



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Valoración de algunos aspectos de la respuesta inmune celular y humoral en ratones CD1, et/+ y et/et que recibieron un extracto acuoso de *Allium cepa* L.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
JAIMES DÍAZ JESÚS**

**Director de tesis: M.C. Maurilio Flores Pimentel**

**Asesor de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura**

Laboratorio 1 PA-UMIEZ, FES Zaragoza Campus II

México, D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primeramente a Dios por permitirme la vida.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México y así como a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por permitirme un lugar dentro de ella y ser parte de mi formación académica.

Un especial reconocimiento a mis profesores, a mi director de tesis el M.C. Maurilio Flores Pimentel, mi asesor el Dr. Rubén Marroquín Segura, mis revisores el Q.F.B. Francisco J. Parada García, la Mtra. Yolanda Flores Cabrera y la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega que por su tiempo invertido, sus conocimientos, sus observaciones y sugerencias, su confianza depositada y su apoyo para este trabajo estaré en deuda con ellos por siempre.

También agradezco a todos los profesores que se encuentran dentro del Laboratorio 1 Planta alta de la UMIEZ, el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara, el Q.F.B. Armando Ramírez González y el M.C. Ricardo Calvillo Esperanza gracias por su confianza y apoyo durante todo este tiempo.

A todos mis compañeros del laboratorio y también aquellos que durante la carrera estuvieron allí a Maggie, Christian, Norma, Darío, Gildardo, José Luis, Miguel, Edgar, Alejandro, Roberto, Misael, Carlos, Ariadna, Ilse, Alicia, Maribel, Rebeca, Carla, Saúl y Erick gracias.

## **DEDICATORIAS**

A mi mamá Emperatriz Díaz por ser mi mamá, por ser un ejemplo de gran fortaleza, por su amor y cariño.

A mi hermana Maricarmen por ser un apoyo constante, por su esfuerzo y entusiasmo para llegar a esta meta.

A mi hermano Mariano por tener un buen sazón que me deleitaba con un buen bocado en cada regreso a casa.

A mis sobrinos por ser sinónimos de alegría en casa en especial a Jessi, Janneth, Samuel, Tania, Martín, Omar, Abraham, Noé y Mimi.

*“Si la juventud es un defecto, es un defecto del que nos curamos demasiado pronto”.*

James Russell Lowell

# ÍNDICE

1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Consideraciones generales	5
3.2 La respuesta inmune adquirida y las interacciones celulares	8
3.2.1 Respuesta inmune humoral	8
3.2.2 Respuesta inmune celular	11
3.2.3 Inducción in vitro de la respuesta inmunitaria	12
3.2.4 Función de los neutrófilos	13
3.2.5 Aglutinación	15
3.2.6 Ceruloplasmina	16
3.2.7 Óxido Nítrico	17
3.3 Medicina Herbolaria	19
3.3.1 Descripción de <i>Allium cepa</i> L.	20
3.3.2 Clasificación	20
3.3.3 Botánica y ecología.	20
3.3.4 Historia.	21
3.3.5 Química.	21
3.3.6 Farmacología.	22
3.3.7 Principios activos	22
3.3.8 Comentarios.	22
3.4 Método de extracción	23
3.5 Modelo animal	24
3.5.1 Ratón CD1	24
3.5.2 Ratón CD1 et/et	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general.	28
5.2 Objetivo específicos.	28
6. HIPÓTESIS.	29

7. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
7.1 Diseño de estudio	30
7.2 REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIALES	31
8. MÉTODOS	33
8.1 Preparación del extracto	33
8.2 Manejo de animales experimentales	33
8.3 Cuantificación de células formadoras de anticuerpo, por la técnica de Jerne.	34
8.4 Reducción de nitro azul de tetrazolium (NBT).	36
8.5 Hemaglutinación.	37
8.6 Cuantificación de ceruloplasmina.	38
8.7 Determinación de nitritos por el método de Griess.	39
8.8. Técnicas de laboratorio	41
8.9 Diseño estadístico	41
9. DIAGRAMA	42
10. RESULTADOS	43
10.1 Extracto	43
10.2 Índice relativo	43
10.2.1 Comparación de medias con respecto al índice de cada órgano.	44
10.2.2 Gráficos de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para índice relativo del bazo.	45
10.2.4 Gráficos de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para índice relativo del riñón.	46
10.3 Células formadoras de anticuerpo	47
10.3.1 Comparación de medias de las CFA/millón de células nucleadas y CFA/bazo.	47
10.3.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para las CFA/millón de células nucleadas.	48
10.3.3 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para las CFA/bazo.	49
10.4 Hemaglutinación	50
10.4.1 Representa las medias del inverso del título en hemaglutinación	50
10.4.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) del inverso del título en hemaglutinación.	51
10.5 Células de cavidad peritoneal.	52
10.5.1 Comparación de medias de las células de cavidad peritoneal.	52
10.5.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para las células de cavidad peritoneal.	53
11. ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
12. CONCLUSIONES	56

13. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	57
14. REFERENCIAS	58
15. ANEXOS	62



## 1. RESUMEN.

El uso de plantas medicinales es resultado de la experiencia e íntimo contacto con la naturaleza que el hombre ha acumulado por generaciones, así como de la convivencia entre las culturas de diferentes pueblos. México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, donde se registran poco más de 3000 especies que se emplean en remedios naturales. El propósito de este trabajo fue la preparación del extracto acuoso de *Allium cepa L* y la evaluación de algunos aspectos de la respuesta inmune celular y humoral en ratones CD1, et/+ y et/et; mediante su administración oral. Para el estudio se usaron tres cepas de ratones machos: progenitora +/+, portadora del gen de hipotimia et/+ y la hipotímica et/et, las cuales se contrastaron con animales testigos. Se midieron las células formadoras de anticuerpo (CFA); mediante el método de Jerne, el título de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero mediante hemaglutinación, cuantificación de células de cavidad peritoneal y su capacidad para reducir nitro azul de tetrazolium (NBT); además se cuantificaron los niveles de ceruloplasmina por el método de Mancini así como nitritos por el método de Griess en el suero de los diferentes grupos. Los resultados muestran que el extracto de *Allium cepa L* induce una regulación en la cantidad de CFA cuando se comparan con los resultados de los animales testigo; para el ensayo de hemaglutinación los resultados nos sugieren una mejor selección clonal en la formación de anticuerpos de la clase IgG, la cuantificación de macrófagos muestra una menor cantidad de células en cavidad peritoneal indicándonos que la administración del extracto no produce procesos inflamatorios.

Finalmente los valores de reducción de NBT, ceruloplasmina y nitritos, no mostraron ninguna diferencia significativa cuando se comparan con los resultados de los animales testigos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La medicina natural ha sido utilizada para el tratamiento de numerosas enfermedades en el transcurso de toda la historia de la humanidad, desde la antigüedad se conocen los efectos beneficiosos de numerosas plantas sobre la salud humana, muchas de las cuales han sido utilizadas para curar y prevenir diversas enfermedades. De forma general el uso de las plantas para tratar enfermedades se remonta a más de 3000 años en el continente asiático, aunque fueron los occidentales, como los griegos y romanos, los que sistematizaron a través de sus escritos, el estudio de las plantas medicinales.

En el siglo pasado, con el desarrollo experimentado en el sector químico-farmacéutico, se produjo un incremento en la producción de los fármacos químicos-sintéticos, esto trajo aparejado un aumento de las reacciones adversas y efectos negativos colaterales, además de un elevado costo de adquisición de estos compuestos, por tal motivo, en las últimas décadas existe tendencia generalizada a retomar el empleo de productos derivados de fuentes naturales, como las plantas y hongos comestibles. Estas sustancias, exhiben propiedades farmacológicas en un espectro amplio de enfermedades.

El estudio de plantas medicinales, ya sea como materia prima para la producción de extractos o como fuente de aislamiento de sustancias naturales puras, representa un área en franca expansión, en los países industrializados dichos productos constituyen cerca del 25% del total de las prescripciones médicas, mientras que los que se encuentran en vías de desarrollo abarcan prácticamente el 80% de la terapéutica.

Igualmente, en la USP 30, donde son registrados alrededor de 220 suplementos dietéticos un porcentaje elevado está constituido por derivados de plantas (36%).

La modulación del sistema inmune a través de su estimulación o supresión puede contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud. El uso de agentes que activan los mecanismos de defensa del huésped (inmunoreguladores o inmunopotenciadores), proporciona una herramienta terapéutica a la quimioterapia convencional en personas inmunocomprometidas. Por tal motivo, un elevado número de investigaciones biomédicas se orientan a la búsqueda de nuevos compuestos que sean capaces de estimular la respuesta inmune en pacientes inmunodeficientes.

Con el objetivo de ofrecer una alternativa terapéutica en algunos estados de inmunodeficiencias se utilizó la administración oral de un extracto de *Allium cepa L* en ratones CD1, et/+ y et/et por un periodo de 30 días en el cual se evaluó algunos aspectos de la respuesta inmune celular y humoral.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Consideraciones generales

Uno de los principales retos de la ciencia médica moderna es la integración de los adelantos básicos de la inmunoquímica y la inmunobiología en procedimientos de diagnóstico y terapéutica que serán de utilidad en la práctica de la medicina clínica, los resultados de estos procedimientos de laboratorio son utilizados entonces por los médicos internistas y los especialistas para el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos clínicos. A su vez, este entendimiento ha estimulado la investigación científica básica en inmunología, de hecho las observaciones hechas por los investigadores clínicos en inmunología han cambiado frecuentemente, de manera espectacular, el curso de la investigación básica en inmunología y sus campos asociados.<sup>1</sup>

El término inmune deriva del latín *immunis*, esto es libre de “cargos” (impuestos, pagos). La inmunología se inició como una rama de la microbiología; se desarrollo a partir de los estudios de las enfermedades infecciosas y de las respuestas del organismo hacia ellas.<sup>1,2</sup>

Las funciones de la respuesta inmune se ejercen a través de dos grandes vertientes: la respuesta inmune innata y la inmune adquirida, entre las características que diferencian a la respuesta inmune adquirida de la innata se incluyen: especificidad, diversidad y memoria. Al igual que la respuesta inmune innata, la respuesta adquirida es autolimitada y no es auto-reactiva. La respuesta inmune adquirida, humoral o celular, puede ser dividida en fase de reconocimiento, fase de activación, fase efectora y el

retorno a la homeostasis, con permanencia de una memoria inmunológica que permite generar muy rápidamente una intensa respuesta, altamente específica. Entre las células que participan en la respuesta inmune adquirida se encuentran las células presentadora de antígenos (CPA), como son células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y las células responsables del reconocimiento del antígeno: los linfocitos B y los linfocitos T; estos últimos se dividen según su función en T CD4+ (ayudadores) y T CD8+ (citotóxicos), a su vez, dependiendo de las citocinas que secreten, los linfocitos T CD4+ se subdividen en linfocitos Th-1 y Th-2.

Al penetrar en el cuerpo, los antígenos son transportados hacia los órganos linfáticos periféricos más cercanos al puerto de entrada, generalmente los ganglios drenantes en donde son procesados por células presentadoras de antígeno y expuestos en la superficie de estas mismas, bajo la forma de un complejo [MHC-Ag], el cual puede ser reconocido por linfocitos T.<sup>3</sup>

Dependiendo de sus características, el antígeno, también puede ser reconocido directamente por linfocitos B. Los receptores para el antígeno de los linfocitos B y T son altamente polimórficos y aunque cada receptor es específico para un solo determinante antigénico, se estima que el conjunto de receptores puede reconocer entre  $10^7$ - $10^9$  determinantes antigénicos distintos, esto se logra gracias a la recombinación somática de los segmentos génicos de los receptores de los linfocitos, que ocurre al azar aun antes de haber estado en contacto con algún antígeno y que genera clones de linfocitos cada una de las cuales expresan receptores con una sola especificidad.<sup>4</sup>

Cuando un linfocito encuentra a su antígeno, se activa. Esto significa que cuando el receptor para el antígeno de ese linfocito interacciona con el antígeno se genera cierta información que se transfiere hacia el interior de la célula a través de diversas cascadas de señales bioquímicas; esta serie de eventos le permite a la célula responder adecuadamente a esa señal, y generar una respuesta, llámese esta producción de citocinas o interleucinas, actividad citotóxicas, proliferación, etc., que en conjunto puede inducir una respuesta inflamatoria. Normalmente, el proceso inflamatorio lleva a la recuperación del evento que inicialmente lo provocó (trauma, infecciones, intoxicaciones, etc...); sin embargo, si el conjunto de eventos que llevan al desarrollo de la inflamación no están coordinados en tiempo e intensidad, se genera un desequilibrio que puede conducir al establecimiento de una inflamación crónica, la cual desembocará en distintas patologías. Así mismo, el entendimiento profundo de los mecanismos celulares y moleculares que controlan el reconocimiento de diversos tipos de antígenos son esenciales para el desarrollo de nuevas vacunas.<sup>4, 5</sup>

## **3.2 La respuesta inmune adquirida y las interacciones celulares**

### **3.2.1 Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral es mediada por las inmunoglobulinas, cuyas funciones principales son: neutralización, opsonización y activación de complemento, los anticuerpos participan principalmente en la defensa contra microbios extracelulares, los linfocitos B son las células productoras de anticuerpos, estas células se producen en la médula ósea donde maduran para luego migrar hacia los órganos linfoides secundarios o periféricos, donde llevan a cabo las etapas de reconocimiento antigénico y activación. Los procesos de recombinación genética de los genes de las inmunoglobulinas que se llevan a cabo en la médula ósea son responsables de la generación de la diversidad de las inmunoglobulinas en la región responsable del reconocimiento del antígeno.<sup>6</sup>

Gracias a estos sofisticados eventos moleculares, se generan anticuerpos con capacidad de reconocer una amplia diversidad de antígenos utilizando un número de genes.

Los receptores para el antígeno de los linfocitos B son inmunoglobulina IgM o IgD unidas a la membrana, asociadas a cada receptor se encuentran dos cadenas, denominadas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , que constituye el modulo de señalización propiamente dicho del receptor para el antígeno. Aunadas a estas señales, se combinan aquellas generadas por moléculas co-receptoras tales como CR2 (receptor de complemento, CD21), CD19 y CD81. El reconocimiento simultáneo de un antígeno (opsonización por complemento)



por el co-receptor CR2 y por las inmunoglobulinas de superficie de un linfocito B intensifica mucho la magnitud del estímulo.

Los antígenos reconocidos por los anticuerpos pueden ser tan diversos como proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y pequeñas sustancias químicas. Los anticuerpos pueden reconocer epítomos lineares o bien determinantes conformacionales, resultantes del plegamiento de las cadenas polipeptídicas. El reconocimiento antigénico induce la endocitosis del antígeno, y su procesamiento para ser presentado por el linfocito B mediante moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II).

Los receptores de linfocitos B que no han tenido contacto con antígeno (células vírgenes), son del isotipo IgM e IgD. Estas células B vírgenes circulan continuamente por los diversos tejidos linfoides hasta encontrar el antígeno específico de su receptor. En el momento en que esto sucede, los linfocitos B dejan de migrar, y como resultado de una secuencia de eventos moleculares se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos dentro de los ganglios linfáticos o tejidos linfoides asociados a mucosas (amígdalas, apéndice, placas de Peyer, etc.). Dependiendo de las características del antígeno, los linfocitos B pueden activarse con o sin ayuda de linfocitos T CD4+ (ayudadores). Aquellas macromoléculas que contienen antígenos polivalentes, es decir que constan de múltiples epítomos idénticos como el caso de polisacáridos y glicolípidos de las cápsulas de algunas bacterias (*Haemophilus influenzae*, *pneumococo* y *meningococo*), pueden unirse simultáneamente a varios receptores IgM, lo cual lleva al entre cruzamiento de los receptores y a la activación de los linfocitos B. Sin embargo, cuando las características del antígeno no inducen al

entrecruzamiento de varias moléculas de inmunoglobulinas, sino que sólo comprometen a un receptor IgM, el linfocito B requiere de la ayuda de linfocitos TCD4+ para su activación. En este caso, los antígenos proteicos unidos a un receptor IgM son endocitados, procesados y expuestos de nueva cuenta en la superficie celular por las moléculas MHC II del linfocito B, este proceso permite iniciar lo que se conoce como cooperación entre linfocitos T y B, proceso mediante el cual un linfocito T CD4+ y cuyo TCR es específico para ese antígeno, reconoce al antígeno y genera una serie de señales intracelulares que últimamente van a activar al linfocito B.

Las señales intracelulares generadas cuando los receptores para el antígeno que reconocen a su antígeno no son suficientes para la activación adecuada del linfocito B y se requiere la participación de moléculas cooperadoras tanto de células B como T. Las moléculas co-receptoras expresadas por el linfocito B incluyen B7-1(CD80) y B7-2(CD86) cuyo ligando en células T es CD28, el linfocito TCD4+ a su vez expresa la molécula co-estimuladora CD40L cuyo ligando en la célula B es CD40. Esta co-estimulación, o segunda señal es indispensable para la activación mutua, ya que sin ella los linfocitos entran en un estado de anergia. Adicionalmente, la IL-2 secretada por el linfocito T CD4+ induce la activación y proliferación del linfocito B, transformándolo en célula plasmática productora de anticuerpos.<sup>7</sup>

### 3.2.2 Respuesta inmune celular

Los linfocitos T se producen en médula ósea y maduran en el timo en donde son sometidos a dos etapas de selección y sólo aquellos que reconocen al MHC propio pero que sin embargo no responden a antígenos propio, sobreviven. Los linfocitos T reconocen antígenos peptídicos unidos a moléculas MHC y a diferencia de los linfocitos B, las células T vírgenes circulan constantemente a través del tejido linfoide hasta encontrarse con el antígeno específico presentado por células presentadoras de antígeno (CPAs). La respuesta de los linfocitos T esta directamente influenciada por el tipo de célula que presente originalmente el antígeno. Las células dendríticas se encuentran localizadas estratégicamente para capturar antígenos y transportarlos a los ganglios linfáticos y presentárselos a los linfocitos T se consideran como las mejores activadoras de un linfocito T virgen, más aún si expresan una cantidad abundante de moléculas MHC cargadas de péptidos.

Una de las primeras consecuencias del reconocimiento del complejo [MHC-péptido] presentado por las CPAs, es la proliferación clonal de aquel linfocito T virgen que reconoció específicamente el complejo [MHC-péptido] y una diferenciación de su progenie en células efectoras y células de memoria. Las células efectoras pasan a la circulación, y así localizar de nuevo a su antígeno presentado por CPAs, como por ejemplo macrófagos de tejidos periféricos, se activan de nueva cuenta para llevar a cabo esta vez sus funciones efectoras.

El módulo de reconocimiento propiamente dicho del receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR) consta de dos cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ). En virtud del alto grado de polimorfismo que presentan estas moléculas tienen la capacidad de reconocer una

inmensa diversidad de péptidos. Como en el caso de los linfocitos B, la transducción de señales está a cargo de una serie de proteínas invariables asociadas al TCR y cuyo conjunto constituye el complejo CD3. Así mismo, las señales del complejo TCR-CD3 son moduladas por las diversas moléculas accesorias. Al interactuar con sus ligandos presentes en la superficie de las CPAs, estas moléculas modulan las funciones efectoras: contribuyen a estabilizar la interacción física entre los linfocitos y las CPAs (adhesión), y participan directamente, positiva o negativamente, en los fenómenos de activación y transmisión de señales hacia el interior de la célula efectora.<sup>7</sup>

### **3.2.3 Inducción *in vitro* de la respuesta inmunitaria**

Aunque al principio todos los estudios sobre la inducción de las respuestas inmunitarias sólo podían hacerse *in vivo*, en el animal completo, con el tiempo, el desarrollo de métodos de cultivo de células permitió también analizar el fenómeno *in vitro*. En los sistemas *in vitro*, la producción de anticuerpos se logra incubando suspensiones de células de bazo o de ganglios linfáticos en presencia de un antígeno escogido. Aquí, el uso de eritrocitos de carnero y la técnica de Jerne ayudaron grandemente a establecer los mecanismos de inducción de la respuesta inmunitaria. La población celular de estos órganos linfoides incluye una población de células adherentes (macrófagos) y una fracción de células no adherentes (linfocitos). La incubación del antígeno con las poblaciones adherente y no adherente, por separado, no induce a la producción de anticuerpos; la reunión de las células adherentes y no adherentes, antes de su

incubación con el antígeno, regenera la capacidad del sistema para producir anticuerpos.<sup>8</sup>

### **3.2.4 Función de los neutrófilos**

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son las células efectoras principales del sistema inmunitario innato. Estas células poseen una vida media finita (un periodo relativamente corto de 24 horas) y se producen constantemente en la médula ósea. Los PMNs son las primeras células que ingresan al sitio de inflamación, donde, después de ser activadas por una gran variedad de estímulos, sufren una explosión respiratoria para así liberar superóxido, sufren desgranulación para liberar péptidos y proteínas antimicrobianas, producen cantidades limitadas de citocinas proinflamatorias. La deficiencia de PMNs se traduce en una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas. Tal deficiencia se debe ya sea a un número bajo de PMNs (como sucede en la supresión de la médula ósea posterior a quimioterapia) o a defectos intrínsecos al PMN que son clínicamente significativos. Tales métodos incluyen ensayos que evalúan la adhesión, quimiotaxia, fagocitosis, producción de superóxido y destrucción bacteriana.<sup>9</sup>

- **Adhesión de neutrófilos**

La capacidad de los PMNs para adherirse a las superficies endoteliales y migrar hacia los sitios de inflamación es un elemento esencial de su potencial para controlar infecciones bacterianas. Los PMNs utilizan una multitud de receptores de la superficie celular, los cuales incluyen selectinas e integrinas para llevar a cabo esta función.<sup>9</sup>

- **Quimiotaxia**

La movilización direccional de los PMNs hacia los sitios de inflamación está mediada por una multitud de moléculas quimiotácticas (productos bacterianos como péptidos formilados o quimiocinas derivadas del huésped). La incapacidad de los PMNs para reaccionar ante estos estímulos tiene como consecuencia un defecto en la respuesta inmunitaria.<sup>10</sup>

- **Fagocitosis**

La ingestión de microorganismos por parte de neutrófilos es un proceso activo que requiere la producción de energía por parte de la célula fagocítica.

La internalización de microorganismos cubiertos con anticuerpos y con moléculas del complemento tiene lugar rápidamente después que su superficie hace contacto con los PMNs y macrófagos. El término fagocitosis generalmente se limita a la evaluación del paso inicial de la destrucción bacteriana.<sup>11</sup>

- **Determinación del estallido respiratorio y la desgranulación**

Quizá la prueba aplicada con más frecuencia de la función de los PMNs es la determinación de la capacidad de estas células para producir superóxido ( $O_2^-$ ). En esta prueba se practica un ensayo funcional, cuya intención es identificar la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), un trastorno de los fagocitos bien caracterizados, cuya causa es la deficiencia hereditaria de una de las muchas subunidades de la oxidasa que actúan sobre la forma reducida del fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida (NADPH). Se utilizan dos ensayos para determinar la capacidad de los PMNs activados

para producir superóxido: 1) la prueba del nitroazul tetrazolium (NBT) y 2) la prueba de 2',7-diclorofluoresceína mediante citometría de flujo. El nitroazul tetrazolium es un compuesto claro, amarillo, hidrosoluble que produce formazán, una tintura un azul oscuro, al sufrir reducción. Éste es un ensayo cualitativo que puede ser cuantitativo mediante la extracción del precipitado azul a partir de los PMNs y su medición a través de espectroscopía.<sup>11</sup>

- **Destrucción bacteriana**

El ensayo de acción microbicida se ha considerado desde hace mucho tiempo como la mejor prueba funcional para la evaluación de los trastornos potenciales de los PMNs. Debido a que la destrucción eficiente de las bacterias requiere todos los pasos descritos anteriormente, un defecto de la actividad microbicida puede ser resultado de un defecto de cualquiera de las etapas, ya que la realización de ensayos de acción microbicida es muy complicada y requiere una labor intensiva; generalmente se utilizan sólo cuando otros más sencillos de la función de los PMNs no lograron establecer el diagnóstico.<sup>12</sup>

### **3.2.5 Aglutinación**

La aglutinación (o agregación) de partículas cubiertas por antígenos a través de anticuerpos reactivos es uno de los ensayos inmunológicos de mayor reconocimiento desde mucho tiempo. Gran parte de esta tecnología experimental ahora ya se reemplazó por métodos más sensibles para detección de anticuerpos; no obstante, los ensayos basados en aglutinación aún se emplean de manera rutinaria como parte de las pruebas típicas de los bancos de sangre para la clasificación de los tipos de eritrocitos y para identificar anticuerpos antieritrocíticos autoinmunitarios.<sup>13-15</sup>

### 3.2.6 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina es una  $\alpha_2$  globulina con una movilidad electroforética de 4.6, tiene un peso molecular de 132 kDa y un punto isoeléctrico de 4.4; su tasa normal es de 30 mg/100 mL. Esta proteína es la principal transportadora de cobre en la circulación, se sintetiza principalmente en los hepatocitos como una cadena polipeptídica simple y se secreta como una glicoproteína; pero también se encuentra en los monocitos, astrocitos y células de Sertoli; se caracteriza desde el punto de vista estructural por presentar tres tipos de unión para el cobre con características espectroscópicas diferentes y desde el punto funcional por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin la liberación de intermediarios potencialmente tóxicos ( $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$ ).<sup>16,17</sup>

- **Difusión radial (Técnica de Mancini)**

Cuando un antígeno es colocado en un orificio circular practicado en una placa de agar, al cual se adicionó un anticuerpo monoespecífico, difunde en forma radial y de acuerdo a los principios básicos de la difusión, el diámetro del halo de precipitación esta en relación directa con su concentración. Si a esta operación se efectúa colocando varios orificios de la placa cantidades variables conocidas del antígeno específico para el antisuero mezclado con el agar y se le deja a temperatura ambiente hasta que el halo de precipitación no se modifique, con los resultados obtenidos se puede confeccionar una curva relacionando el diámetro de los halos de precipitación con las correspondientes concentraciones antigénicas. Esta curva permite calcular la concentración de ese mismo antígeno en cualquier muestra desconocida. La difusión



radial se utiliza en la cuantificación de proteínas que se encuentran presentes en mezclas complejas como lo son los componentes del suero humano. Es indispensable disponer para ello de antisueros monoespecíficos destinados a los antígenos que se quieren valorar.<sup>18, 19</sup>

### **3.2.7 Óxido Nítrico**

El Oxido Nítrico, es un gas incoloro, muy difusible, lábil y apolar, esta molécula se sintetiza enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOs) y como agentes oxidantes, el oxígeno, mediante un proceso de óxido reducción en el que el átomo de nitrógeno del grupo guanidino de la arginina se oxida de 3 a +2, convirtiéndose en el intermediario N-hidroxi-L-arginina, posteriormente por una donación electrónica del NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato), el intermediario se oxida posteriormente a ON y Citrulina.<sup>20</sup>

En las células humanas se identificaron tres isoformas de la NOs, dos de ellas la endotelial y la neuronal están presentes en las células en todo momento y por ello se denominan formas constitutivas, catalizan la formación de NO en bajas cantidades durante periodos cortos y pueden ser activadas rápidamente por el incremento de la concentración citoplasmática de los iones de calcio en presencia de calmodulina. La tercera se encuentra en los macrófagos y es inducible (iNOS), se expresa en presencia de citocinas; actúa durante periodos más largos y sintetiza cantidades mayores de NO, el cual tiene funciones importantes en el organismo como son: reducir la agregación y adhesión plaquetaria; en el sistema vascular actúa como vasodilatador de las arterias

de mayor musculatura, así mismo impide que las células vecinas se relajen y ensanchen para poder controlar la presión sanguínea.<sup>21</sup>

El exceso en la producción de NO puede provocar la relajación de las arterias y la disminución de la presión sanguínea de manera alarmante. Los efectos tóxicos del óxido nítrico se pueden producir por la acción directa del NO sobre el ADN, o bien por la combinación del NO con otros radicales como el anión superóxido, formando peroxinitrilo ( $\text{ONOO}^-$ ) y un radical hidroxilo, que inicia procesos oxidativos en cadena que lleva a la muerte celular.<sup>22,23</sup>

### 3.3 Medicina Herbolaria

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta. La medicina tradicional mexicana, como toda institución social, ha cambiado en el curso de los siglos, interactuando con otros modelos terapéuticos para conformar lo que llamamos el “sistema real de salud” de millones de mexicanos del siglo XXI, habitantes del campo y la ciudad. Asociada fuertemente a las plantas medicinales –su recurso más abundante, accesible y conocido, la medicina tradicional es mucho más que botánica medicinal, hoy trata precisamente, de dar cuenta de su riqueza y diversidad.<sup>24</sup> El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países. En México, los conocimientos sobre herbolaria se han transmitido en la población, principalmente de generación en generación, quien no recuerda, por ejemplo, a la abuelita, o a la tía, recomendar el uso de infusiones de manzanilla, ruda, hierbabuena, etcétera para curar un dolor de estómago, dolores reumáticos, entre otros. Pero en muchas instituciones educativas de nuestro país, como en la Universidad Autónoma Chapingo, del Estado de México, desde hace varios años se llevan a cabo estudios sobre las cualidades de este tipo de plantas, y se han consolidado importantes trabajos de investigación que han demostrado que mediante su uso se pueden combatir y controlar enfermedades como el cáncer, la diabetes, etcétera.<sup>25</sup>

### 3.3.1 Descripción de *Allium cepa* L.



Fig. 1: Cultivo de cebolla.



Fig. 2: Bulbos de cebolla.

### 3.3.2 Clasificación

La cebolla es una planta monocotiledónea, la clasificación más reciente la ubica en el Superorden *Liliana*, Orden *Amaryllidales*, Familia *Alliaceae*, Género *Allium* y Especie *Allium cepa* L.

### 3.3.3 Botánica y ecología.

Hierba de hojas alargadas, angostas y huecas en número de 4 a 6 (fig.1). La planta se sostiene de un bulbo carnoso subterráneo, que es lo que se conoce como cebolla (fig.2). Las flores son pequeñas y blanco-verdosas, o rojo púrpura, agrupadas en forma de sombrillitas redondeadas, como bolita que nacen sobre un tallo largo y hueco que sale de en medio de las hojas, los frutos son cápsulas con semillas negras. Originaria de Asia, Mediterráneo. Habita en clima cálido, semicálido, semiseco y templado entre el nivel del mar y los 2600 m. Se cultiva en huertos familiares, con vegetación circundante de bosque tropical, matorral, bosque espinoso y bosque mesófilo de montaña.<sup>26</sup>

### **3.3.4 Historia.**

En el siglo XVII, Gregorio López refiere: “útil a flaqueza de vista y esquinancia, contra mordedura de perro, extirpa barros, aprovecha a oídos que tienen silbos y manan material, hace renacer el cabello que derribó la tiña, provoca orina, ofusca la razón y sentido”.

A inicios del siglo XVIII, Juan de Esteyneffer utiliza la cebolla para la sordera, supuración del oído, dolor de muelas, dentera, pujos, almorranas y dolor de piedra. Vicente Cervantes, en el mismo siglo dice que “su virtud es acre, madurativa, diurética, diaforética, flatulenta, afrodisíaca y antihelmíntica”.

A inicios del siglo XX, la Sociedad Farmacéutica de México la indica como antiparasitaria, diurética y para los abscesos. Posteriormente, Maximino Martínez registra que se usa como anticancerosa, anticatarral, antifímica, antiparasitaria, diurética, para enfermedades exantemáticas, nefritis, para los abscesos y que produce oliguria.<sup>27</sup>

### **3.3.5 Química.**

El bulbo de *Allium cepa* L es el órgano de esta planta que más se ha investigado. Contiene un aceite esencial rico en componentes azufrados de los cuales la alicina, el disulfuro de alilpropilo y el disulfuro de dialilo, se encuentra en altas concentraciones. Otros componentes azufrados menores son los sulfuros de dialilo y dimetilo y sus trisulfuros, cepaenos, derivados metilados del tiofeno, y un gran número de alcanos y alquenos azufrados de cadena corta, algunos cíclicos lineales ramificados y esterificados.

### **3.3.6 Farmacología.**

Estudios en el hombre indican que el bulbo por vía oral, en dosis variables, ejerce un efecto antiasmático, hipocolesterolémico, estimulante del apetito, hipolipidémico e hipoglicémico.

Se encontró que *Allium cepa L* inhibió la mutagenicidad causada por mitomicina C, bleomicina, fluorouracíl, cis-dia-minodichloroplatino y arabinosiloitosina.<sup>28</sup>

### **3.3.7 Principios activos**

Los efectos hipolipidémico e hipoglicémico de *Allium cepa L* se deben al aceite esencial y a varios de sus componentes azufrados, particularmente el disulfuro de alil-propilo. Se ha demostrado que los esteres álílicos y alénicos de los ácidos alquil y alquenil tiosulfínicos inhiben la liberación de histamina, la biosíntesis in vitro de leukotrieno y tromboxano, y producen un efecto broncodilatador. Que los ácidos tríhidroxioocatadecenoicos presentan una actividad similar a la de prostaglandina E, y que la aliína además del aceite esencial, inhibe la agregación de plaquetas.<sup>29</sup>

### **3.3.8 Comentarios.**

*Allium cepa L*, es la segunda hortaliza más producida en el mundo después del tomate (*Lycopersicon esculentum*) (SAGARPA ,2004). En México, la cebolla ocupa el cuarto lugar de producción entre las hortalizas y se cultiva en casi todo el país y es el principal exportador de esta hortaliza a los EE.UU.

### **3.4 Método de extracción**

El método a utilizar depende del estudio que se le vaya a realizar y con base al objetivo que se tenga, por ejemplo, tradicionalmente la planta se prepara en soluciones acuosas y se debe mantener en condiciones similares en el laboratorio para el aislamiento de las sustancias.

La concentración de extractos se obtiene en la mayoría de los casos eliminando parcial o totalmente el solvente, esto se realiza al vacío mediante un rotavapor que destila el solvente controlando la presión y temperatura.

Finalmente los extractos que se obtienen los podemos encontrar del tipo fluido en donde el principio activo se encuentra en forma líquida, son menos estables al contacto con la luz, los extractos blandos tienen una consistencia semisólida estas son mezclas acuosas o hidroalcohólicas muy difíciles de manipular, finalmente los extractos secos, son producto de la evaporación total del solvente, suelen resultar higroscópicos, muy estables y fáciles para la preparación de una muestra a una concentración específica.<sup>30</sup>

### 3.5 Modelo animal

Los animales de laboratorio juegan un papel crucial en la investigación biomédica, ciertamente muchos avances ahora incorporados al cuidado de la salud en humanos, hubieran sido imposibles sin ellos.<sup>31</sup>

#### 3.5.1 Ratón CD1

Las líneas de roedores de laboratorio son el prototipo de líneas genéticas estandarizadas, debido a que presentan características bien definidas entre la población de una especie. Tal es el caso del ratón CD1, que se originó a partir de ratones suizos, dos machos albinos y siete hembras en una población no consanguínea, en el laboratorio del Dr. Coulon en Suiza. Estos animales fueron exportados a los Estados Unidos de América por la Dra. Clara Lynch del instituto Rockefeller en 1926, desde entonces ha sido ampliamente utilizado en estudios de toxicología, carcinogénesis, evaluaciones reproductivas,

El ratón CD1 (fig.3).se caracteriza por ser blanco (albino), pequeño, de fácil manejo y altamente reproductivo.



Fig. 3: Ratón CD1



Fig. 4: Ratón et/+



Fig. 5: Ratón et/et



### 3.5.2 Ratón CD1, et/+ y et/et.

Los ratones heterocigotos (Fig. 4), son fenotípicamente normales e inmunocompetentes al igual que el ratón CD1, mientras que los ratones et/et (Fig. 5) son inmunocomprometidos. Los ratones desnudos fueron descubiertos por primera vez en 1962 por el Dr. NR Grist en Brownlee laboratorio de virología del Hospital de Ruchill en Glasgow. Debido a que carecen de un timo, los ratones desnudos no pueden generar linfocitos T maduros. Por lo tanto no son capaces de montar la mayoría de los tipos de respuesta inmune<sup>32</sup>

- La formación de anticuerpos que requiere células T cooperadoras CD4 + y CD8 +.
- Las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado.
- La destrucción de células infectadas por virus.
- Rechazo de injerto.

El ratón desnudo et/et fue observado en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones de la cepa CD1 en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante el estudio de los ratones et/et se ha observado que en animales adultos, los machos se caracterizan por presentar un timo histológicamente igual al de los ratones normales, pero con un tamaño y peso menor, por lo que se les definió como hipotímicos, mientras que las hembras presentan un rudimento tímico, el cual se asemeja histológicamente a un nódulo linfoide, por lo que están catalogadas como

atímicas. Estudios recientes muestran que las características histológicas del timo en la hembra se presentan sólo en la etapa adulta, no en la prebúber.<sup>32, 33</sup>

Durante el desarrollo de la colonia se ha observado tanto en macho como en hembras, una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana, así como un incremento en la frecuencia de parasitosis por *Eimeria spp*, neumonías, uveítis (cataratas) y signos clínicos de envejecimiento prematuro.<sup>34, 35</sup>

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La integridad del sistema inmune es esencial para la defensa del organismo en contra de agentes infecciosos y sus productos. Defectos en una o más de las partes del sistema inmune son la causa de padecimientos graves. Estas enfermedades, conocidas en conjunto como inmunodeficiencias, pueden ser congénitas o adquiridas.

Las inmunodeficiencias congénitas se caracterizan por una mayor susceptibilidad a agentes infecciosos. Estos se manifiestan generalmente desde temprana edad, aunque en algunas ocasiones los síntomas pueden aparecer más tarde.

Las anomalías en el desarrollo y función de los linfocitos B se traducen por una producción de anticuerpos deficientes y por una mayor susceptibilidad a la infección por agentes patógenos. La maduración anormal y la activación defectuosa de los linfocitos T resulta en un inmunidad celular deficiente así como una mayor susceptibilidad a la infecciones por microorganismos intracelulares. El empleo de *Allium cepa L* como objeto de estudio en este proyecto permitirá analizar su participación en la activación de la respuesta inmune celular y humoral en un modelo de ratón CD1, et/+ y et/et.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto de la administración oral del extracto acuoso de *Allium cepa L* en algunos aspectos de la respuesta inmune.

### 5.2 Objetivo específicos.

- Obtener el extracto acuoso de *Allium cepa L*.
- Determinar la actividad fagocítica en células de cavidad peritoneal, mediante la técnica de NBT.
- Determinar las células formadoras de anticuerpo mediante la técnica de Jerne a los 7 días. (IgM).
- Determinar la producción de anticuerpos mediante la técnica de hemaglutinación a los 15 días (IgG).
- Medir las concentraciones de ceruloplasmina y nitritos en suero como indicador de un proceso de inflamación.

## 6. HIPÓTESIS.

Se espera que la administración oral de *Allium cepa L* tenga efectos en la respuesta inmune celular y en la respuesta humoral, en los ratones eutímicos +/+, portadores del gene et/+ y en los hipotímicos et/et.

## **7. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **7.1 Diseño de estudio**

- Tipo de Estudio: Experimental, prospectivo y longitudinal.
- Población de estudio: Ratones CD1, et/+, et/et.
- Criterios de inclusión: Ratones machos, de entre 35 y 40 g de peso.
- Criterios de exclusión: Ratones hembra, o aquellos ratones que presenten lesiones o infecciones.
- Criterios de eliminación. Aquellos ratones que desarrollen tumores o infecciones a lo largo del ensayo.
- Variables independientes: Tratamiento.
- Variable dependiente: Alteraciones en órganos.

## 7.2 REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIALES

<b>Reactivo</b>	<b>Proveedor</b>
Agarosa al 1%	Bloxon
Agua destilada	Theissier
Alcohol etílico al 70%	J.T. Baker
Azida de sodio	Sigma
Ácido clorhídrico	Merck
Citrato de sodio	Merck
Éter etílico	J.T. Baker
Extracto de <i>Allium cepa L</i>	Laboratorio 1 PA UMIEZ
Fosfato de sodio dibásico (PBS)	J.T. Baker
Glóbulos rojos de carnero	Laboratorio 1 PA UMIEZ
Suero de ratón CD1	Laboratorio 1 PA UMIEZ
Solución salina	Pisa
Piridina	J.T. Baker

<b>Equipo</b>	<b>Proveedor</b>
Agitador Vortex	Scientific Industries
Baño metabólico	Adam
Balanza analítica	Ohaus
Centrifuga Eppendorf	Tecno cor
Congelador	Tor rey

Estufa	Shel Lab
Micropipeta 5-40 $\mu$ L	Finnipipete
Micropipeta 10-100 $\mu$ L	Biohit
Pipeta automática	Jencons
Procesador de alimentos	Oster
Refrigerador	Mabe
Rotavapor	Yamato

<b><i>Material</i></b>	<b><i>Proveedor</i></b>
Tubos Eppendorf	AXYGEN
Embudo Buchner	KIMAX
Gradilla	Equipar
Matraz Erlenmeyer	KIMAX
Pipeta graduada	KIMAX
Sonda gástrica	Laboratorio 1 PA UMIEZ
Vaso de precipitado	KIMAX
Pipeta Pasteur	Biotech
Papel parafilm	American National Can
Cámara de Neubauer	American Optical Corporation
Placas de microtitulación	Beckton



## **8. MÉTODOS**

### **8.1 Preparación del extracto**

- La cebolla morada se pesó y cortó en rodajas, se trituró en un procesador de alimentos hasta tener una mezcla homogénea en agua destilada.
- La mezcla homogénea se colocó en un recipiente de 2L con tapa durante 24 hs. para después dejarlo reposar evitando la exposición a la luz y posteriormente filtrarlo por gravedad y al vacío.
- Una vez filtrado el extracto acuoso, se eliminó el disolvente a rotavapor, obteniendo un compuesto con el mínimo de humedad, a lo que posteriormente se procedió a secar y se mantuvo en refrigeración.<sup>30</sup>

### **8.2 Manejo de animales experimentales**

Se formaron cuatro grupos de ratones machos (prueba de Jerne y NBT) de 10 a 15 semanas de edad, de la cepa CD1, et/+ y et/et. Mantenidos en condiciones de bioterio durante los ensayos, con los controles de ciclos de luz y oscuridad, con cambios de viruta de madera cada tercer día con acceso de alimento y agua las 24 hs.<sup>31-33</sup>

El manejo, cuidado y tratamiento de los animales durante el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).<sup>34</sup>

### **8.3 Cuantificación de células formadoras de anticuerpo, por la técnica de Jerne.<sup>36</sup>**

1.- Se administró por sonda gástrica una dosis de 50 mg/kg del extracto acuoso de *Allium cepa L* a un grupo de 21 ratones que incluye 3 poblaciones diferentes (CD1, et/+, et/et), por un periodo de 30 días, calculando la dosis cada tercer día con base en la variación de peso en cada uno de ellos. Los animales testigos sólo recibieron solución salina.

2.-Se observó a los ratones diariamente para identificar alguna alteración fisiológica como pérdida de peso, sudoración, salivación, ataxia, muerte, etc.

3.- Se inocularon los ratones por vía intraperitoneal con 0.2 mL de una suspensión al 10% de glóbulos rojos de carnero, usando una jeringa tipo tuberculina 5 días antes del ensayo.

4.-Después se sacrificaron los animales y se realizó un corte en el plexo axilar (previamente anestesiados con éter). Se colectó la sangre en tubos Eppendorf y se centrifugaron las muestras para separar el suero y determinar el nivel de ceruloplasmina, nitritos y hemaglutinación.

5.- Se realizó la extracción del bazo y colocó en una caja Petri conteniendo 4 mL de medio mínimo esencial de Eagle (MEM).

6.- Se separaron las células del estroma del bazo, con la ayuda de un colador de malla fina y un tubo de ensaye de 13 x100 mm, se colectaron las células con la ayuda de una pipeta Pasteur en un tubo, se dejó sedimentar por un minuto y se transfirió el sobrenadante de células a un segundo tubo, de este último se realizó una dilución 1:20 en MEM. Se contaron las células nucleadas en una cámara de Neubauer.

7.- Se mezclaron alícuotas de 0.1 mL de las diluciones de las células, en un tubo que contenía 2 mL de agarosa al 0.6% en MEM y que se mantuvo en baño metabólico a 45° C y se adicionaron 0.2 mL de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10%, se

mezcló rápidamente en un vortex y se vació en las placas de Petri, dejando solidificar sin mover.

8.- Se incubaron las placas a 37° C por 45 minutos.

9.- Una vez transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a cada placa 2 mL de complemento de cobayo fresco diluido 1:10 en MEM.

10.- Se incubaron las placas a 37° C por 30 minutos. Una vez cumplido este tiempo se desechó el complemento diluido y fue sustituido por 2 mL MEM frío para detener la reacción.

11.- Se contó el número de células formadoras de placa y realizó el cálculo para reportarlas por millón y por bazo.

## 8.4 Reducción de nitro azul de tetrazolium (NBT).<sup>37</sup>

1.- Se administró por sonda gástrica una dosis de 50 mg/kg del extracto acuoso de *Allium cepa L* a un grupo de 21 ratones que incluye 3 poblaciones diferentes (CD1, et/+, et/et), por un periodo de 30 días, calculando la dosis cada tercer día con base en la variación de peso en cada uno de ellos. Los animales testigos recibieron sólo solución salina.

2.- Se observó a los ratones diariamente para identificar alguna alteración fisiológica como pérdida de peso, sudoración, salivación, ataxia, muerte, etc.

3.- Después se sacrificaron los animales y se realizó un corte en el plexo axilar (previamente anestesiados con éter). Se colectó la sangre en tubos Eppendorf y se centrifugaron las muestras para separar el suero.

4.- Se pesaron 10 mg de zymosan A y se resuspendió en 5 mL de agua destilada, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en un 1 mL de suero fresco. Se incubó a 37° C durante 20 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, al sedimento se le agrego 5 mL de Krebs-Henseleit y se mezcló, se centrifugó a 2000 rpm y el sedimento se resuspendió en 1mL de solución de Krebs-Henseleit.

5.- Preparación de NBT al 0.1%: se agrego 0.01 g de NBT en 10 mL de agua destilada, se mezcló y adicionó 0.085 g de cloruro de sodio.

6.- Se prepararon dos tubos de ensaye de 13 x 100 siliconizados (solución acuosa de sigmacote al 1%), uno para la fagocitosis y otro en reposo, para cada muestra de PMN.

7.- Se sacrificaron los ratones y con un algodón se mojó la zona abdominal, se quitó la piel y se realizó una pequeña incisión en la membrana peritoneal, se inyectaron 5 mL de solución salina citratada fría, los animales se agitaron vigorosamente y se extrajo el líquido de la zona peritoneal con una pipeta Pasteur en condiciones de esterilidad y se realizó una suspensión de células.

8.- Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y desecho el sobrenadante y al sedimento se adicionaron 4 mL de piridina y se resuspendieron todos los tubos (fagocitando y en reposo).

9.- Se realizó la lectura 515 nm, contra un blanco de piridina, y obtuvieron los valores de absorbancia.

### **8.5 Hemaglutinación.<sup>37</sup>**

1.- se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos y cada pozo se lavó con agua salina.

2.- Se realizó la preparación de los glóbulos rojos de carnero al 1% después de ser lavados con PBS.

3.-Posteriormente se colocó una gota de 50 µL de PBS en cada pozo de la placa de microtitulación y del pozo 1 al 12 usando una micropipeta tipo Ependorf.

4.- Se colocaron 50 µL de los sueros de los ratones (CD1, et/+, et/et) empezando con el pozo 1 y con la misma pipeta se mezcla en cada pozo y se pasan 50 µL al siguiente pozo haciendo las diluciones hasta el pozo 11 y dejando el pozo número 12 como control negativo de la prueba.

5.- Así mismo se colocaron 50 µL de la suspensión de los glóbulos rojos de carnero al 1% en cada pozo y mezclando muy bien.

6.- Se incubaron a 37° C por 30 minutos y se realizó la lectura de cada placa.

7.- Los títulos de aglutinación se reportaron como el inverso de la dilución.

## 8.6 Cuantificación de ceruloplasmina.<sup>38</sup>

Es una inmunoprecipitación en agarosa entre la ceruloplasmina del ratón y su anticuerpo homólogo (anticeruloplasmina de ratón obtenida en conejo).

El antígeno se difunde radialmente en la mezcla gel y su concentración se relaciona directamente con la medida del diámetro del anillo de precipitación, el valor obtenido se interpola en una curva estándar.<sup>18</sup>

1.- Se pesó 0.2 g de agarosa y se añadieron 20 mL de PBS, para obtener una solución al 1% también se agregó una pizca de azida de sodio y se fundió en el horno de microondas durante ciclos 10 segundos.

2.- En un baño metabólico a 45° C se colocaron 5 tubos de ensayo, y se les añadieron 2 mL de agarosa al 1%.

3.-Posteriormente se añadieron a los tubos 150 µL de anticeruloplasmina y agitaron en el Vortex, se vaciaron en una placa de Falcon, evitando la formación de burbujas hasta solidificar, a continuación se perforaron cuatro hoyos con un sacabocado en los cuatro puntos cardinales.

4.- En cada pozo se colocó 5 µL del suero problema (CD1, et/+, et/et) se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 minutos y se guardaron en refrigeración.

5.-Se realizó la lectura de las placas a las 48 horas.

## 8.7 Determinación de nitritos por el método de Griess.<sup>39</sup>

### Método

Plateado del cadmio para reducir nitratos a nitritos.

1. A 30 tubos de 13x100 se colocaron 0.5 g de cadmio metálico, el cadmio se plateó agregando 2 mL de solución acuosa de sulfato de cobre al 15% y agitar por 10 minutos.

En una plataforma de agitación (rocker platform).

2. Se lavaron 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre, centrifugando a 3500 rpm por 5 minutos.
3. Se hizo un último lavado con HCl 0.1 N para remover el hidróxido de cadmio, centrifugando a 3500 rpm durante 5 minutos.
4. Después se lavó el cadmio con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 5% a un pH 9, acompañado con borato de sodio.

### Preparación de la muestra

- 1.- A los 100  $\mu\text{L}$  de las muestras de suero obtenidas de los ratones (CD1, et/+, et/et) se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se agitaron.
- 2.- Se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinc, se mezcló y posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 minutos.
- 3.- A los tubos con cadmio activado se le tiró el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (provenientes del paso 4 del plateado de cadmio) y se adiciono el sobrenadante de la centrifugación del paso 1.

4.-Los tubos se taparon con Parafilm y se colocaron en una plancha de agitación horizontal por 15 minutos.

5.- Se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos, se tomó 200  $\mu$ L del sobrenadante para el ensayo de la muestra siguiente.

6.- Se preparó una solución de 2  $\mu$ g/mL de nitrito de sodio

7.-Posteriormente se determinó la concentración de nitritos en el suero problema y se reportaron los resultados con la utilización de la curva patrón de nitrito de sodio.

#### **Curva patrón para determinación de nitritos por la técnica de Griess**

Tubo	Estándar $\mu$ L	Agua destilada $\mu$ L
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestra	200 del sobrenadante	700
Adicionar 50 $\mu$ L de sulfanilamida. Incubar 10 minutos.		
Adicionar 50 $\mu$ L del reactivo de NED, mezclar e incubar por 30 minutos.		
Leer a 540 nm.		



## 8.8. Técnicas de laboratorio

- **Índices relativo**

- Se pesaron los ratones antes de ser sacrificados
- Después de sacrificar los animales se extrajeron los órganos (bazo, corazón, hígado y riñón) y se peso cada uno de ellos para obtener la relación de peso órgano/ratón.
- Se realizó el siguiente calculo:

$(\text{Peso del órgano} / \text{Peso del ratón}) \times 100 = \text{Peso relativo de los órganos.}$

Esto nos permitió realizar una comparación de medias de los grupos tratados con los testigos, buscando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), que nos ayudo a determinar si existe algún daño en los órganos involucrados.

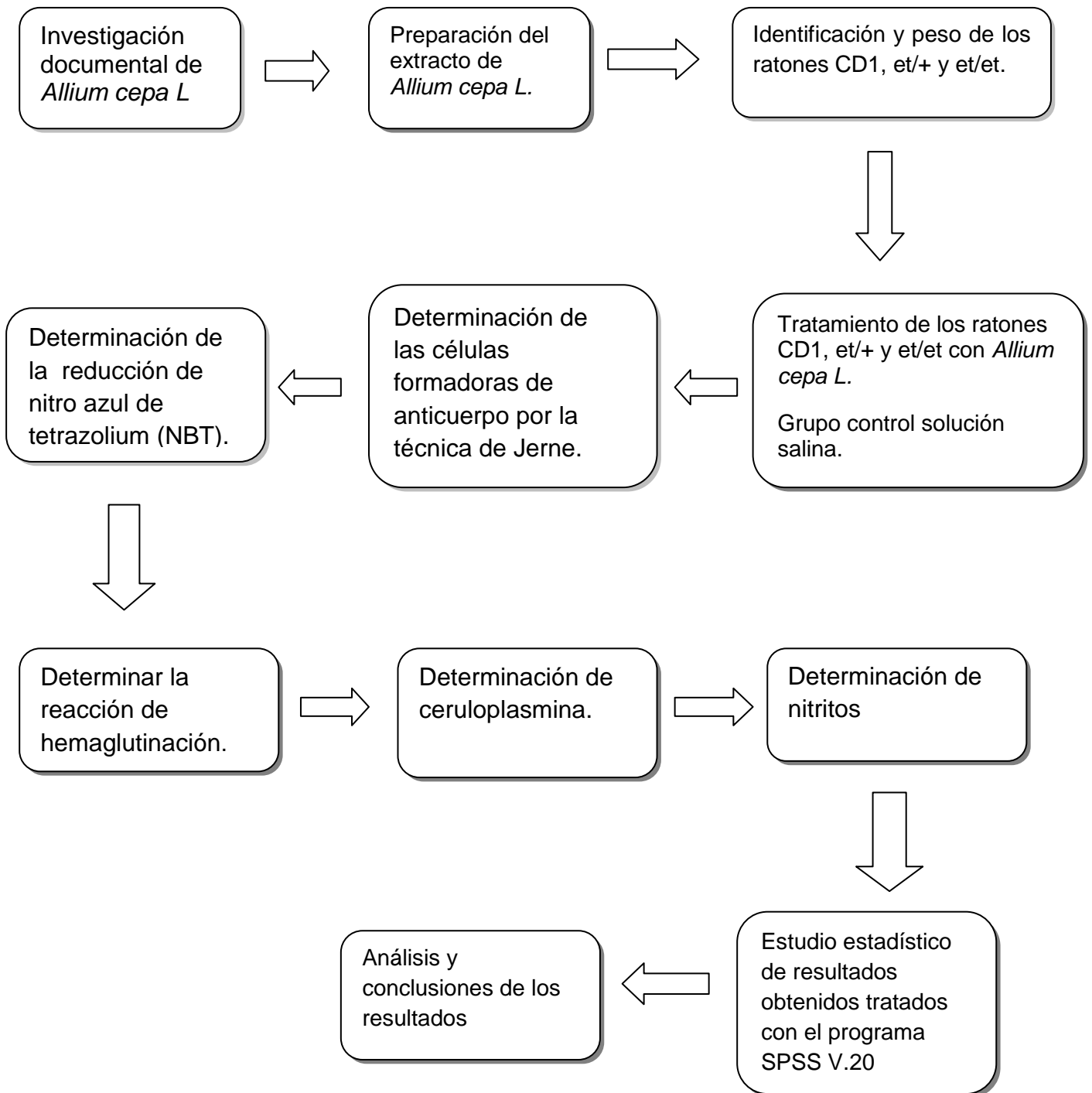
## 8.9 Diseño estadístico

El estudio estadístico de los datos obtenidos se llevo a cabo en el programa SPSS para ambiente de Windows V.21 mediante un análisis de varianza para datos paramétricos, Anova.<sup>40</sup>

En las pruebas paramétricas se aplicó el criterio de homogeneidad de varianza ( $p < 0.05$  por la prueba de Bartlett) y que los datos mostraron una distribución normal; mientras que la no paramétrica se aplicó cuando no hubo homogeneidad de varianza ( $p < 0.05$  por la prueba de Bartlett) o que no se cumpliera el supuesto de normalidad de los datos.

Mediante el uso del programa de Sigma Plot versión 12 para Windows se obtuvieron las siguientes gráficas que se presentan en los resultados.

## 9. DIAGRAMA



## 10. RESULTADOS

### 10.1 Extracto

La cantidad de extracto sólido que se obtuvo a partir del bulbo de *Allium cepa L* que inicialmente peso 372.5g fue de 33.3g por lo que se determinó que el rendimiento de la extracción fue de 8.9%.

### 10.2 Índice relativo

Considerando que la administración de cualquier sustancia puede generar daños asociados a lesiones en algunos órganos involucrados (hígado, riñón, corazón y bazo) que trae por resultado alteraciones en sus funciones fisiológicas, se realizó la extracción de estos órganos con una muestra de 30 ratones, 7 desnudos (et/et), 8 portadores (et/+), 8 progenitores(+/+) y 7 ratones testigos (CD1), se realizó un análisis estadístico, este se hizo por medio del peso relativo de cada órgano en relación al peso corporal del ratón, llamado índice relativo en el que se encontró una diferencia estadística para el bazo ( $p=0.02$ ) y para el riñón ( $p=0.01$ ) con respecto a los ratones testigos (cuadro 1, gráfica 1 y 2).

Cepas	Ratones
Desnudos	et/et
Portadores	et/+
Progenitores	+/+
Testigos	CD1

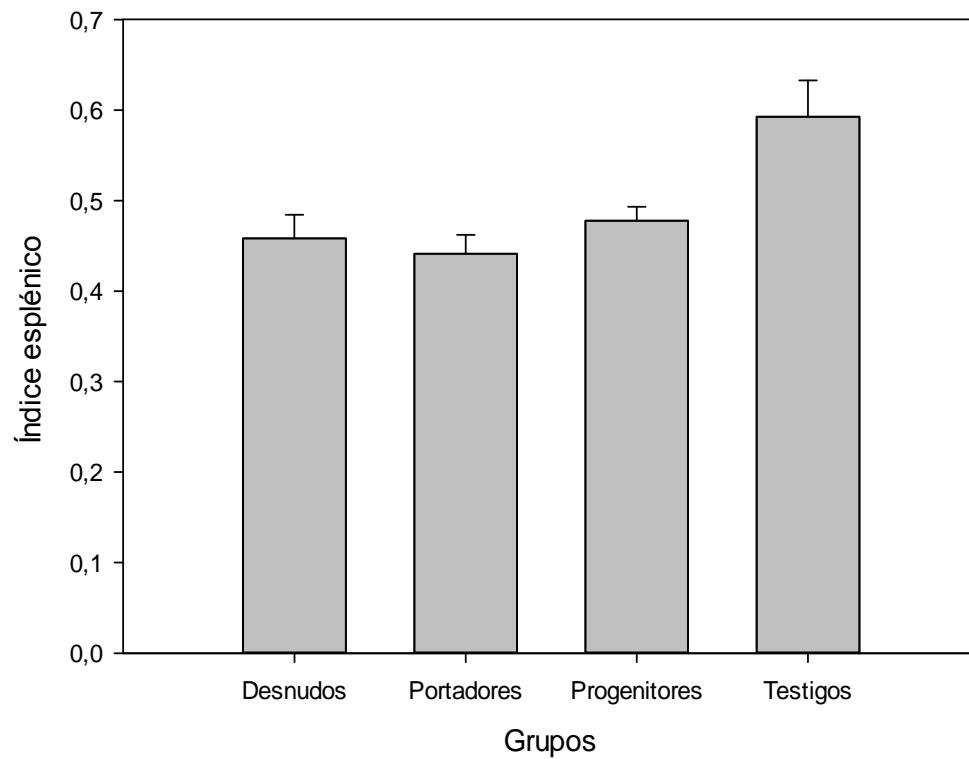
### 10.2.1 Comparación de medias con respecto al índice de cada órgano.

	Índice	N	Media	Error típico	Significancia
Bazo	Desnudos	7	,45829	,026079	0,002
	Portadores	8	,44125	,020874	
	Progenitores	8	,47775	,015527	
	Testigos	7	,59257	,040252	
Corazón	Desnudos	7	,54814	,026836	0,232
	Portadores	8	,53650	,024488	
	Progenitores	8	,51350	,026597	
	Testigos	7	,46400	,039344	
Riñón	Desnudos	7	1,80657	,055162	0,001
	Portadores	8	1,73150	,037368	
	Progenitores	8	1,45700	,053318	
	Testigos	7	1,28686	,075687	
Hígado	Desnudos	7	5,92386	,253637	0,956
	Portadores	8	6,07375	,301105	
	Progenitores	8	6,05575	,145592	
	Testigos	7	6,13786	,343524	

*Cuadro 1. Presenta el análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey como Post hoc. La diferencia de las medias es significativa a  $p < 0.05$  con una confianza del 95%.*

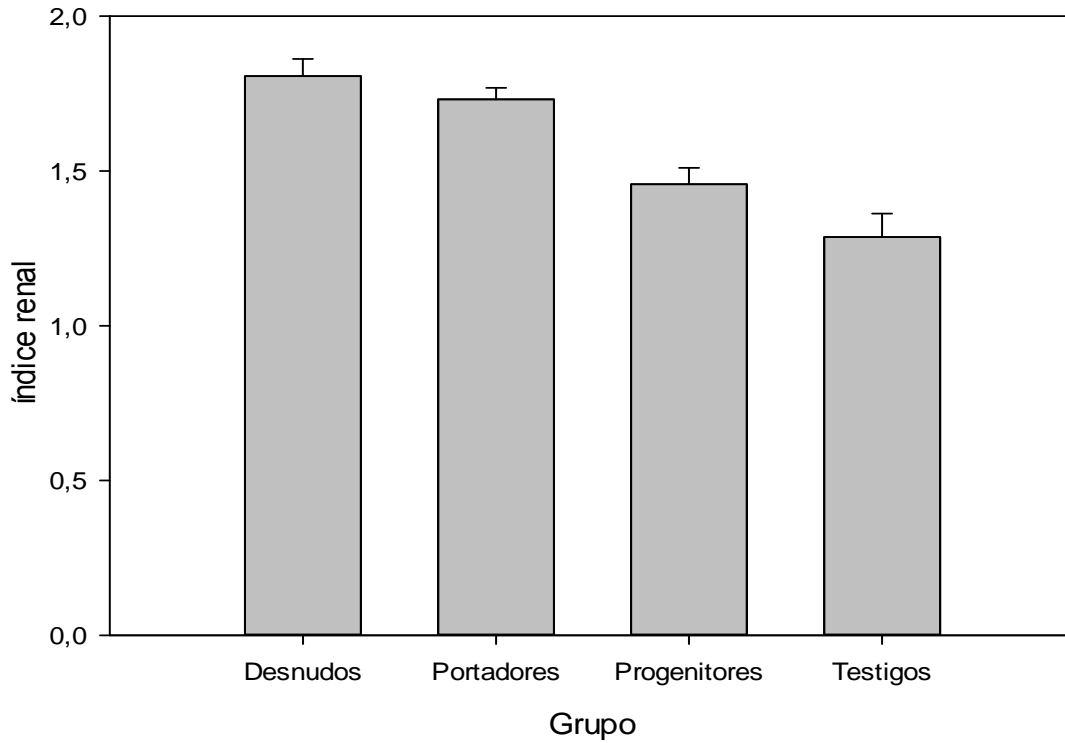
### 10.2.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para índice relativo del bazo.

Usando el programa Sigma Plot versión 12.0 para Windows se obtuvieron las siguientes gráficas.



Gráfica 1. Los valores representa las medias del índice esplénico de ambos grupos de ratones, contrastados con su error típico, obteniendo una diferencia significativa  $p=0.002$  (ANOVA).

**10.2.4 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para índice relativo del riñón.**



*Gráfica 2. . Los valores representa las medias del índice renal de ambos grupos de ratones, contrastados con su error típico, obteniendo una diferencia significativa  $p=0.001$  (ANOVA).*

### 10.3 Células formadoras de anticuerpo

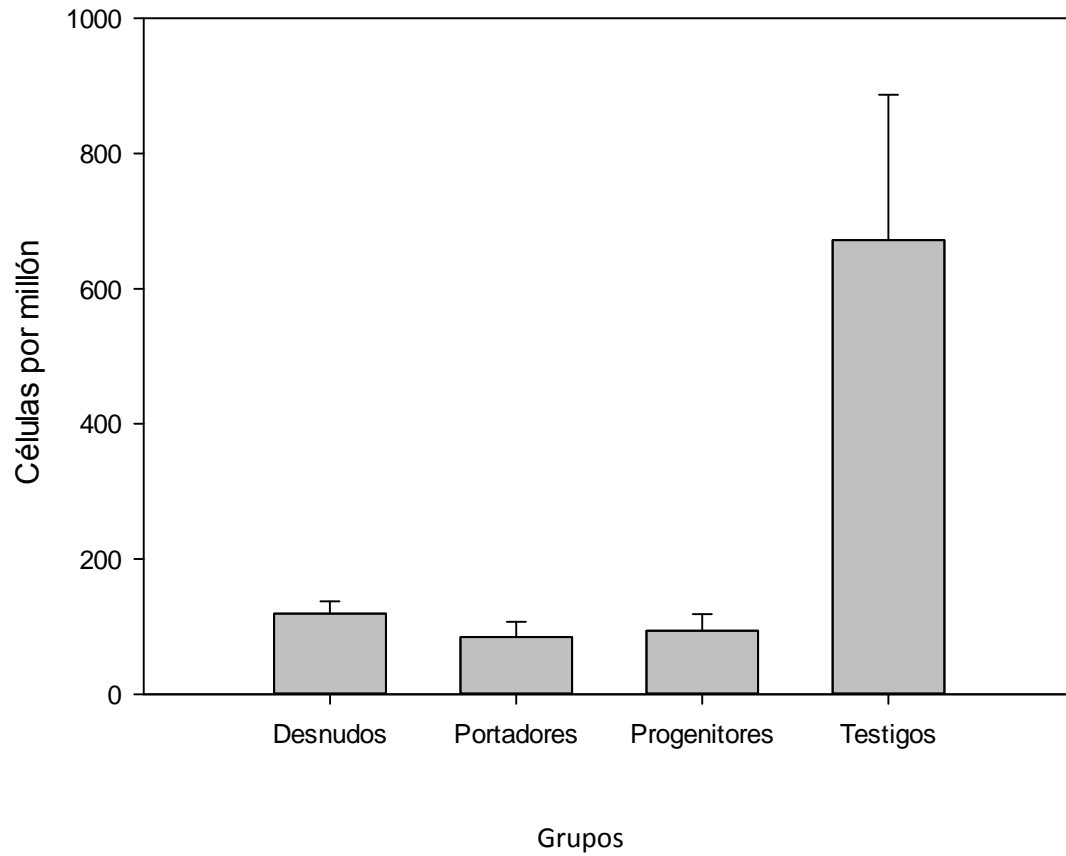
Con la finalidad de evaluar la respuesta primaria (IgM) en los ratones administrados con el extracto se utilizó un grupo de 28 ratones, 7 de cada grupo incluyendo el grupo testigo y utilizando el método descrito por Jerne. Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico mostraron un menor número de CFA/millón de células nucleadas en los animales tratados, indicando una diferencia significativa ( $p=0.02$ ) en comparación con los animales testigos y coincidiendo con los valores obtenidos en CFA/bazo ( $p=0.01$ ) ya que los valores son menores  $p<0.05$  (cuadro 2, gráficas 3 y 4).

#### 10.3.1 Comparación de medias de las CFA/millón de células nucleadas y CFA/bazo.

	CFA	N	Media	Error típico	Significancia
Millón	Desnudos	7	119.1943	18.03704	0.002
	Portadores	7	84.5657	22.47446	
	Progenitores	7	108.0814	28.04053	
	Testigos	7	671.8014	215.11262	
Bazo	Desnudos	7	10400.0000	2289.52064	0.001
	Portadores	7	9257.1429	2227.83871	
	Progenitores	7	6971.4286	1519.04016	
	Testigos	7	65714.2857	9163.78557	

*Cuadro 2. Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey como Post hoc. La diferencia de las medias es significativa a  $p<0.05$  con una confianza del 95%.*

**10.3.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para las CFA/millón de células nucleadas.**



*Gráfico 3. Representa las medias de las CFA/millón de células nucleadas contrastadas con su error típico teniendo una diferencia significativa ( $0.002 < 0.05$ ) con respecto al grupo testigo.*



### 10.3.3 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para las CFA/bazo.

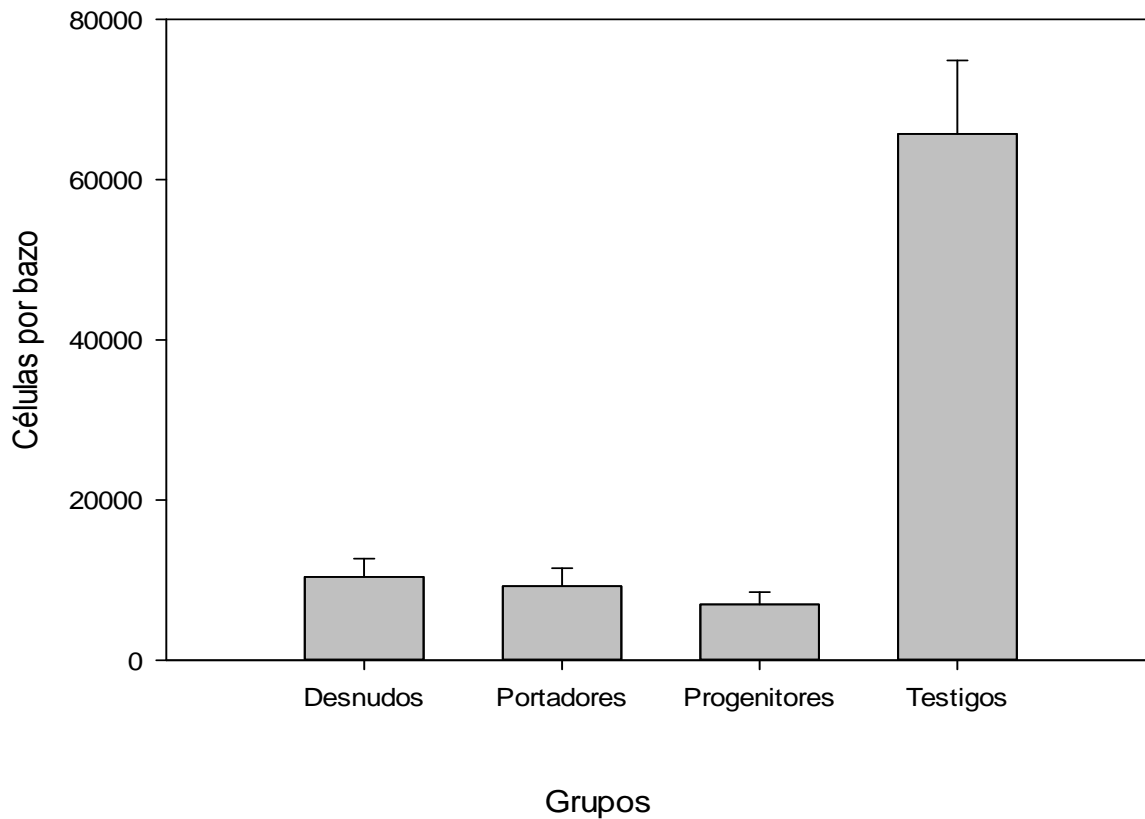


Gráfico 4. Representa las medias de las CFA/bazo contrastadas con su error típico teniendo una diferencia significativa ( $p = 0.002$ ) con respecto al grupo testigo.

## 10.4 Hemaglutinación

Con el propósito evaluar el estímulo antigénico y la producción in vitro de anticuerpos por las células B y la posterior medición anticuerpos secretados por los ratones, con un total de 30 muestras de suero de ratón, 7 desnudos (et/et), 8 portadores (et/+), 8 progenitores (+/+) y 7 testigos (CD1), los resultados obtenidos revelaron mayores títulos en los ratones administrados con el extracto *Allium cepa L* mostrando una diferencia significativa de  $p=0.012$  en comparación con aquellos que se tomaron como grupo testigo (cuadro 3, gráfica 5).

### 10.4.1 Representa las medias del inverso del título en hemaglutinación

Cepas	N	Media	Error típico	Significancia
Desnudos	7	68.57	10.882	
Portadores	8	69.00	18.075	0.012
Progenitores	8	30.00	7.672	
Testigos	7	21.71	3.790	

*Cuadro 3. Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey como Post hoc. La diferencia de las medias es significativa a  $p<0.05$  con una confianza del 95%.*

### 10.4.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) del inverso del título en hemaglutinación.

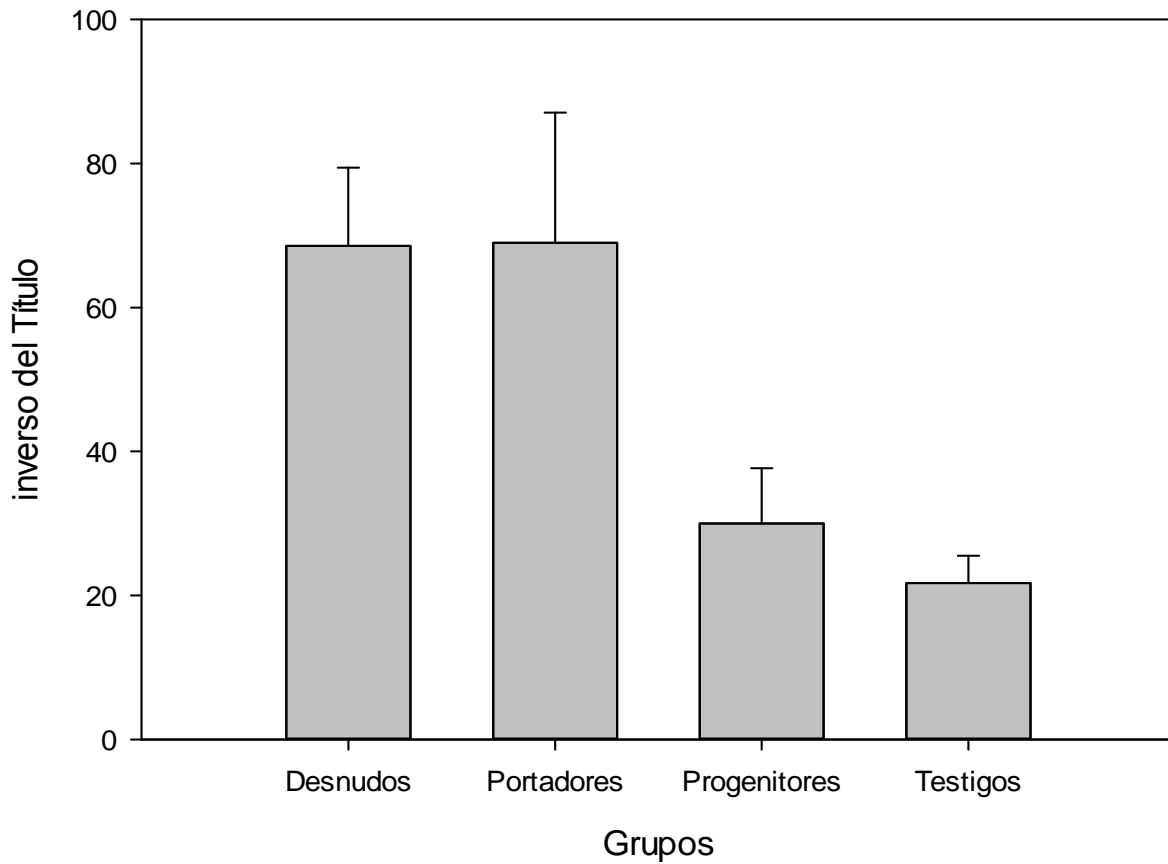


Gráfico 5. Representa las medias del inverso de la dilución del título en hemaglutinación en ambos grupos de ratones contrastados con su error típico teniendo una diferencia significativa  $p=0.012$  con respecto al grupo testigo.

## 10.5 Células de cavidad peritoneal.

Con la intención de medir la cantidad de células monocito-macrófago como primera línea de defensa contra agentes patógenos, estas células se originan en la médula ósea a partir de las células formadoras de granulocitos-monocitos (GM-CFU) de la serie mieloide, se realizó un exudado peritoneal con un grupo de 30 ratones, 7 desnudos (et/et), 8 portadores (et/+), 8 progenitores (+/+) y 7 testigos (CD1), los resultados obtenidos mostraron que los animales tratados tuvieron una menor cantidad de células en cavidad peritoneal cuando se compara con los animales testigos indicando un efecto antiinflamatorio del extracto administrado.

### 10.5.1 Comparación de medias de las células de cavidad peritoneal.

Cepas	N	Media	Error típico	Significancia
Desnudos	7	987.00	33.80	
Portadores	8	737.50	22.65	0.001
Progenitores	8	650.00	75.59	
Testigos	7	1557.14	181.26	

*Cuadro 4. Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey como Post hoc. La diferencia de las medias es significativa a  $p < 0.05$  con una confianza del 95%.*

### 10.5.2 Gráfico de las medias significativas ( $p < 0.05$ ) para las células de cavidad peritoneal.

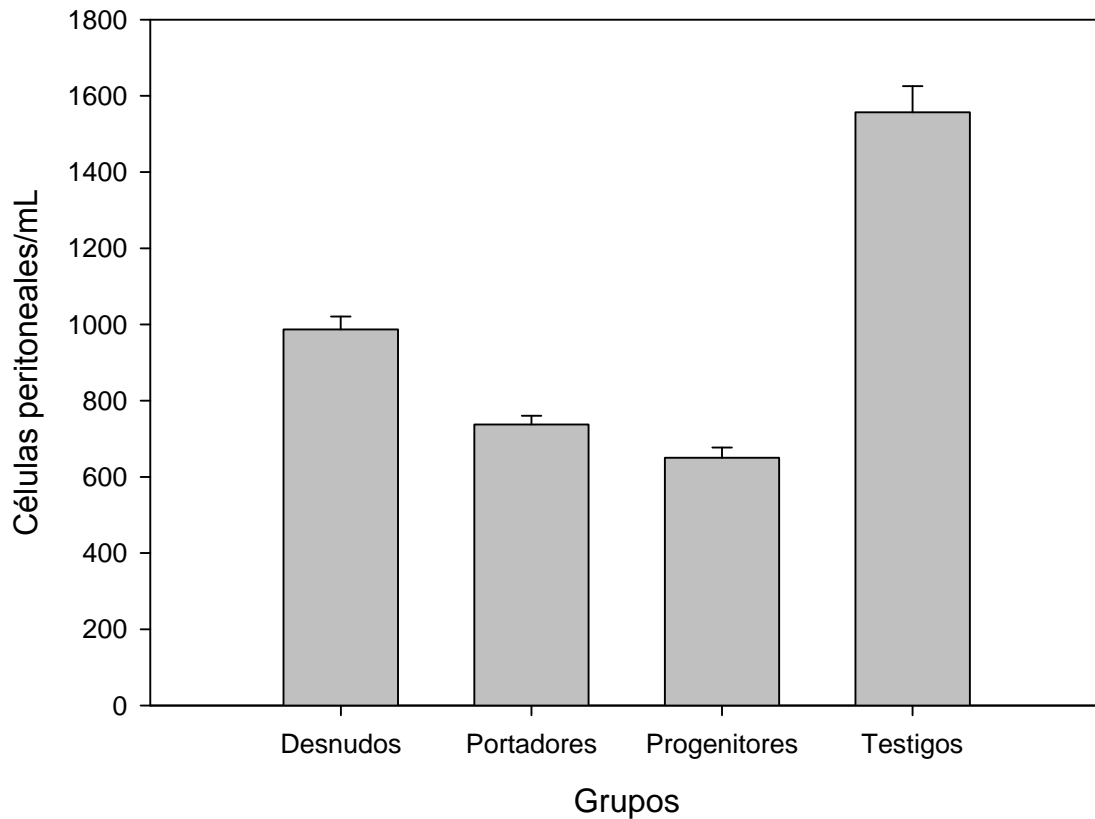


Gráfico 6. Representa las medias en las células de cavidad peritoneal en ambos grupos de ratones contrastados con su error típico teniendo una diferencia significativa  $p=0.001$  con respecto al grupo testigo.

## 11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con base en los resultados del presente estudio, se encontró que el índice esplénico representado en la gráfica 1, no muestra diferencia estadística significativa con respecto a la media de las tres especies de ratones *et/et*, *et/+* y *+/+* que fueron tratados con el extracto de *Allium cepa L*, sin embargo, esta es menor con respecto a la media obtenida por parte de los ratones utilizados como testigos. El índice esplénico menor en los animales tratados nos sugiere un efecto anti-inflamatorio del extracto de *Allium cepa L*. En la gráfica número 2 el análisis estadístico no mostró ninguna diferencia significativa entre los grupos lo que nos indica que el tratamiento con *Allium cepa L* no tiene efecto en el índice renal. En las gráficas 3 y 4 se puede observar que los ratones tratados responden a una regulación inmunológica teniendo un menor número de células formadoras de anticuerpo. Este extracto tiene efecto sobre la calidad de la respuesta inmune ya que en la gráfica 5 se observa que los animales tratados que tuvieron menor cantidad de CFA muestran un título mayor de anticuerpos en una respuesta secundaria, en relación al grupo testigo. En la gráfica número 6 tenemos la cuantificación de macrófagos peritoneales y los animales tratados mostraron menor cantidad de células en cavidad peritoneal cuando se compara con los resultados de los animales testigos, esto nos sugiere un efecto antiinflamatorio del extracto. Por otro lado los resultados encontrados en la cuantificación de ceruloplasmina sérica (proteína de fase aguda), los niveles de nitritos, indicadores de la generación de óxido nítrico, debido a que los nitritos y nitratos son las formas estables del óxido nítrico, así como la capacidad de las células peritoneales de reducir el NBT, nos indican que la administración diaria del

extracto acuoso de *Allium cepa L* no tuvo efecto tóxico ni pro-inflamatorio, en los parámetros estudiados.

## 12. CONCLUSIONES

- La administración del extracto acuoso de *Allium cepa L* tiene efecto inmunoregulador.
- El extracto acuoso de *Allium cepa L* presenta efecto anti-inflamatorio.
- La administración del extracto acuoso de *Allium cepa L* no muestra signos de ser tóxico, ni pro-inflamatorio, en el modelo y animales usados.



## **13. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS**

- Realizar un estudio fitoquímico para determinar específicamente cuales son las sustancias que inducen tales efectos.
- Realizar una separación electroforética de las proteínas séricas de los ratones tratados para determinar si existe estados patológicos en las proteínas séricas.

## 14. REFERENCIAS

1. Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, et al. Inmunología Básica y Clínica. 5a ed. México: El manual moderno; 1985.
2. Rojas E. Inmunología de memoria. 2a ed. México: Panamericana; 2001.
3. Goldsby R, Kindt T J, Osborne B A, et al. Inmunología. 5a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
4. Rosenstein Y, García E, Becker I. Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune adquirida [libro electrónico]. México: Departamento de inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas; 2013 [Consultado: 5 Mayo de 2013]. Disponible en:  
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/cursosviejos/bcelularI102/bcelular/capitulo%20Mc%20Graww%20.pdf>
5. Margni R. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. 5a ed. Buenos Aires: Panamericana; 1996.
6. Bondada S, Darrell A. Assays for B lymphocyte function. Current Protocols in immunology. 2003; 3:3-8.
7. Mond J, Brunswick M. In vitro Antibody Production. Current Protocols in Molecular Biology. 2001; 50:11-13.
8. Söderqvist T. The life and work of Niel Kaj Jerne as a Source of Ethical Reflection. Scandinavian Journal of immunology. 2002; 55(6):539-545.
9. Mendoza M, Garcia G, Arce P, Gonzales C, Del Rey G, Rojas O. Functional state analysis of phagocytic cells of patients with type 2 diabetes and pulmonary tuberculosis. Clin Lab. 2012; 58(3-4): 299-305.
10. Manrique O, Romero H, Barrios M, Muñoz J. Evaluation of the activity of polymorphonuclear neutrophils against Entamoeba histolytica antigens. Rev Cubana Med Trop. 2002; 54:96-100.
11. Ahmad S, Habib S, Moinuddin, Ali A. Preferential recognition of epitopes on AGE-IgG by the autoantibodies in rheumatoid arthritis patients. Hum Immunol. Jan 2013; 74(1):23-27.

12. Ghule B, Yeole P. In vitro and in vivo immunomodulatory activities of iridoids fraction from *Barleria Prionitis* Linn. *J Ethnopharmacol.* 2007; 141(1):424-431.
13. Bercovitz R, Macy M, Ambruso D. A case of autoimmune hemolytic anemia with anti D specificity in a 1-year-old child. *Immunohematology.* 2013 ;( 1):15-18.
14. El Lenz H, Eirá A, Le P, Thierry C, Valsamos J, Acerad M, et al. Transfusion support of autoimmune hemolytic anemia: how could the blood group genotyping help? *Trans Res.* 2013.
15. Sached B, Matalan K, Nydegger U, Weigel G, Gresmacher A, Risch L. Anti-red blood cell antibodies, free light chains, and antiphospholipid antibodies in intravenous immunoglobulin preparations. *Isr Med Assoc J.* Oct 2013;15(10):617-21.
16. Tapper E, Rahni D, Arnaout R, Lai M. The overuse of serum ceruloplasmin measurement. *An J Med.* Oct 2013; 126(10):926.
17. Swart C. Metrology for metalloproteins--where are we now, where are we heading? *Anal Bioanal Chem.* Jul 2013; 405(17):5697-723.
18. Mina R, Suzuki M, Petri M, Pendl J, Witte D, Ying J, et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* Aug 2012; 64(8):2687-97.
19. Schimmel H, Zegers I, Emons H. Standardization of protein biomarker measurements. *Scand J Clin Lab invest Supl.* Jul 2010; 242:27-33.
20. Yang D, Liu B, Hou X, Jiao D, Li X, Wen L, et al. Pre-treatment with *Mycobacterium avium*-derived lipids reduces the macrophage response to interferon  $\gamma$  in BCG-vaccinated mice. *J Med Microbiol.* Jul 2013;62(7):980-7.
21. Zhang D, Liu D, Bian K, Yang X. Study on invitro anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its ingredients. *Zhonqquo Zhong Yao Za Zhi.* Jan 2013;38(1):99-104.
22. Jung J, Shin K, Lee Y, Shin J, Park E, Jeong J, et al. Anti-inflammatory mechanism of exogenous C2 ceramide in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *Biochim Biophys Acta.* Jun 2013;1831(6):1016-26.
23. Hammami L, Bertrand M, Chen J, Bronte V, De Crescenzo G, Jolicoeur M. Nitric oxide affects immune cells bioenergetics: long-term effects of nitric-oxide derivatives on leukaemic Jurkat cell metabolism. *Immunobiology.* 2012; 217(8):808-15.

24. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy. 15 ed. United States: Bailliere Tindall; 2002.
25. Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet].2009 [citado 15 de Abril de 2013]; Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
26. Quintana ME, Robledo A, Santacruz A, Gutiérrez A. Regeneración in vitro de plantas de cebolla (*Allium cepa* L). Agrociencia. 2005;39 (006):647-655.
27. Raigón M. El nivel de pungencia de las cebollas. Horticultura Internacional. Febrero 2006;10(09):408-412.
28. Patra P, Sen I, Bhanja S, Samanta S, Das D. Pectic polysaccharide from immature onion stick (*Allium cepa*): structural and immunological investigation. Carbohydr Polym 2013;92(1):345-52.
29. Mantawy M, Ali H, RizK M. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. May-Jun 2011;53(3):155-63.
30. Cosme I. El uso de las plantas medicinales. Revista Intercultural [Internet]. Enero 2008 [citado 7 de Mayo de 2013]; 23-26p. Disponible en: [http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6\\_p23-26\\_2010-0.pdf](http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6_p23-26_2010-0.pdf)
31. Zuñiga J, Tur M, Milocco S, et al. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal.1a ed. México: Mc Graw–Hill interamericana; 2001.
32. Marroquín R, Lara MA, Calvillo ER, Mora JL, Flores PM. Exocrinopathy in the CD1 et/et hypothymic mouse resembling Sjogren syndrome. Veterinaria. 2002; 34: 129-1421.
33. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. Biomedicina (Centro de Investigaciones Biomédicas). Dic 2006;2(3):252-59.
34. Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Jun 2001; Diario Oficial de la Federación. 36-48.
35. Carbone C, Maschi F. El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia [internet]. 2006 abril [citado 8 de Mayo de 2013];12(3):19-23. Disponible en:

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/>

- 36.** Marroquín R, Mora J L, Flores Y, Flores M, Hernández J. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología e inmunología para el área de la salud. FES Zaragoza, UNAM: 2009.
- 37.** Marroquín R, Flores M. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. FES Zaragoza, UNAM. 2007.
- 38.** Yapur V M, Bustos FM, Gonzales A S, Negri G A. Ceruloplasmina determinación de su actividad ferroxidasa. Acta de bioquímica clínica Latinoamericana. 2007. 351 p.
- 39.** Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD. Métodos de laboratorio. 2a ed. México: Interamericana; 1969.
- 40.** Castañeda M, Cabrera F, Navarro Y, Vries W. Procesamiento de datos y análisis estadísticos utilizando spss [Libro electrónico].Brasil: Edipucrs; 2010 [Consultado: 5 Junio 2013]. Disponible en:  
<http://www.pucrs.br/edipucrs/spss.pdf>

## 15. ANEXOS

### 1. Resultados no significativos ( $p > 0.05$ ) de las absorbancias obtenidas en la prueba reducción de NBT por espectrofometría.

#### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Fagocitosis	29	,07983	,017758	,045	,118
Reposo	29	,04683	,023019	,011	,105
Cepas	29	2,5172	1,12188	1,00	4,00

#### Rangos

Cepas		N	Rango promedio
Fagocitosis	Desnudos	7	15,86
	Portadores	7	17,14
	Progenitores	8	16,75
	Testigos	7	10,00
	Total	29	
Reposo	Desnudos	7	15,43
	Portadores	7	8,86
	Progenitores	8	17,25
	Testigos	7	18,14
	Total	29	

#### Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>

	Fagocitosis	Reposo
Chi-cuadrado	3,272	5,177
Gl	3	3
Sig. asintót.	,352	,159

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Cepas

## 2. Resultados no significativos ( $p > 0.05$ ) en el ensayo de ceruloplasmina.

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Ceruloplasmina	30	48,5100	4,10293	40,50	59,40
Cepa	30	2,5000	1,10641	1,00	4,00

### Rangos

cepa		N	Rango promedio
Ceruloplasmina	Desnudos	7	14,79
	Portadores	8	21,38
	Progenitores	8	12,69
	Testigos	7	12,71
	Total	30	

### Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>

	Ceruloplasmina
Chi-cuadrado	5,561
Gl	3
Sig. asintót.	,135

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: cepa

### 3. Tabla de resultados no significativos ( $p > 0.05$ ) en el ensayo de nitritos.

#### Rangos

Cepas		N	Rango promedio
Concentración	Desnudos	7	12,29
	Portadores	8	17,75
	Progenitores	8	15,88
	Testigos	5	10,20
	Total	28	

#### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Concentración	28	4,50136	3,137210	1,312	14,500
Cepas	28	2,39286	1,065947	1,000	4,000

#### Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup>

	Concentración
Chi-cuadrado	3,346
Gl	3
Sig. asintót.	,341

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Cepas





Figura 6. Célula formadora de anticuerpo de ratón CD1.

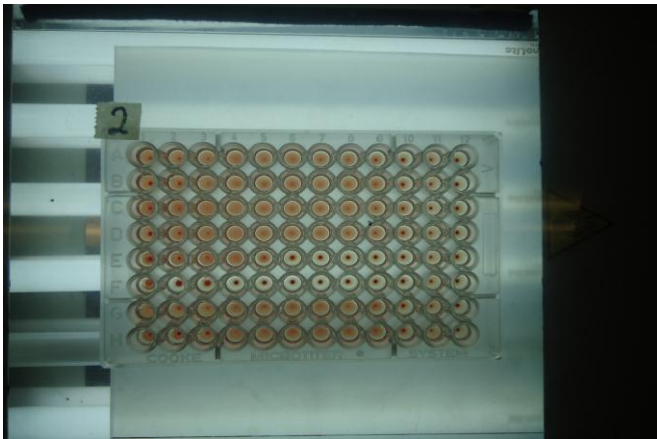


Figura 7. Placa de microtitulación muestra de ratones et/+.



Figura 8 y 9 Muestras de los PMN de cavidad peritoneal en fagocitosis y en reposo de los ratones CD1 en la práctica de NBT.