YbcUePnAYj8qwGYq4GQBw&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=tecnica%20de%20jerne&f=false>

13. Wesley AJ. Principios de inmunología. México: Editorial Reverté SA; 2005.
14. Pasqualini CD. Entretelones del invento de los anticuerpos monoclonales. Revista de Medicina Argentina (Buenos Aires) 2008 68(6). [consultado 10 septiembre 2013]. Disponible en [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802008000600014](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802008000600014)
15. Munck A Guyre PM. Glucocorticoids and immune function In: Ader R Felten DL Cohen N. Psychoneuroimmunology. 2ªed. New York: Academic Press; 1991.
16. Felten DL. Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural immune signaling. ProgBrain Res. 2000; 16(47): 35-38.
17. Hartgers FC Figdor CG. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. ImmunologyToday 2000; 21(12):542-545.
18. Felten SY Olschowka JA. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH) - positive nerve terminals form synaptic-like contacts on lymphocytes in the splenic white pulp. J Neurosci Res 1987; 18(14): 37-48
19. Guevara I Iwanejko J DembiA Pankiewicz J Wanat A Anna P Bek IG Bartu's S Malczewska-Malec M Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate biological material by the simple Griess reaction. Clinical Chemical Act 1998; 274:177-188.

20. Stites D Fundenberg H. Inmunología básica y clínica. 4<sup>a</sup> ed. México: Editorial el manual moderno; 1985.
21. Herrerías GJ Díaz BA. Tratado de hepatología Tomo II. España: Universidad de Sevilla; 1996.
22. Vasudevan DM Sreekumari S. Texto de bioquímica. 6<sup>a</sup> ed. México: editorial Cuellar Ayala; 2011.
23. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurements of Catalytic Activity Concentration of Enzymes at 37°C; Part 2: Reference Procedure for the Measurements of Catalytic Concentration of Creatine Kinase. ClinChem Lab Med 2002, 40(6): 635:642.
24. Guinand A Cortés H. Escorpionismo del género *Tityus* en la sierra falconia y su correlación con la liberación de mediadores inflamatorios y enzimas cardíacas. Revista GrásMed Caracas. 2004; 112(2):131-138.
25. Dos Santos A Gurfinkel E. Troponinas cardíacas en los síndromes coronarios agudos. Revista Argentina de Cardiología. 1999; 67(216): 391-398.
26. Mingramm Medicina biológica [sede Web]. Consultada 17 Julio 2013. Disponible en: [http://medicinabiologicamingramm.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=93&Itemid=165](http://medicinabiologicamingramm.com/index.php?option=com_content&view=article&id=93&Itemid=165)
27. Lozoya X. La herbolaria en México. Revista de Medicina Alternativa 1998; 19(92): 63-69.

28. Castillo GE Martínez SI. Manual de fitoterapia España:Editorial Elsevier; 2007.
29. Noni fruit. Full information on fruit of Morinda called noni fruit [sede Web]. Consultada 18 julio 2013 Disponible en: <http://noni-fruit-benefits.blogspot.mx/>
30. Solomon N. The tropical fruit with 101 medicinal uses, NONI juice. 2ª ed. Woodland Publishing; 1999.
31. Nelson SC. *Morindacitrifolia* L. University of Hawai'i at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, 2003. (Consultado 18 Julio 2013). Disponible en: <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/noni.pdf>
32. Asahina AY Ebesu JS Ichinotsubo D Tongson J Hokama Y. Effect of okadaic acid (OA) and Noni fruit extraction in the synthesis of tumor necrosis factor ( TNF- $\alpha$ ) by peripheral blood mononuclear.
33. Whistler WA. Traditional and herbal medicine in the cook islands. United Kingdom Ethnopharm ; 1985.
34. Merrill ED. Noni (*Morindacitrifolia*) as an edile plant. In Technical manual: emergency food plants and poisonous plants of the islands of the pacific. Washington DC: US GovernmentPrinting Office; 1943.
35. Levand O, Lar son HO. Some chemical constituents of *Morindacitrifolia*. Planta Med 1979; 36:186-7.
36. Heinicke R. The pharmacologically active ingredient of Noni. Bulletin of the National Tropical Botanical Garden, 1985.

37. Hirazumi A Furusawa E Chou SC. Immuno-modulation contributes to the anticancer activity of *Morindacitrifolia*(noni) fruit juice. Proc West PharmacolSoc 1996; 39: 7-9.
38. Wang MY. Pharmacokinetics of Noni. UIC laboratory in Rockford, IL, USA, 2002.
39. Younos C Rolland A et al. Analgesic and behavioural effects of *Morindacitrifolia*. Planta Med 1990; 56: 430-4.
40. American Chemical Society: Noni plant may yield new drugs to fight tuberculosis. Press release the 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. 2000.
41. Hirazumi AFurusawa E Chou SC Hokama Y. Anticancer activity of *Morindacitrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. Proc West Pharmacol Society 1994; 37: 145-146.
42. Hirazumi A Furusawa E. An immunomodulator y polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morindacitrifolia*(noni) with antitumour activity. Phytother Res 1999; 13: 380-387.

### 13. Anexos

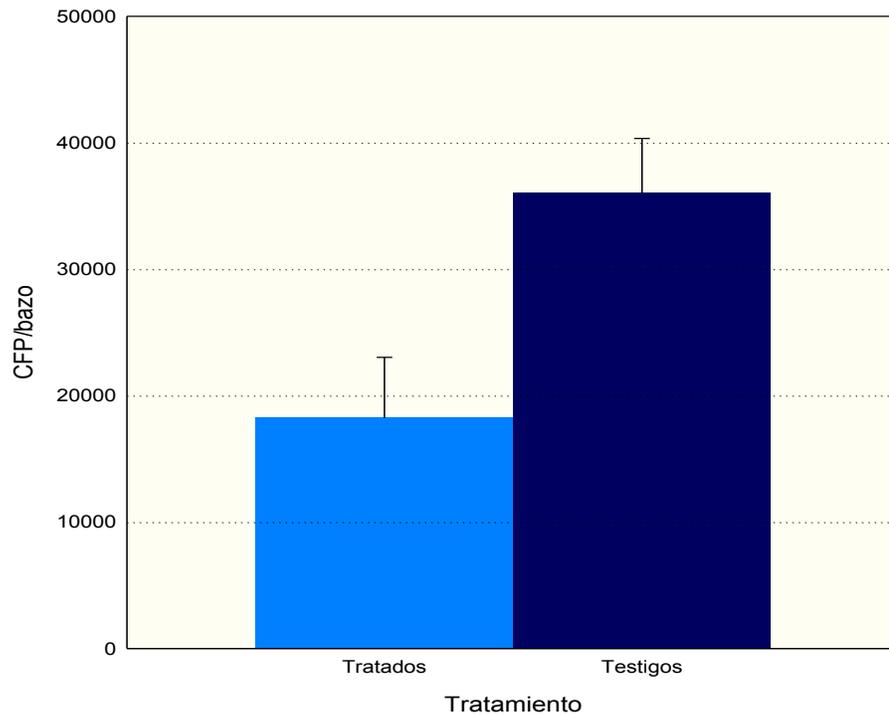
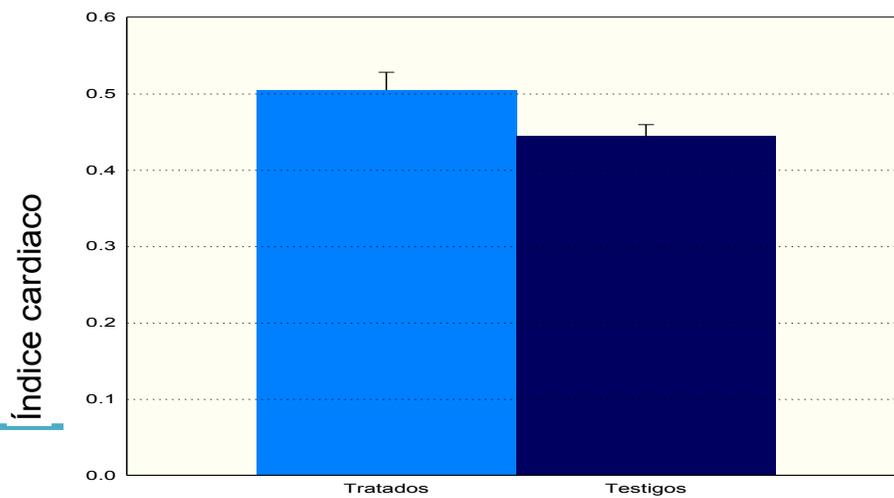


Figura 11. Gráfica comparativa para células formadoras de placa para ambos grupos de trabajo.



### Tratamiento

Figura 12. Gráfica comparativa para índices cardiacos calculados para cada grupo de trabajo.

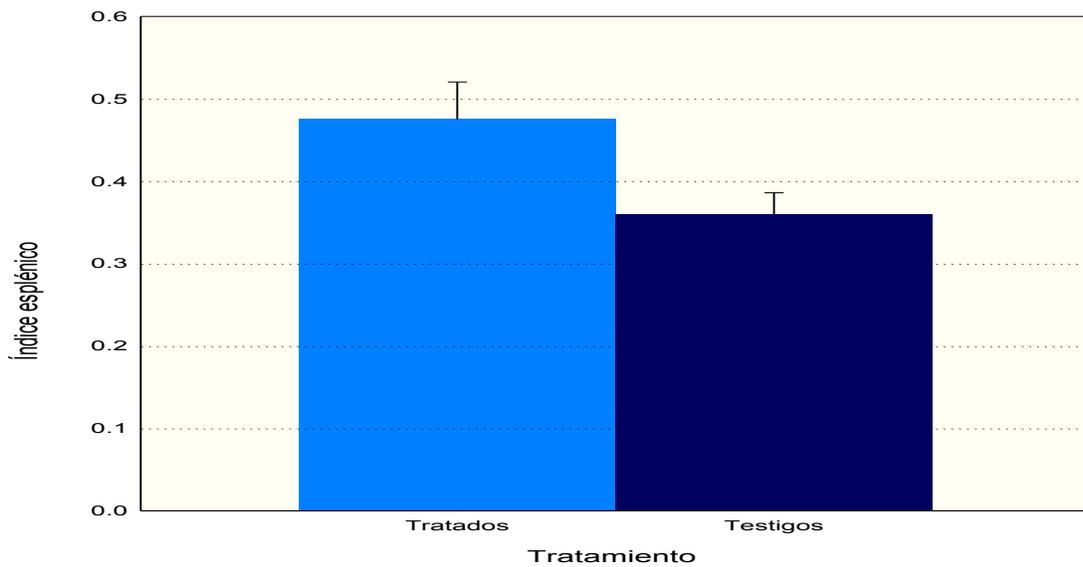


Figura 13. Comparación de índices esplénicos calculados para cada grupo de ratones después de 34 días de tratamiento.

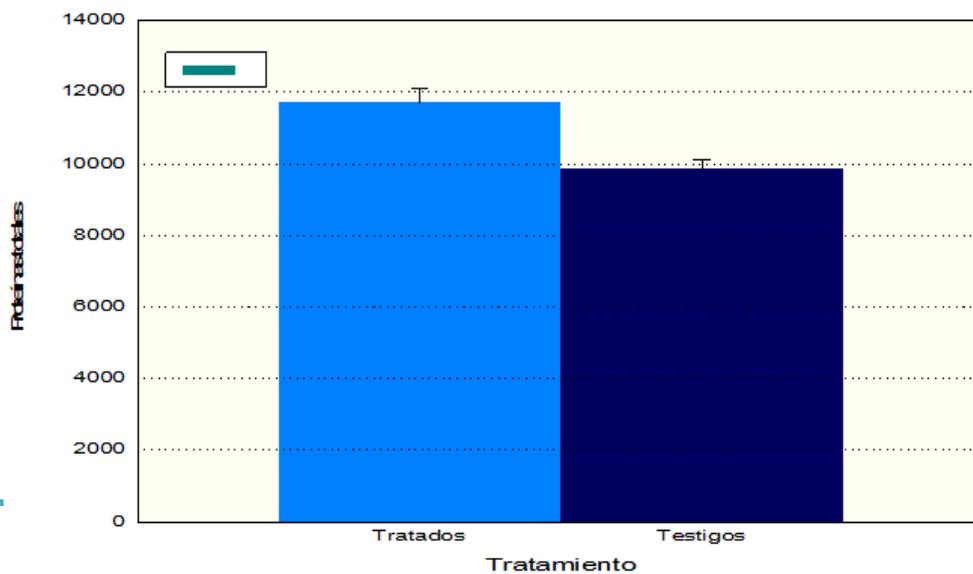


Figura 14. Comparación de niveles de proteínas séricas totales después de 34 días de tratamiento.

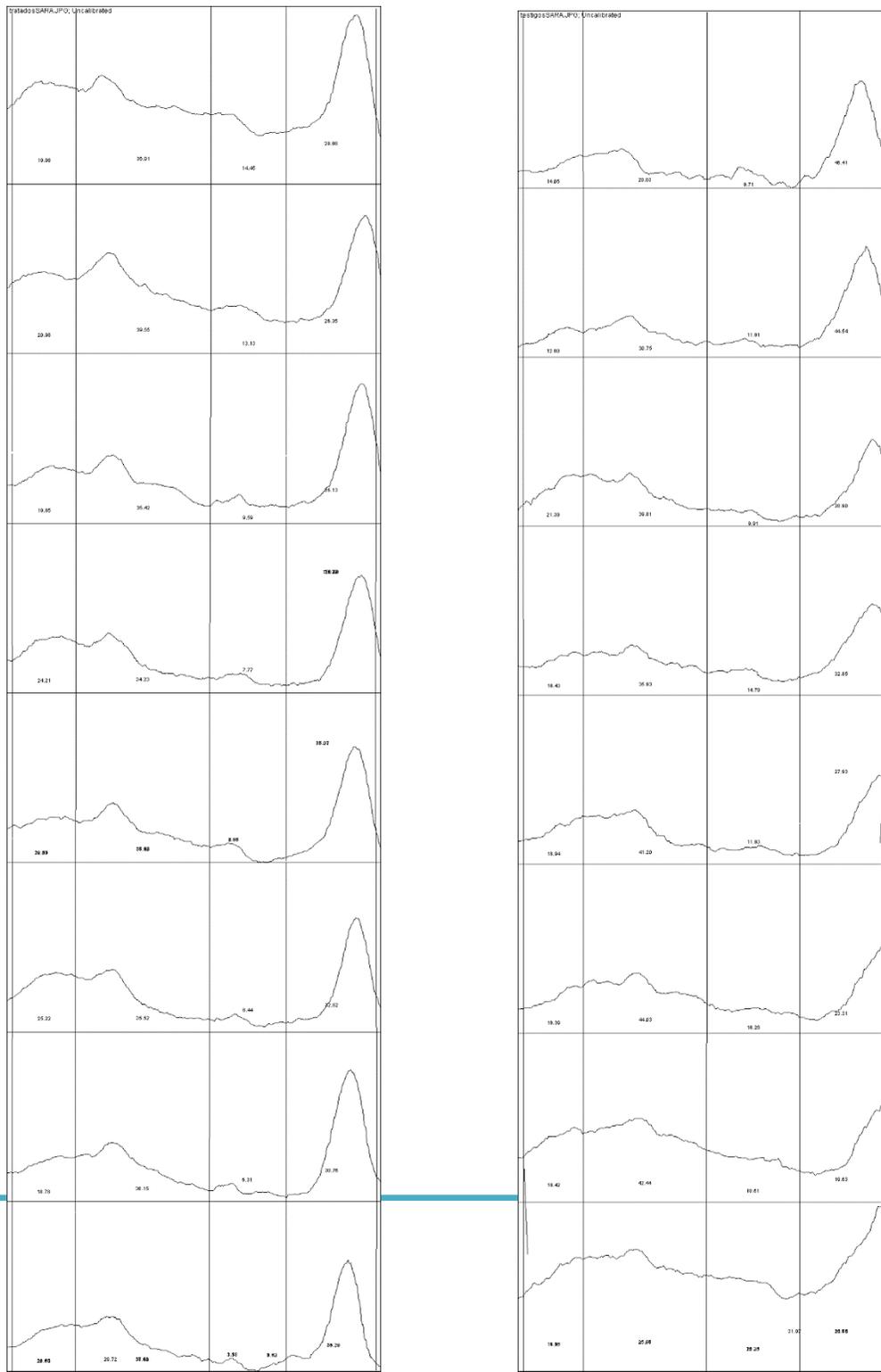


Figura 15. Electroferogramas de ratones tratados con extracto de noni (izquierda) y de ratones testigo (derecha).

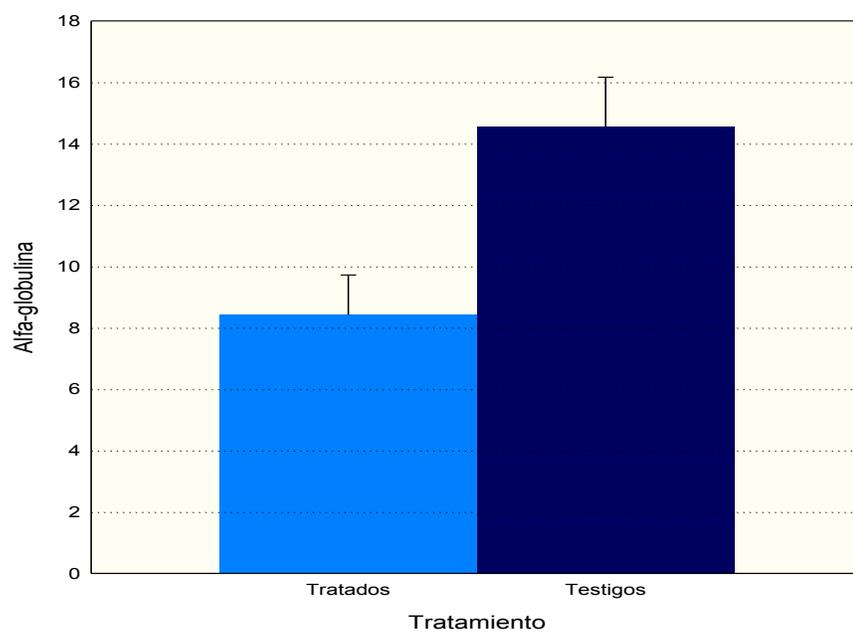


Figura 16. Niveles de alfa-globulina para cada grupo de tratamiento después de 34 días de administración.

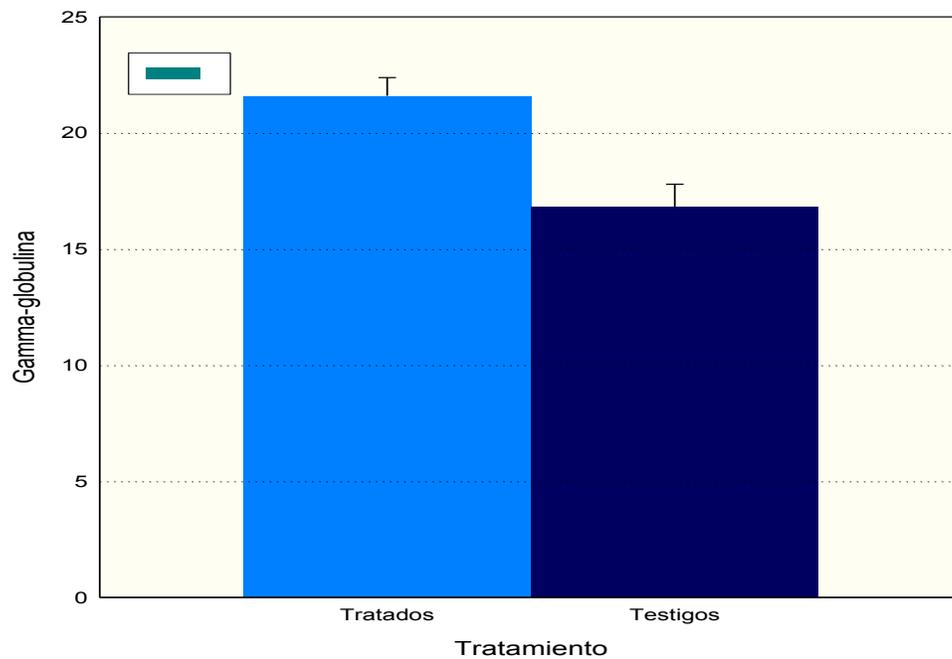


Figura 17. Comparación de niveles de gamma-globulina para ratones tratados y testigos después de 34 días de administración del extracto.