



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del efecto inmuno-regulador del
extracto acuoso de *Astragalus radicans* en
ratones CD1**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

CALDERÓN CHÁVEZ KAREN MONSERRAT

Director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor de tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara



CDMX

2019



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.

Después de algún tiempo aprenderás la diferencia entre dar la mano y socorrer a un alma, y aprenderás que amar no significa apoyarse, y que compañía no siempre significa seguridad.

Comenzarás a aprender que los besos no son contratos, ni regalos, ni promesas, comenzarás a aceptar tus derrotas con la cabeza erguida y la mirada al frente, con la gracia de un adulto y no con la tristeza de un niño.

Y aprenderás a construir hoy todos tus caminos, porque el terreno de mañana es incierto para los proyectos y el futuro tiene la costumbre de caer en el vacío. Después de un tiempo aprenderás que el sol quema si te expones demasiado, aceptarás que incluso, las personas buenas podrían herirte alguna vez y necesitarás perdonarlas.

Aprenderás que hablar puede aliviar los dolores del alma. Descubrirás que lleva años construir confianza y apenas unos segundos destruirla, y que tú también podrás hacer cosas de las que te arrepentirás el resto de la vida.

Descubrirás que muchas veces tomas a la ligera a las personas que más te importan y por eso siempre debemos decir a esas personas que las amamos, porque nunca estaremos seguros de cuándo será la última vez que las veamos.

Aprenderás que las circunstancias y el ambiente que nos rodea tienen influencia sobre nosotros, pero nosotros somos los únicos responsables de lo que hacemos. Comenzarás a aprender que no nos debemos comparar con los demás, salvo cuando queramos imitarlos para mejorar.

Descubrirás que lleva mucho tiempo llegar a ser la persona que quieres ser, y que el tiempo es corto. Aprenderás que no importa a donde llegaste, sino a donde te diriges y si no lo sabes, cualquier lugar sirve. Aprenderás que si no controlas tus actos, ellos te controlaran y que ser flexible, no significa ser débil o no tener personalidad, porque no importa cuán delicada y frágil sea una situación, siempre existen dos lados.

Aprenderás que hay mucho más de tus padres en ti de lo que supones. Aprenderás que nunca se debe decir a un niño que sus sueños son tonterías, porque pocas cosas son tan humillantes y sería una tragedia si lo creyese porque le estarás quitando la esperanza.

Aprenderás que cuando sientes rabia, tienes derecho a tenerla, pero eso no te da el derecho de ser cruel. Descubrirás que solo porque alguien no te ama de la forma que quieres, no significa que no te amé con todo lo que puede, porque hay personas que nos aman, pero que no saben cómo demostrarlo.

No siempre es suficiente ser perdonado por alguien, algunas veces tendrás que aprender a perdonarte a ti mismo. Aprenderás que no importa en cuantos pedazos tu corazón se partió, el mundo no se detiene para que lo arregles. Aprenderás que el tiempo no es algo que pueda volver hacia atrás, por lo tanto, debes cultivar tu propio jardín y decorar tu alma, en vez de esperar que alguien te traiga flores.

Entonces y solo entonces sabrás realmente lo que puedes soportar; que eres fuerte y que podrás ir mucho más lejos de lo que pensabas cuando creías que no se podía más.

William Shakespeare

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme un lugar dentro de ella para realizar y concluir mis estudios profesionales y a los docentes de esta gran institución que fueron parte de mi desarrollo académico.

Un especial agradecimiento a mi Director de tesis, el Dr. Rubén Marroquín Segura, por su paciencia, su tiempo invertido, sus conocimientos y su guía, su confianza y su apoyo para este trabajo, gracias por sus anécdotas y sus enseñanzas de vida.

A mi asesor de tesis el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara, por su tiempo dedicado a cada una de las revisiones del proyecto. A mis revisores, M. en C. José Luis Trejo Miranda, por sus observaciones y sugerencias, por su buena vibra y su compañía amena en el laboratorio, al Q.F.B. Francisco Javier Parada García y la M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara por el tiempo invertido en las revisiones, gracias por sus observaciones, sugerencias y apoyo.

Al profesor Armando, por su ayuda, consejos y la dedicación que tiene con los alumnos del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio y también aquellos que durante la carrera estuvieron ahí, gracias.

DEDICATORIA

A mis padres Leticia Chávez y Jorge Calderón, por ser un ejemplo de gran fortaleza al no rendirse, por su amor, cariño y comprensión, gracias por demostrarme que todo es posible, por enseñarme a valorar las cosas, agradezco con el alma que me dieran la oportunidad de poder estudiar y concluir mi carrera.

A mis hermanos, Eduardo, Marisol, Jorge y Leonardo por ser mis compañeros de vida, porque sin la inspiración que me dan día con día no podría ser yo, gracias por enseñarme a forjarme como persona.

Esto es un logro de nosotros.

Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1. Consideraciones generales de la inmunología.....	3
3.2. Principales órganos y células que influyen en el sistema inmunológico	5
3.2.1. Células del sistema inmunitario	5
3.2.2. Órganos del sistema inmunitario	9
3.3. Anticuerpo.....	11
3.4. Antígeno	14
3.5. Determinante antigénico o epítope	15
3.6. Tipos de inmunidad.....	15
3.7. Cuantificación de células productoras de anticuerpos (Técnica Jerne)	17
3.8. Técnica de hemaglutinación.....	18
3.9. Técnica de proteínas totales (método de Lowry)	19
3.10. Electroforesis en acetato de celulosa	20
3.11. Medicina Herbolaria	21
3.11.1. Descripción de <i>Astragalus radicans</i>	23
3.11.2. Clasificación (categorías taxonómicas superiores)	23
3.11.3. Distribución	23
3.11.4. Composición fitoquímica	24
3.11.6. Usos	26
4. Planteamiento del problema.....	29
5. Hipótesis de trabajo	30
6. Objetivos	31
7. Diseño experimental	32
7.1. Diseño del estudio.....	32
8. Material	33
9. Métodos	36
9.1. Obtención del extracto	36

9.2. Preparación de los animales	38
9.3. Técnica de Jerne.....	39
9.4. Microhemaglutinación	40
9.5. Cuantificación de proteínas totales	41
9.6. Electroforesis de proteínas séricas en acetato de celulosa.....	42
9.7. Índices esplénico, cardiaco, hepático y renal.....	43
10. Resultados	44
10.1. Comparación de medias de las células formadoras de anticuerpo / millón de células nucleadas con la técnica Jerne.....	44
10.2. Comparación de las medias de las células formadoras de anticuerpo / bazo con la técnica Jerne.....	45
10.3. Comparación de las medias del inverso del título de microhemaglutinación.....	45
10.4. Comparación de las medias de la concentración de proteínas totales	46
10.5. Comparación de las medias de la concentración de Albúmina en proteínas totales.....	46
10.6. Comparación de las medias de la concentración de α_1 -globulina en proteínas totales.....	47
10.7. Comparación de medias de la concentración de α_2 -globulina en proteínas totales.....	47
10.8. Comparación de medias de la concentración de β -globulina en proteínas totales.....	48
10.9. Comparación de medias de la concentración de γ -globulina en proteínas totales.....	48
10.10. Comparación de medias del índice esplénico	49
10.11. Comparación de las medias del índice renal	49
10.12. Comparación de las medias del índice hepático.....	50
10.13. Comparación de las medias del índice cardiaco.....	50
11. Discusión de resultados.....	51
12. Conclusiones.....	54
13. Perspectivas	55
14. Referencias.....	56
15. Anexos.....	61
15.1. Diagramas de flujo de los métodos realizados.....	61

15.1.1. Diagrama de flujo de la obtención del extracto de las raíces de <i>Astragalus radicans</i>	61
15.1.2. Diagrama de flujo de la técnica de Jerne.....	62
15.1.3. Diagrama de flujo para Microhemaglutinación.....	63
15.1.4. Diagrama de flujo para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.....	63
15.1.5. Diagrama de flujo para electroforesis de proteínas séricas en acetato de celulosa.....	65
15.1.6. Diagrama de flujo para determinar índices orgánicos.....	65
Electroferogramas	66
- Cálculos para obtener el número de células formadoras de placa	67
- Cálculos para obtener UFP/millón	67
- Tabla ANOVA de un factor ($p < 0.1$) de las células formadoras de anticuerpos por bazo y por millón con prueba de Tukey.	68
- Tabla ANOVA de un factor ($p < 0.1$) del título de hemaglutinación	69
- Tabla ANOVA de un factor ($p < 0.05$) del nivel de inmunoglobulinas en proteínas totales con prueba de Tukey	70
- Tabla ANOVA de un factor ($P < 0.05$) de los índices de daño orgánico con prueba de Tukey.....	73

1. Resumen

La planta *Astragalus radicans* se ha empleado en la medicina tradicional para estimular las defensas naturales del organismo siendo un excelente antivírico, por lo que surge la necesidad de evaluar los efectos que produce frente al sistema inmunológico de ratones CD1 probando la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso de la raíz de *Astragalus radicans*. Se estudiaron 36 ratones para realizar la técnica de Jerne, microhemaglutinación, proteínas totales por el método de Lowry, electroforesis en acetato de celulosa y observar diferencias anatómicas y fisiológicas en órganos (índices orgánicos). Se ocuparon tres grupos con 6 ratones para cada técnica, el primero que se empleó como grupo control se le ministró 0.2 mL de solución salina fisiológica diariamente por vía oral, al segundo y tercer grupo se les ministró 100 y 200 mg/kg de peso respectivamente del extracto acuoso de la raíz de *Astragalus radicans*, con una duración de 7 días para el grupo Jerne y 14 días para el grupo microhemaglutinación, electroforesis, método de Lowry e índices orgánicos. Se observó que la ministración diaria del extracto acuoso de la raíz de *Astragalus radicans* produjo una disminución en el número de CFP/ millón de células nucleadas, con respecto al grupo control $P=0.382$. En la prueba de microhemaglutinación, se encontró diferencia significativa de las medias comparadas del grupo control contra el grupo tratamiento de 200 mg/kg $P=0.099$. En las proteínas séricas se encontró diferencia significativa entre los grupos control contra 100 mg/kg $P=0.029$. En conclusión se evaluó el efecto inmuno-regulador del extracto acuoso de la raíz de *Astragalus radicans* en un modelo *in vivo* de ratones CD1 observando que si se ministra al menos por 15 días se produce una disminución en las células formadoras de anticuerpo así como en la cantidad de anticuerpos de tipo IgG, lo que nos sugiere un efecto regulador de la respuesta inmune.

2. Introducción

En México la herbolaria surgió con los grupos prehispánicos. Las plantas medicinales eran el recurso esencial al que los indígenas recurrían para la cura de sus enfermedades, esto les proporcionaba un orden y una organización ya que tenían médicos o “tictl” que dominaban ciertas especialidades como parteros, hueseros o yerberos.

A partir del siglo XVI, con la llegada de los españoles, los remedios nativos y las especies prehispánicas se fusionaron o complementaron con los conocimientos de los conquistadores. De esta forma, la herbolaria mexicana se desarrolló notablemente, ya que los españoles al quedar maravillados con la belleza y diversidad natural del territorio, construyeron hospitales de herbolaria medicinal.

Actualmente, la herbolaria mexicana constituye el patrimonio más importante de la cultura de nuestros pueblos ancestrales y representa la fuente de desarrollo de la medicina alternativa. México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas distribuidas en todas las regiones, pero sólo se han estudiado aproximadamente 500.

La raíz de la planta *Astragalus radicans* se ha empleado en la medicina tradicional para estimular las defensas naturales del organismo siendo un excelente antivírico capaz de hacer frente a infecciones causadas por virus de diferente tipo; por lo que ha surgido la necesidad de evaluar los efectos que produce frente al sistema inmunológico de ratones CD1, obteniendo un extracto acuoso de la planta para poder ministrarla a los ratones por vía oral durante un periodo determinado y así

posteriormente con las técnicas de Jerne, microhemaglutinación, proteínas totales y electroforesis de proteínas séricas poder tener resultados que nos sugieran su efecto modulador de la respuesta inmune.

3. Marco teórico

3.1. Consideraciones generales de la inmunología

Las raíces de los fenómenos inmunológicos son muy viejas, pero como tal la inmunología es una disciplina joven comparada con otras como la física, la química, las matemáticas o la anatomía. Residen en antiguas observaciones, registradas en culturas diferentes; los pacientes que sobrevivían a enfermedades infecciosas, rara vez contraían nuevamente la enfermedad. En China se solía practicar la inhalación del polvo procedente de costras de lesiones de viruela como medida de prevención de la enfermedad (proceso denominado variolización). En otras partes del mundo, como en América del Sur, se practicaba la inoculación de mínimas cantidades de veneno de serpientes para prevenir la muerte en caso de mordeduras por víboras. La inmunología como ciencia es posible remontarla a la Inglaterra del siglo XVIII, época de la epidemia recurrente de viruela.

El término inmune deriva del latín *immunis*, esto es exento de “cargos”. La inmunología se inició como una rama de la microbiología.¹⁻³

La inmunología estudia los mecanismos fisiológicos mediante los cuales los seres humanos y otros animales usan para defenderse de la invasión por otros organismos. Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos que tienen la ventaja de reproducirse y evolucionar mucho más rápidamente que

sus huéspedes humanos. Durante el curso de una infección los microorganismos pueden enviar poblaciones enormes de su especie contra un solo Homo sapiens. En respuesta, el cuerpo humano les opone una fuerte resistencia mediante células dedicadas a la defensa, que en conjunto forman el sistema inmunitario.⁴

El sistema inmune surgió durante la evolución para combatir las infecciones causadas por virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos. Estos patógenos pueden ser responsables de infecciones intracelulares o extracelulares, para las cuales la respuesta inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo. La principal prueba de la función del sistema inmune (combatir la infección) es el gran número de infecciones persistentes que sufren los individuos que padecen alguna de las inmunodeficiencias, ya sea heredadas o adquiridas (SIDA), que afectan a algún componente de la respuesta inmune.

Para eliminar un patógeno que haya establecido una infección lo primero que debe hacer el sistema inmune es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo. Para ello el sistema inmune ha desarrollado dos tipos de mecanismos, innatos y adaptativos (adquiridos), cuya diferencia principal reside en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, ya que los mecanismos efectores de destrucción son esencialmente similares.

La inmunidad innata reconoce un grupo de patrones moleculares altamente conservados comunes a un grupo o familia entera de patógenos, por lo tanto, es

capaz de combatir la infección desde el momento de su inicio y durante sus primeras fases (aproximadamente 0-5 días). Si este mecanismo no consigue eliminar la infección, al menos la mantiene bajo control mientras se desarrolla el otro tipo de mecanismo, adaptativo, que requiere aproximadamente 1 semana para desarrollarse.⁵

3.2. Principales órganos y células que influyen en el sistema inmunológico

3.2.1. Células del sistema inmunitario

Existen diversas células inmunes que se desarrollan en la médula ósea a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales que se diferencian a través de dos líneas principales: el linaje mieloide, que produce fagocitos, mastocitos, eritrocitos y plaquetas; y el linfoide que produce linfocitos T, B y NK. Aunque las células sanguíneas son las principales responsables de la respuesta inmune, necesitan de la cooperación de otras células del organismo, por ejemplo, las células endoteliales de los vasos sanguíneos que participan en el tráfico leucocitario entre sangre y tejidos.⁶

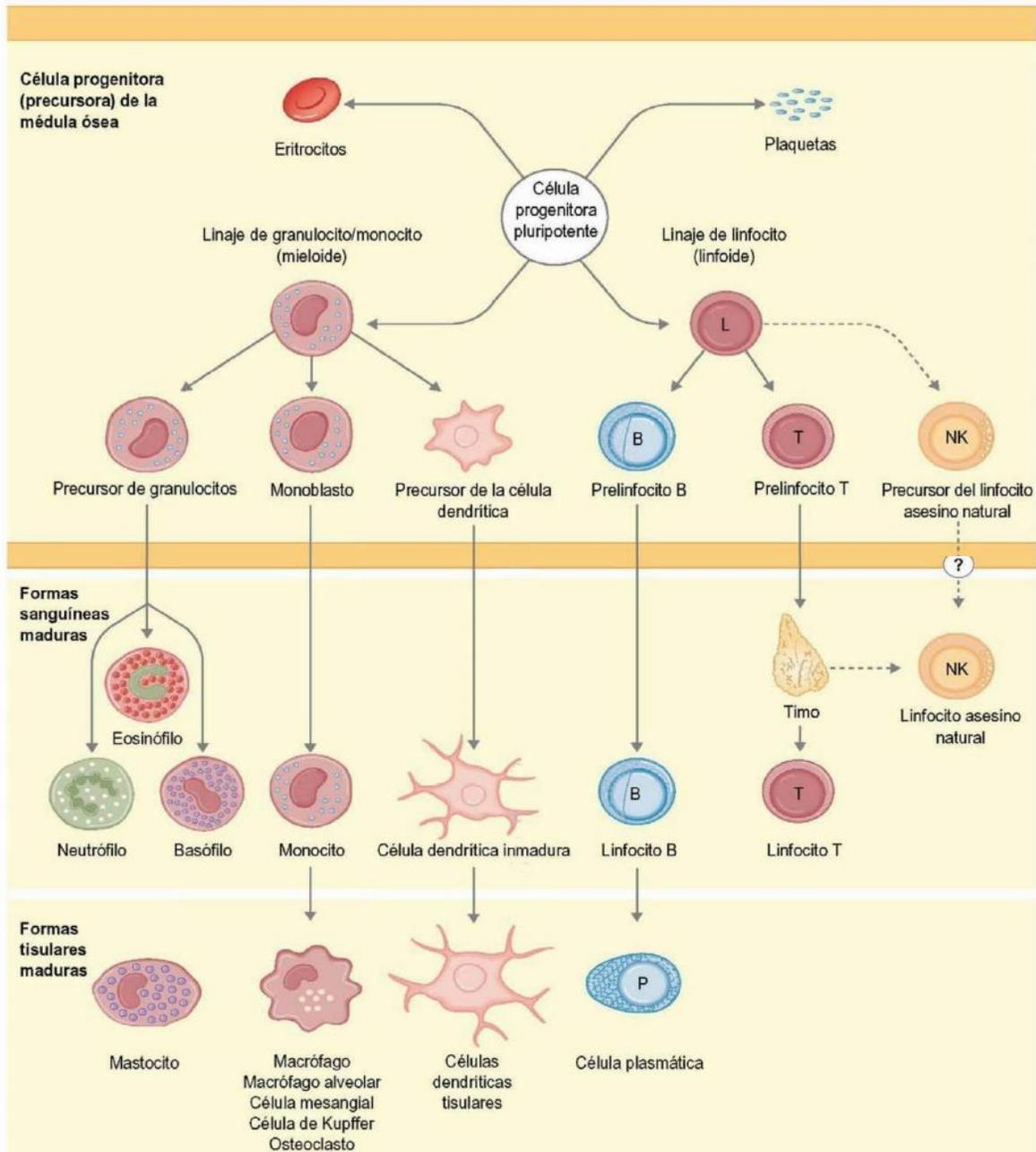


Imagen 1. Desarrollo de los leucocitos desde la célula progenitora pluripotente hasta las formas circulantes y tisulares maduras.⁷

3.2.2.1. Granulocitos

Los granulocitos constituyen alrededor del 65% de todos los leucocitos. Su aspecto, observado con el microscopio óptico tras someterlos a métodos de

tinción convencional, permite una subdivisión adicional. Los basófilos ven teñidos sus gránulos con un color azul intenso, y representan el 0.5 – 1 % de los granulocitos; en los eosinófilos (3 – 5 %) los gránulos se tiñen de rojo, y los neutrófilos blancos (90 – 95 %) poseen gránulos que permanecen relativamente sin teñir. Los granulocitos circulan en la sangre y migran a los tejidos, en especial durante la respuesta inflamatoria. La excepción es el mastocito que permanece fijo en los tejidos.

3.2.1.2. Monocitos y células dendríticas

Los monocitos constituyen un 5 – 10 % de los leucocitos circulantes y se caracterizan por una vida media breve, ya que sólo permanecen alrededor de 24 horas en la sangre. Entran en la reserva extravascular y se convierten en residente en los tejidos, donde reciben el nombre de macrófagos. La morfología de los monocitos y de los macrófagos es muy variable, en términos generales, son de mayor tamaño que los neutrófilos y los linfocitos y poseen un solo núcleo y un abundante citoplasma granulado.

3.2.1.3. Linfocitos

Los linfocitos representan el 25-35 % restante de leucocitos y su nombre deriva de su asociación directa con el sistema linfático. Los linfocitos se dividen en dos subtipos los B y T, presentes en la sangre en una proporción de alrededor de 1:5.

Los **linfocitos B** se diferencian en la medula ósea antes de ser liberados a la circulación. Su papel principal es el reconocimiento de macromoléculas

(denominadas antígenos) a través de los receptores de superficie (anticuerpos). Los linfocitos B pueden convertirse en células plasmáticas y con esta forma permanecen fijos en los tejidos y actúan como secretores de anticuerpos solubles.

El papel de los **linfocitos T**, o linfocitos derivados del timo muestra que tiene lugar en los primeros años de vida y es decisiva para su desarrollo. Durante este periodo adquieren su capacidad de reconocer y provocar la muerte de los tejidos no emparentados trasplantados en un proceso llamado rechazo del injerto, que implica la capacidad para distinguir lo propio de lo que no lo es. En ausencia de los linfocitos T, se altera la protección frente a las infecciones, lo que inexorablemente provoca la muerte.

3.2.1.4. Linfocitos asesinos naturales (*natural killer*)

Las células con esta actividad son capaces de destruir las células infectadas por virus y las células tumorales. A diferencia de los linfocitos T, no necesitan instrucciones del timo para hacerlo; por esta razón se denominan naturales. Al igual que los otros linfocitos, los linfocitos NK se identifican por la presencia de glucoproteínas de superficie especializadas y característicamente también poseen un citoplasma muy granulado.

3.2.2. Órganos del sistema inmunitario

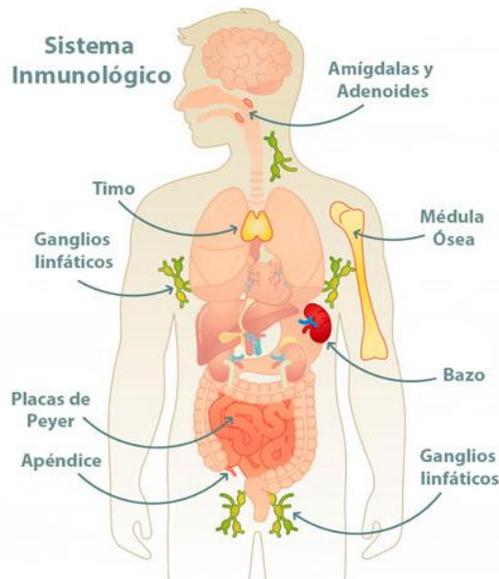


Imagen 2. Órganos linfoides primarios y secundarios'

La respuesta inmune adaptativa se realiza en órganos o tejidos específicos denominados linfoides. Existen dos tipos de órganos linfoides los primarios y secundarios según su participación en los procesos de diferenciación, maduración y especialización de las células linfoides.

Órganos linfoides primarios: (médula ósea y timo), donde los linfocitos adquieren su inmunocapacidad de reconocer antígenos mediante el TCR y el BCR.

- Médula ósea

En la médula ósea se da la hematopoyesis que es la caracterización de todas las células sanguíneas (glóbulos rojos), incluyendo las células que inmunizarán el organismo (glóbulos blancos).

Aquí se producen todos los tipos de leucocitos que existen, algunos maduran en la propia médula ósea como es el caso de los linfocitos B, y

otros maduran en otros órganos como los Linfocitos T o en la sangre como algunos fagocitos.

- Timo

Es el órgano responsable de que maduren los Linfocitos T, y de enviarlos al torrente linfático para dar respuesta inmunológica de las células.

Órganos linfoides secundarios: (bazo, ganglio linfático y tejido linfoide asociado a mucosas o MALT), donde los linfocitos que migraron desde los órganos linfoides primarios reconocen los antígenos y se fragua la respuesta inmune.

- Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son grupos de nódulos repartidos por todo el organismo, unidos por los vasos linfáticos y donde se acumulan los linfocitos B y T para dar respuesta inmunológica cuando sea necesario.

- Bazo

El bazo es el órgano donde, una vez maduros, irán los Linfocitos B y se repartirán por el organismo mediante el Sistema Linfático para dar respuesta inmunológica a la linfa y la sangre.

- Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

El tejido linfoide asociado a mucosas o MALT (Mucosa-associated Lymphoid Tissue) son una serie de estructuras linfoides que están en el tracto intestinal, el respiratorio o el urinario, especializados en luchar contra los patógenos en zonas localizadas. Aquí en juego las amígdalas o adenoides, la nasofaringe y las placas de Peyer en ileón.⁶⁻¹¹

3.3. Anticuerpo

Las moléculas de anticuerpos son proteínas que elaboran los vertebrados al ser estimulados con un antígeno y que tienen capacidad para reaccionar específicamente con el inductor. La mayor parte de los anticuerpos se hallan en el plasma circulante como constituyentes proteicos. Los anticuerpos reaccionan específicamente con los antígenos que les han dado origen y como consecuencia de esa reacción se produce la neutralización. Cuando esto ocurre en el tubo de ensayo generalmente sigue un fenómeno visible que puede ser precipitación, aglutinación, bacteriolisis, citólisis, etc., según las características del antígeno y la presencia o no de sustancias complementarias.

Los anticuerpos llevan a cabo dos funciones principales en la defensa inmunitaria. La primera función es reconocer y unirse al material extraño (antígeno); es decir, la unión a estructuras moleculares en la superficie del material extraño (determinantes antigénicos) que difieren de las estructuras moleculares elaboradas por las células del huésped. Los anticuerpos del huésped pueden reconocer una variedad grande de estructuras diferentes.

El acto de unión del anticuerpo puede ser suficiente para inactivar un patógeno o mantener inocua una toxina. Por ejemplo, el anticuerpo que recubre un virus puede impedir que éste ingrese en las células diana y “neutralizar” el virus. En muchos casos se despliega una segunda función de la molécula de anticuerpo para activar la eliminación del material extraño. En términos moleculares, esto implica la unión de ciertas moléculas (moléculas efectoras) al material extraño

recubierto por anticuerpos para activar los mecanismos complejos de eliminación, por ejemplo, el sistema de proteínas del complemento o la fagocitosis por las células del sistema inmunitario del huésped, como neutrófilos y macrófagos, y citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (CCDA) por las células NK.^{12,13}

Los anticuerpos a menudo se denominan inmoglobulinas (proteínas inmunitarias). Hay 5 clases de anticuerpos o inmoglobulinas conocidas como inmoglobulina G (IgG), IgM, IgA, IgD e IgE. Todas estas clases tienen la estructura básica de anticuerpos con 4 cadenas, pero difieren en sus cadenas pesadas denominadas γ , μ , α , y δ respectivamente.

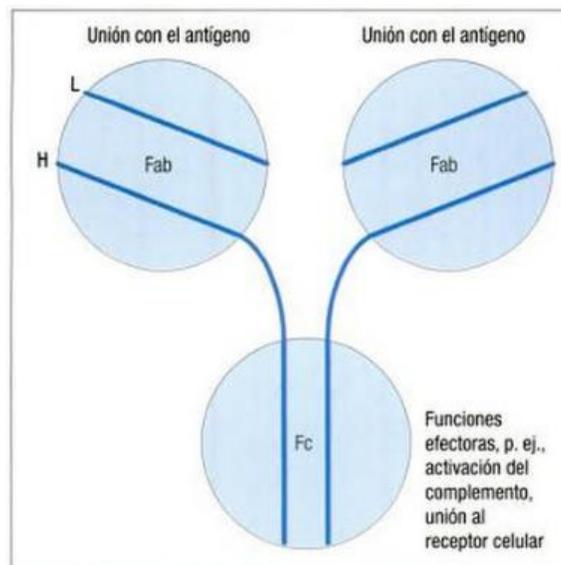


Imagen 3. Disposición global simplificada de la molécula de anticuerpo.¹³

La estructura consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, dispuestas para abarcar tres unidades estructurales. Las dos unidades Fab idénticas se unen al antígeno, mientras que la tercera unidad (Fc) se une a las moléculas efectoras para activar la eliminación del antígeno y medir funciones como el transporte maternofetal.

Anticuerpo	Subtipo	Estructura	Función principal	Actividad Biológica				
				C	N	FcR de Fagocitos	FcR de NK	FcR de Mastocitos
IgA	IgA1 IgA2	Monómero Dímero	Inmunidad de Mucosas	+	+++	+		
IgD		Monómero	Desconocida					
IgE		Monómero	Respuesta a parásitos					+++
IgG	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	Monómero	Respuesta secundaria a patógenos. Inmunidad neonatal	+++	+++	+++	+++	+
IgM		Pentámero	Respuesta primaria a patógenos	+++	++			

Tabla 1. Características de los diferentes isotipos de Igs y sus funciones. C: Activación del complemento. N: Neutralización de patógenos. FcR: Unión a receptores para Fc que inducen endocitosis (en fagocitos) v/o exocitosis (en NK, mastocitos o eosinófilos)⁵

La IgG y la IgE suelen ser monoméricas, en tanto que la IgM aparece como un pentámero. La IgA se presenta de manera predominante como monómero en el suero y como dímero en las secreciones seromucosas. El principal antígeno sérico es la IgG y como es el mejor estudiado en lo que respecta a su estructura y función, lo consideramos primero.¹³

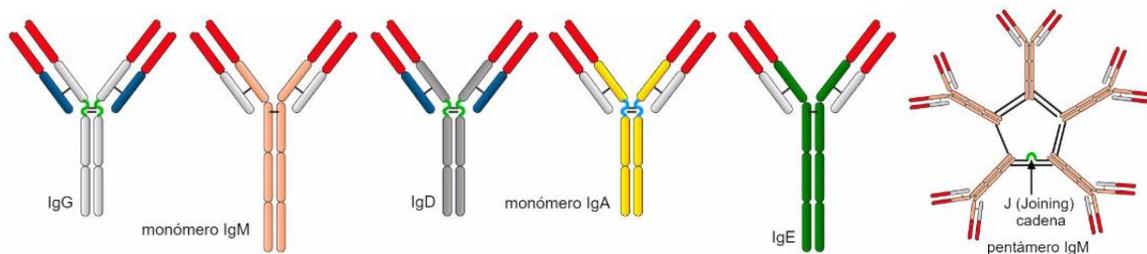


Imagen 4. Isotipos de inmunoglobulinas. Se muestra la estructura de la forma soluble de los diferentes isotipos de Igs.⁵

3.4. Antígeno

Un antígeno es toda molécula que pueda ser reconocida directamente por los anticuerpos y por los receptores específicos de los linfocitos B (BCR) o por el de los linfocitos T (TCR) cuando les sean presentados por moléculas especiales como HLAⁱ y CD1, es decir, que son sustancias que introducidas en el organismo de un vertebrado adulto inducen una respuesta inmune, dando lugar a la producción de otras sustancias denominadas anticuerpos o a la proliferación de células sensibilizadas con las que específicamente reaccionan.

Los antígenos como tales tienen dos características principales, la inmunogenicidad (forma anticuerpos) y especificidad (se une a ellos). Estos elementos constan de dos tipos de estructuras, las macroproteínas (portadoras del antígeno) y los epítopes (determinantes antigénicos).

Según su origen los antígenos pueden ser:

- Xenoantígeno: antígeno procedente de una especie diferente
- Aloantígeno: antígeno de un individuo de la misma especie, pero diferente genéticamente.
- Autoantígeno: es aquel que está presente en las células el mismo individuo.

La reacción inmunológica contra los autoantígenos da origen a las enfermedades autoinmunes.^{14,15}

ⁱ Antígenos leucocitarios humanos, termino para los productos génicos de la molécula del MHC (Complejo principal de histocompatibilidad) humano relacionados con la presentación del antígeno a los linfocitos T.

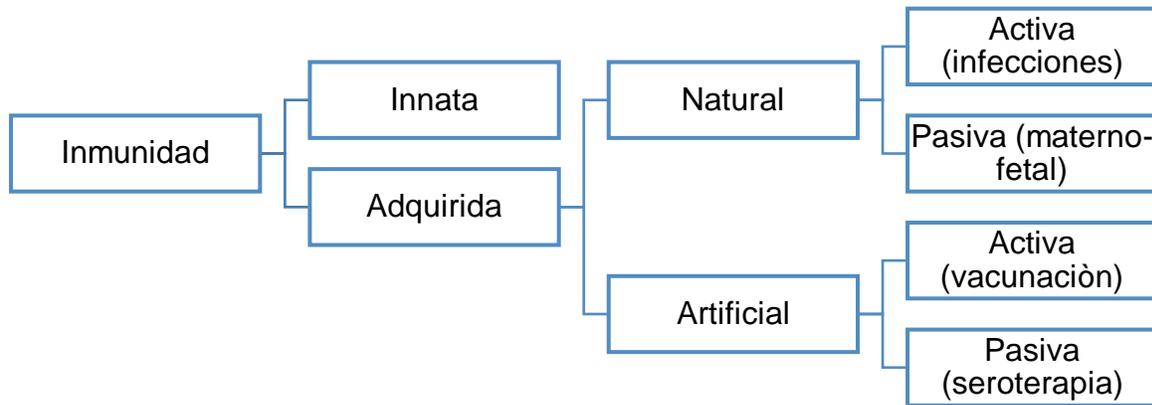
3.5. Determinante antigénico o epítope

Es la región de un antígeno que interactúa directamente con un anticuerpo, un BCR o TCR. Los determinantes antigénicos reconocidos por el TCR son generalmente proteicos (8 a 18 aminoácidos) mientras que las Igs y el BCR reconocen también carbohidratos, pequeños oligonucleótidos y haptenos. Dentro de una macromolécula puede haber varios epítopes y cada uno de ellos puede ser reconocido por un anticuerpo, por un BCR o un TCR diferente y generar, además, una respuesta específica.¹⁴

En relación con los determinantes antigénicos y sólo para indicar su variedad, estos se han agrupado en varias categorías, como determinantes antigénicos (DA) secuenciales, conformacionales, inmunodominantes, inmunosilenciosos y ocultos.

3.6. Tipos de inmunidad

La reacción de un animal contra los microorganismos infectantes o sus productos tóxicos se puede estudiar desde varios puntos de vista: ¿Es local o general?, ¿se debe a factores celulares o humorales?, ¿es de situación externa o interna? y ¿es una característica natural o adquirida?. Suelen abarcarse todos estos aspectos cuando se estudia la inmunidad. La inmunidad natural permite enfoques más amplios que la adquirida.¹⁶



Cuadro 1. Tipos de inmunidad.³

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; 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 humano que en el primer contacto con un patógeno nuevo es débil o ausente pero que se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes al mismo patógeno específico.¹⁷

Los determinantes de la inmunidad innata o natural incluyen factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de otros factores como la edad y las barreras de protección mecánica.

La inmunidad adquirida puede obtenerse en forma activa por infección natural y en forma pasiva por tratamiento con antisueros o sueros inmunes. También puede adquirirse pasivamente y de manera natural (como en el caso de la inmunidad

materno- fetal, donde los anticuerpos producidos por la madre atraviesan la barrera placentaria y se vierten en la circulación fetal), o puede inducirse de manera artificial por vacunación.

La inmunidad adquirida depende de la existencia y función de un sistema celular altamente especializado y que los efectores de esta forma de inmunidad incluyen tanto elementos celulares como solubles, de aquí los términos de inmunidad celular e inmunidad humoral.¹⁸

3.7. Cuantificación de células productoras de anticuerpos (Técnica 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 formadoras 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 más aproximada del número de células productoras de anticuerpo en el bazo entero.

La técnica 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 inmoglobulinas de ratón para detectar las células productoras de anticuerpos de la clase IgG (técnica indirecta).¹⁹

3.8. Técnica 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 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 fase este fenómeno tiene importancia general. Diversos mecanismos pueden causar el efecto prozona. Primero a concentraciones altas de anticuerpo puede exceder en grado considerable el de epítomos. Como resultado casi todos los anticuerpos se unen a un 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, 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 un antígeno pero no inducen aglutinación, estos anticuerpos, llamados 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 absorción del antígeno a la superficie de las células. El suero que contiene anticuerpo se diluye de manera seriada en pozos de una placa de microtítulos y luego se añaden glóbulos rojos recubiertos con antígeno a cada pozo; la aglutinación se valora por el tamaño del patrón de diseminación característico de los glóbulos rojos aglutinados en el fondo del pozo, igual que el patrón que se observa en las reacciones aglutinación.^{20, 21}

3.9. Técnica de proteínas totales (método de Lowry)

Dentro de los métodos colorimétricos de alta sensibilidad, los más utilizados son el de Bradford y el de Lowry.

El método de Lowry en condiciones alcalinas el Cu^{2+} forma un complejo con las uniones peptídicas de las proteínas y se reduce a Cu^+ . El Cu^+ y los grupos radicales de los residuos de tirosina, triptófano y cisteína reaccionan con el reactivo de Folin. El reactivo forma inicialmente un producto inestable, el cual es lentamente reducido hasta formar azul de molibdeno/tungsteno. Los agentes acidificantes y los quelantes o reductores del cobre pueden interferir con el ensayo.

En este método se desarrollan dos reacciones coloridas: primero se desarrolla un color de poca intensidad con el cobre en medio alcalino; después se forma un

color azul-verde con el reactivo mencionado, que contiene molibdato de sodio y tungsteno de sodio en presencia de ácido fosfórico y clorhídrico, que reacciona con los aminoácidos aromáticos, fenilalanina y triptofano de la proteína. Este método permite determinar la concentración de proteína en rangos de 0.01 – 1 mg/ mL.²²⁻²⁵

3.10. Electroforesis en acetato de celulosa

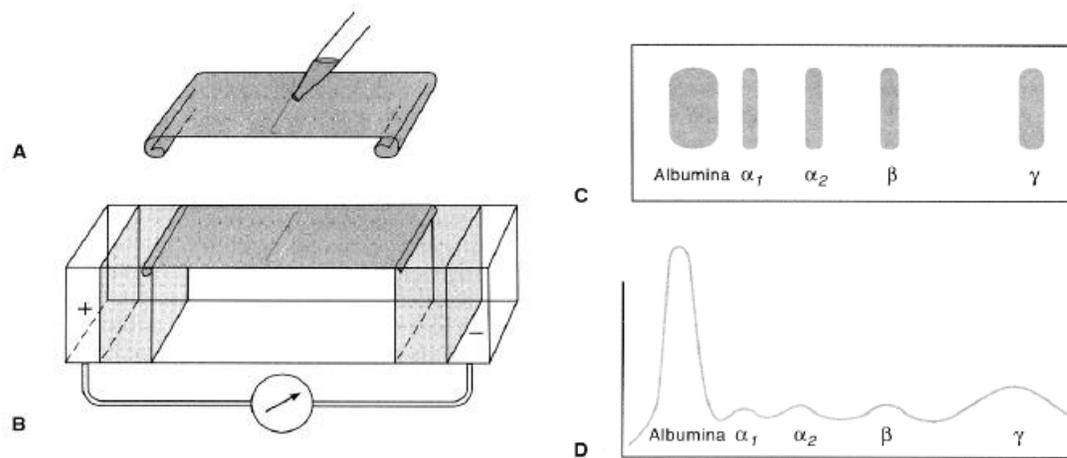


Imagen 5. Técnica de electroforesis de zona con acetato de celulosa. **A:** aplicación de una pequeña cantidad de suero a la tira de acetato de celulosa. **B:** la electroforesis del espécimen se lleva a cabo en una solución amortiguadora (buffer). **C:** Las bandas separadas de proteínas se visualizan bajo una posición característica después de someterlas a tinción. **D:** El escaneo con el densitómetro de la tira de acetato de celulosa convierte las bandas en picos característicos de albúmina, globulina α_1 , globulina α_2 , globulina β y globulina γ .¹⁷

El análisis de la heterogeneidad de las proteínas individuales se lleva a cabo más fácilmente por electroforesis. La separación de las proteínas en un campo eléctrico fue perfeccionada en 1937 por Tiselius, el cual empleó la electroforesis libre o de frontera móvil. Debido a la relativa complejidad de este método, la electroforesis de zona en un medio estabilizador como el papel o el acetato de celulosa ha reemplazado a la electroforesis libre para uso clínico.

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. Por lo general, se emplean tiras de papel o de acetato de celulosa como medios de sostén. Sin embargo, una mayor ventaja del acetato de celulosa es la rapidez con la que se logra la migración electroforética. De manera tradicional, el acetato de celulosa es ópticamente transparente, pueden aplicarse micro cantidades de proteína y es adaptable a los procedimientos histoquímicos de tinción.

En la técnica en sí, muestras de suero o de otro líquido biológico son colocadas en el origen y separadas por electroforesis durante aproximadamente 90 minutos, empleando soluciones amortiguadoras alcalinas. Entonces se tiñen las tiras para la búsqueda de proteína y se separan en un densitómetro.

El suero humano normal se separa en cinco bandas principales: albúmina, globulina α_1 , globulina α_2 , globulina β y globulina γ , las cuales representan principalmente a IgG.²⁶⁻²⁸

3.11. Medicina Herbolaria

El uso de plantas medicinales es tan antiguo como el hombre mismo. El proceso mediante el cual el *Homo sapiens sapiens* fue seleccionando los vegetales que servían para comer, curar o matar, transcurrió lentamente, al ritmo de la evolución, pero con algunos sobresaltos. Los primeros pobladores del territorio mexicano también aprendieron a cultivar lo que deseaban comer, fenómeno cultural que ocurre, aparentemente de forma sincrónica en todo el planeta.²⁹

Hay evidencias, por los descubrimientos realizados junto a los restos de los primeros homínidos, que hace unos 60 000 años ya se utilizaban hierbas como el malvavisco. En Perú se han encontrado utensilios con resto de coca que datan de hace unos 50 000 años. Y de hierbas medicinales tratan los primeros textos esculpidos que se conocen: jeroglíficos egipcios de hace unos 6 000 años se refieren al uso medicinal de las plantas.³⁰

La curación con hierbas es muy diversa 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. 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 bilboa* o el *Ginseng* que presuntamente favorecen la longevidad o son poderosos antioxidantes.^{30,31}

3.11.1. Descripción de *Astragalus radicans*



Imagen 6. *Astragalus radicans*.³³

Esta especie es un endémico relativamente raro del centro de México. Es una planta atractiva, que tiene un hábito que recuerda el de algunas orquídeas terrestres.

3.11.2. Clasificación (categorías taxonómicas superiores)

La *Astragalus radicans* o *Astragalus reptans* es una planta del subreino Traqueobionta (plantas vasculares), superdivisión Spermatophyta (plantas con semillas), división Magnoliophyta (plantas con flor), clase Magnoliopsida (dicotiledóneas), subclase Rosidae, orden Fabales.³²

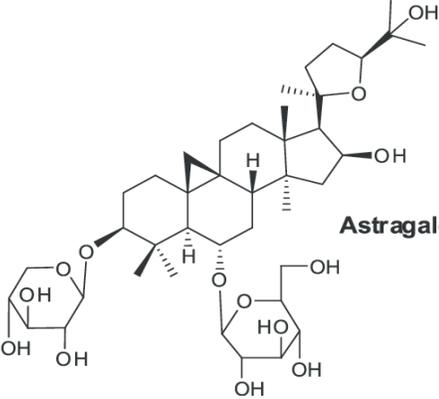
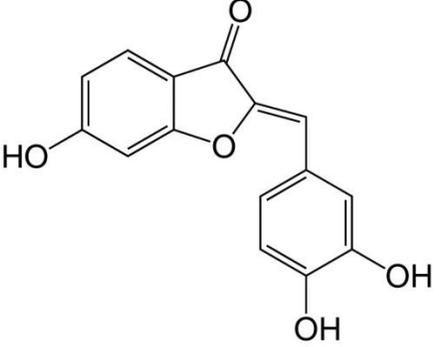
3.11.3. Distribución

Área de origen es el centro de México, distribuida por el centro de México y el Estado de México; los ejemplares que se ilustran se encontraron en Puebla.

También aparece en el listado florístico de la Cuenca del Río Balsas para Michoacan.³³

3.11.4. Composición fitoquímica

Contiene polisacáridos, glucósidos triptéricos, flavonoides, aminoácidos, aminas biogénicas (betaína, colina y GABA), oligoelementos y saponinas.

Componente Fitoquímico	Estructura química
Saponinas Triterpenoides	 <p>Astragaloside IV</p>
Flavonoides	 <p>SULFURETINA</p>

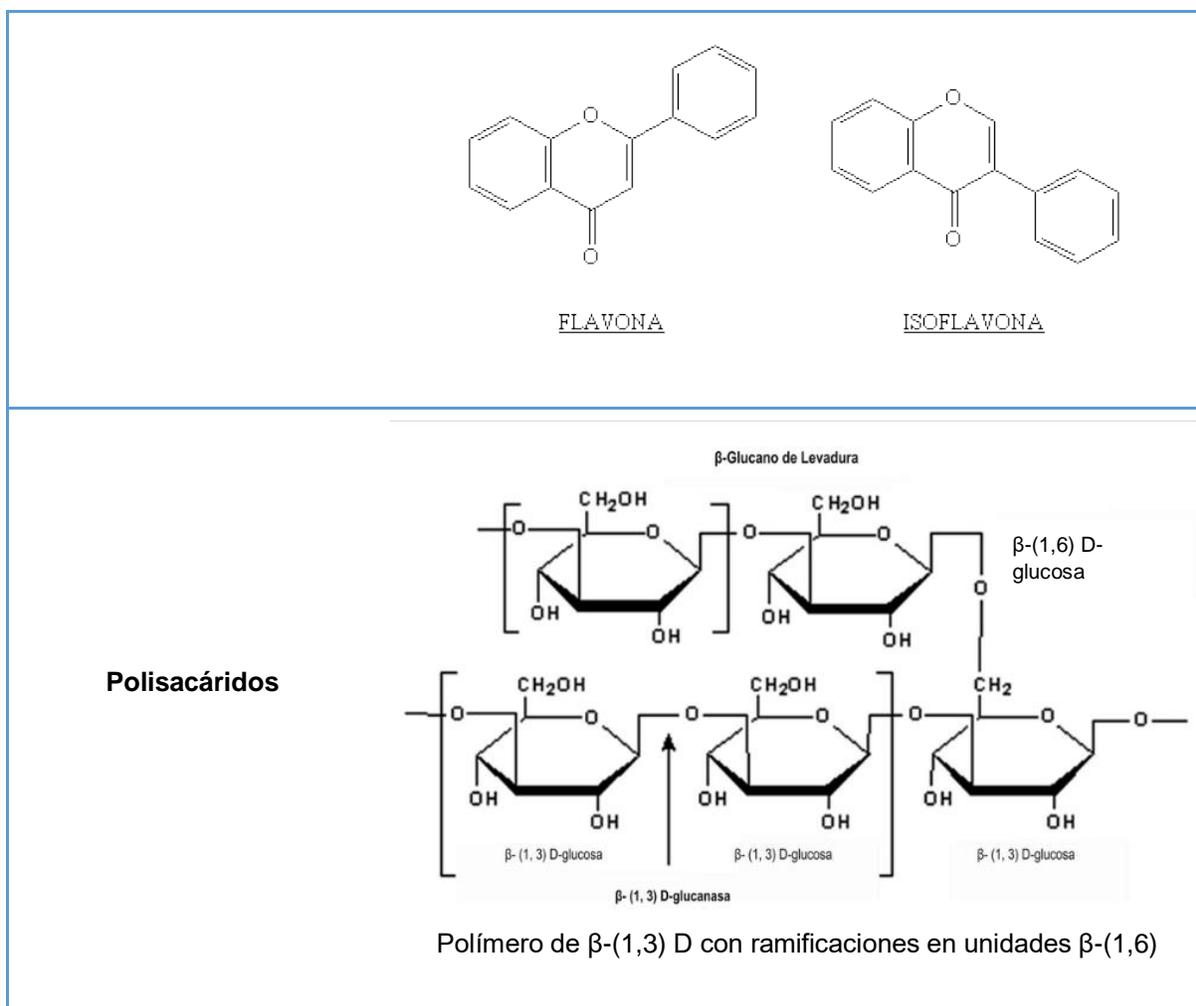


Tabla 2. Estructuras químicas De los principales componentes fitoquímicos presentes en la especie *Astragalus sp.*

3.11.5. Identificación

Planta con los tallos gruesos, tendidos en el suelo (de 20 a 80 cm de largo, o a veces más), con raicillas en los nudos (incluso en las ramas que lleva las inflorescencias); hojas compuestas de 21 a 31 folíolos que miden de 10 a 25 mm de largo; racimos densos (con 20 a 30 flores) sobre largos pedúnculos erectos; el estandarte de 12 a 14.6 mm de largo y la quilla de 8 a 10.2 mm de largo, ovario y fruto cubierto con pelillos.³⁴

3.11.6. Usos

Se utiliza la raíz de plantas de cuatro a seis años de edad, generalmente en dosis elevadas, de 5 a 10 g diarios, por lo común en forma de infusión o bien en cápsulas o extractos.

El *Astragalus radicans* es un adaptógenoⁱⁱ que tiene la capacidad de ayudar al cuerpo a combatir el estrés físico, emocional o mental, estimula la inmunidad en casos de hepatitis vírica o alcohólica, en enfermedades degenerativas autoinmunes como el lupus eritematoso y también como protector generalmente en afecciones infecciosas y en el infarto agudo al miocardio. En un estudio se descubrió que la planta contiene propiedades tanto antiinflamatorias como antibacterianas.

En general es un tónico de las glándulas de secreción interna, y como galactogogoⁱⁱⁱ estimula la secreción láctea de las madres.

No tiene efectos secundarios de importancia.³⁴

Estos son otros beneficios de la raíz de *Astragalus sp.*:

- Ayuda a tratar la anemia fortaleciendo los vasos sanguíneos y mejora la circulación deficiente.³⁵

ⁱⁱ Los adaptógenos son sustancias que aumentan la resistencia a un amplio espectro de factores dañinos (factores de estrés) de diferentes naturalezas físicas, químicas y biológicas. Se consideran reguladores metabólicos, que aumentan la capacidad de un organismo para adaptarse a los factores ambientales y evitar daños causados por tales factores.

ⁱⁱⁱ Los galactogogos son sustancias naturales o farmacológicas que ayudan a mantener la producción de leche materna.

- Previene la gripe y resfriados. Tomarlo antes de enfermarse ayudará a estimular la función del sistema inmunológico y evitará resfriados. Promueve el sistema inmunológico y además proporciona antioxidantes que ayudan al cuerpo a combatir el daño de los radicales libres.³⁶
- Promover la salud cardiovascular. Mejora los síntomas de la cardiopatía isquémica. También se observó que alivia el dolor de angina, aumenta la actividad de la bomba de sodio y previene la obstrucción de la arteria coronaria, principalmente debido a las saponinas que se encuentran en el extracto de su raíz.³⁷
- Controlar la diabetes. Tiene la capacidad de reducir los niveles de azúcar en la sangre y mejorar su sensibilidad a la insulina.³⁸
- Favorece la salud cutánea. Beneficia la piel al favorecer el flujo sanguíneo y acelerar la sanación de heridas. Estos beneficios son posibles debido a su componente APS-1, que tiene un efecto directo en el ciclo celular, reparación de la secreción y sanación de la inflamación. También previene la ruptura de la elastina, lo que ayuda a la piel a mantener su textura, firmeza y flexibilidad.³⁹
- Alivia los efectos secundarios de la quimioterapia. Estudios demuestran que esta planta tiene la capacidad de ayudar a aliviar los efectos secundarios de la quimioterapia, tales como náuseas, vómitos y fatiga.⁴⁰

La demanda de esta planta también se disparó debido a los beneficios de refuerzo inmunológico que pueden favorecer a las personas en quimioterapia.⁴¹

Los estudios también sugieren que la raíz de *Astragalus sp.* puede tener propiedades antitumorales, lo que ayuda en la prevención de los melanomas y la leucemia.⁴²

4. Planteamiento del problema

La herbolaria mexicana se remonta a la época prehispánica cuando las civilizaciones tenían profundo conocimiento sobre las plantas para tratar distintas enfermedades, ahora el uso de plantas medicinales es una práctica común alrededor del mundo. México ocupa el segundo lugar a nivel mundial con aproximadamente cuatro mil quinientas plantas medicinales distribuidas en todas las regiones, pero se estima que sólo el cinco por ciento han sido estudiadas para validar química, farmacológica y biomédicamente los principios activos que contienen.⁴³

La raíz de *Astragalus radicans* se emplea empíricamente en la medicina tradicional para estimular las defensas naturales del organismo, equilibra el organismo en situaciones de estrés y normaliza funciones vitales como el nivel de glucosa, la frecuencia cardíaca y la oxigenación sanguínea; ya que la Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las terapias tradicionales puesto que otorga un gran aporte a la medicina moderna, surge la necesidad de estudiar el efecto terapéutico que produce el extracto acuoso de las raíces de *Astragalus radicans* en el sistema inmunológico de ratones CD1.

5. Hipótesis de trabajo

De acuerdo con los antecedentes teóricos y empíricos que sugieren que la infusión de la raíz de *Astragalus radicans* es capaz de ejercer un efecto regulador sobre el sistema inmunológico, la administración de un extracto acuoso de raíz de *Astragalus radicans* a un grupo de ratones CD1 durante un periodo determinado producirá cambios en parámetros inmunológicos como la cuantificación de células productoras de anticuerpos, hemaglutinación y niveles de proteínas séricas en comparación a los grupos testigos.

6. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la respuesta del sistema inmunológico en un modelo de ratones CD1 mediante la ministración oral del extracto acuoso de raíz de *Astragalus radicans*.

Objetivos específicos

- Realizar las técnicas de Jerne y microhemaglutinación en grupos de ratones CD1 tratados y testigo para cuantificar la producción de anticuerpos.
- Medir el nivel de proteínas totales de los grupos de ratones tratados mediante el método de Lowry.
- Determinar los cambios en los niveles de proteínas de los grupos de ratones tratados mediante la cuantificación de proteínas séricas totales con la técnica de electroforesis de proteínas en acetato de celulosa.
- Calcular el índice renal, esplénico, cardiaco y hepático para determinar cambios fisiológicos en los ratones de los grupos tratados.

7. Diseño experimental

7.1. Diseño del estudio

- Tipo de estudio: Experimental, prospectivo y longitudinal
- Población de estudio: Ratones CD1
- Criterios de inclusión: Ratones macho de entre 35 y 40g de peso
- Criterios de exclusión: Ratones hembra o aquellos ratones que desarrollen lesiones o infecciones
- Criterios de eliminación: Ratones que desarrollen tumores, infecciones a lo largo del ensayo o muerte.
- Variable independiente: Tratamiento (solución salina para ratones testigos y extracto acuoso de *Astragalus radicans* 100 mg/kg y 200 mg/kg de peso para ratones tratados).
- Variable dependiente: Resultados obtenidos de las pruebas de cuantificación de células formadoras de placa, hemaglutinación, cuantificación de proteínas séricas totales, electroforesis y cálculo de índices orgánicos de cada uno de los animales experimentados.

8. Material

- ✓ Tubos Eppendorf
- ✓ Embudo Buchner (KIMAX)
- ✓ Gradillas
- ✓ Matraz Erlenmeyer (KIMAX)
- ✓ Probetas de diferentes capacidades
- ✓ Vasos de precipitados de diferentes capacidades (KIMAX)
- ✓ Tubos de ensayo de 13 X 100mm
- ✓ Tubos de ensayo de 13 X 180 mm
- ✓ Cajas Petri de vidrio (de tamaño pequeñas)
- ✓ Colador de malla fina
- ✓ Mechero Fisher
- ✓ Estuche de disección
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Pipetas graduadas de diferentes capacidades (KIMAX)
- ✓ Pipetas automáticas de diferentes capacidades (Jencons)
- ✓ Puntillas para pipetas automáticas (OXFORD Labware)
- ✓ Papel parafilm (American National Can)
- ✓ Papel Glassine
- ✓ Matraz aforado de 500 mL
- ✓ Tripie
- ✓ Malla de asbesto
- ✓ Guantes de asbesto

- ✓ Jeringas con cánulas metálicas de 1 mL (Laboratorio 1 PA UMIEZ)
- ✓ Jeringa de 1 mL
- ✓ Espátulas
- ✓ Jaulas para ratones
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Placas de microtitulación de 96 pozos con fondo V

Equipo

- ✓ Agitador Vortex – Genie 2
- ✓ Baño metabólico (PRECISION)
- ✓ Centrifuga (Premiere)
- ✓ Rocker Platform (Bellco Glass)
- ✓ Rotavapor (Yamato)
- ✓ Transiluminador UV (UVP)
- ✓ Microscopio (ZEISS)
- ✓ Incubadoras (SHEL LAB)
- ✓ Congelador (Mabe)
- ✓ Procesador de alimentos (Oster)
- ✓ Cámara de electroforesis (Sepratek)
- ✓ Fuente de poder

Instrumentos

- ✓ Balanza analítica (ADAM)
- ✓ Bascula para animales (TECNO COR)

- ✓ Espectrofotómetro (JENWAY)

Material biológico

- ✓ 36 ratones

Reactivos

- ✓ Glóbulos rojos de carnero al 10% (Laboratorio 1 PA UMIEZ)
- ✓ Glóbulos rojos de carnero al 1% (Laboratorio 1 PA UMIEZ)
- ✓ Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (SIGMA)
- ✓ Agarosa al 0.6% (Type 1: Low EEO)
- ✓ Complemento de cobayo fresco (Laboratorio 1 PA UMIEZ)
- ✓ Agua destilada (Theissier)
- ✓ Alcohol etílico al 70% (J.T. Baker)
- ✓ Éter etílico (J.T. Baker)
- ✓ Extracto de Astragalus radicans (Laboratorio 1 PA UMIEZ)
- ✓ Solución fosfato de sodio dibásico (PBS)(Pisa)
- ✓ Solución Alsever
- ✓ Carbonato de sodio
- ✓ Hidróxido de sodio
- ✓ Tartrato de sodio y potasio
- ✓ Sulfato de cobre
- ✓ Albúmina
- ✓ Buffer de alta resolución para electroforesis
- ✓ Folin Cicoteau

- ✓ Rojo de Ponceau al 5%
- ✓ Solución de ácido acético al 5%

Para la evaluación de los resultados obtenidos del presente trabajo se empleó el programa SPSS versión 22.

Usando el programa Sigma Plot versión 11.0 para Windows se obtuvieron las siguientes gráfica

9. Métodos

9.1. Obtención del extracto

Se recolectaron las raíces de *Astragalus radicans*, se lavaron cuidadosamente para quitarles la tierra que pudieran tener, se dejaron secar, se molieron y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL agregando 300 mL de agua destilada, éste matraz se colocó en ebullición durante 2 horas cuidando que la mezcla no se proyectara y se derramara para poder obtener una infusión con las raíces obtenidas, se enfrió y se dejó reposar durante 48 horas en el refrigerador, esta mezcla se filtró, primero a través de una gasa y luego al vacío.

El extracto se obtuvo con ayuda de un rotavapor a 60°C y vacío durante 7 horas, prácticamente hasta sequedad, luego se colocó éste extracto en un vaso de precipitados dentro de una estufa para eliminar el agua casi por completo y así se obtuvo una pasta semisólida color caramelo que sirvió para preparar las soluciones de prueba que se administraron a los animales.



Imagen 7. Infusión de raíces de *Astrágalus radicans*

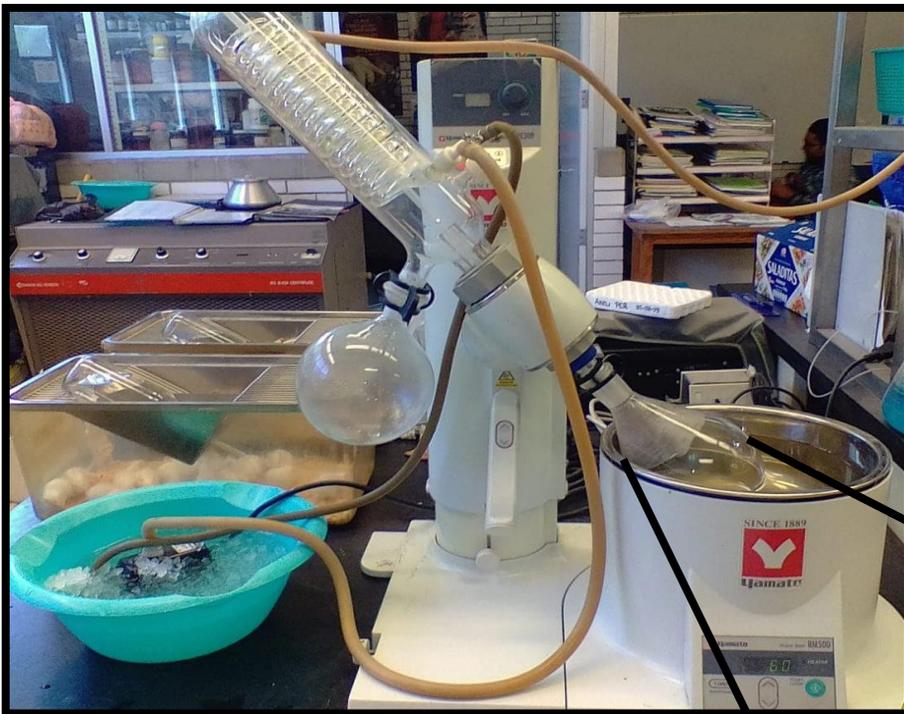


Imagen 8. Extracto acuoso de *Astragalus radicans* en rotavapor



9.2. Preparación de los animales

Se estudiaron 36 ratones que se separaron en dos grupos de 18 ratones, un grupo se ocupó para realizar la técnica de Jerne y otro para microhemaglutinación y electroforesis. Cada uno de estos grupos se separaron en tres subgrupos de 6 ratones, al primero, el grupo testigo se les ministró 0.2 mL de solución salina fisiológica por vía oral con ayuda de una cánula diariamente, al segundo grupo, uno de los grupos tratados se le administró 100 mg/kg por peso de una solución preparada con el extracto de *Astragalus radicans*, al tercer grupo tratado se les ministró 200 mg/kg por peso de la misma solución, con una duración de 7 días para el grupo Jerne y 14 días para el grupo microhemaglutinación y electroforesis.

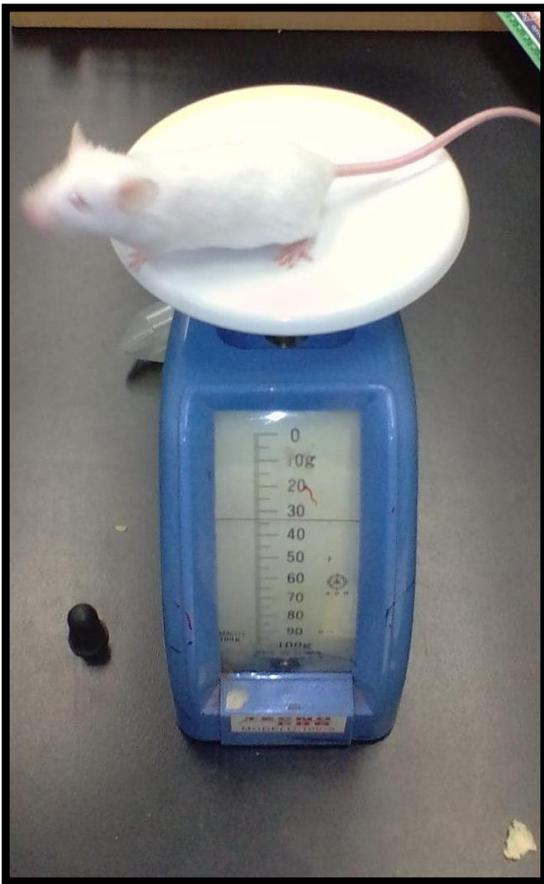


Imagen 9. Ratón CD1 con una masa aproximada de 25 g.



Imagen 10. Ministración oral de extracto acuoso de *Astragalus radicans* a ratón CD1 con cánula.

9.3. Técnica de Jerne

Después de 7 días de ministración oral del extracto acuoso de *Astragalus radicans* (Testigo, 100 mg/kg y 200 mg/kg), se sensibilizó a todos los ratones inoculándolos por vía intraperitoneal con 0.2 mL de una solución al 10% de glóbulos rojos de carnero utilizando una jeringa tipo tuberculina, cinco días después de la sensibilización se sacrificaron los animales colocándolos en cámara de éter para posteriormente poder extraerles el bazo que se fueron colocando en una caja Petri chica de vidrio que contenían 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 en un tubo de ensayo de 13 X 100 mm, luego se colectaron las células con ayuda de una pipeta Pasteur en un tubo de ensayo limpio y se dejó sedimentar un minuto, se transfirió el sobrenadante de células a un segundo tubo, de este último tubo se realizaron diluciones 1:20 en MEM. Se mezclaron 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 metabólico a 45°C, también se adicionaron 0.2 mL de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10%, cada tubo se mezcló en un Vórtex y se vació en cajas Petri chicas que se dejaron solidificar sin mover durante 10 minutos.

Se incubaron las placas a 37°C por 45 minutos, 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 (ver anexo).



Imagen 11. Sensibilización de ratón con 0.2 mL de glóbulos rojos de carnero al 10 %.

9.4. Microhemaglutinación

Se colocó una gota de 50 μ L de solución fosfato de sodio dibásico (PBS) en cada uno de los pozos de la placa de microtitulación, con una pipeta automática de 50 μ L se tomó suero de la primera muestra y se depositó en el primer pozo, tomando y depositando el suero mezclándolo bien 10 veces consecutivas en cada pozo hasta llegar al pozo número 11, el pozo número 12 se dejó como testigo negativo de la prueba. Se realizó lo mismo para cada muestra de suero de los 18 ratones tratados. Se agregó 50 μ L de una solución de glóbulos rojos de carnero al 1% en cada uno de los pozos de todas las filas, mezclándolo bien con ayuda de la

plataforma Rocker. Se incubo a 37°C por 1, trascurrido este tiempo se leyó el título de aglutinación de cada fila.

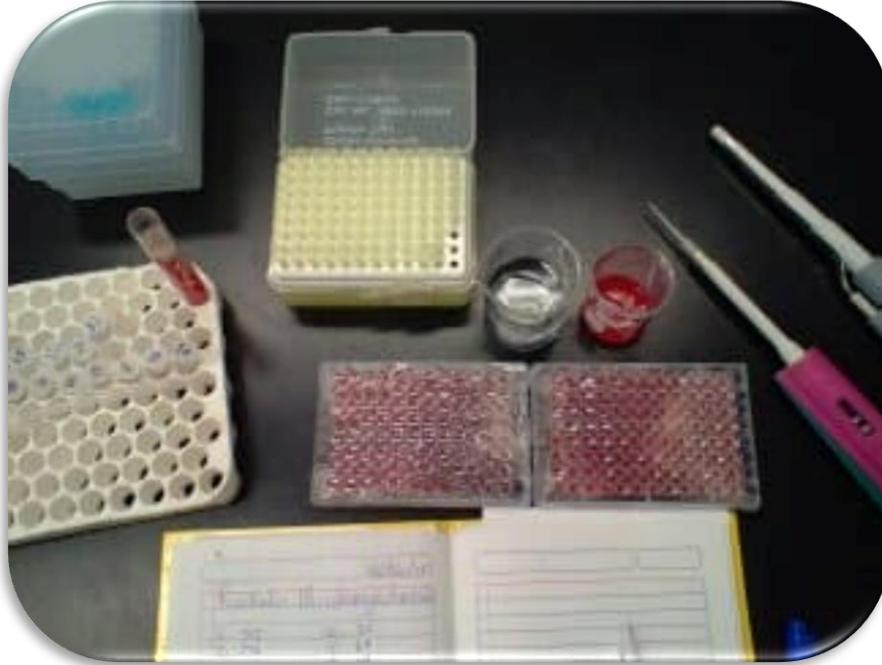


Imagen 12. Material utilizado en técnica de microhemaglutinación.

9.5. Cuantificación de proteínas totales

Para este experimento se utilizó el método de Lowry donde se prepararon 4 soluciones. Para la solución A: se pesó 2.0 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 100 mL de NaOH al 0.4%. Solución B₁: se pesó 1.0 g de tartrato de sodio y potasio y se disolvió en 50 mL de agua destilada. Solución B₂: se pesó 0.5 g de CuSO₄ y se disolvió en 50 mL de agua destilada. La solución de trabajo C se preparó colocando 100 mL de solución A, 1.0 mL de solución B₁ y 1.0 mL de solución B₂. En tubos de ensayo se colocó 0.1 mL de cada muestra de suero, se agregó 0.9 mL de agua destilada y 3 mL de la solución C, se mezcló durante 5 segundos en un Vórtex y se incubo a temperatura ambiente durante 10 minutos,

transcurrido este tiempo se agregar 0.1 mL de Folin Cicoteau y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro utilizando como patrón una solución de 250 µg/mL de albúmina de huevo y un blanco de agua destilada.

9.6. 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®, 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, trascurrido este tiempo se apagó la fuente de poder, se desconectaron los electrodos y se desmontó la tira de acetato de celulosa.

Se colocó la tira en el colorante rojo de Ponceau al 5 % durante 10 minutos para revelar, después se pasó a una solución de ácido acético al 5% para decolorarla hasta que se observaron las bandas sobre el fondo blanco. Se colocó la tira sobre un vidrio libre de grasa y se secó con la ayuda de una secadora de cabello. Se dejó reposar unas horas y se despegó del vidrio. Se realizó la interpretación de las membranas en un densitómetro y con la ayuda del programa Image J.

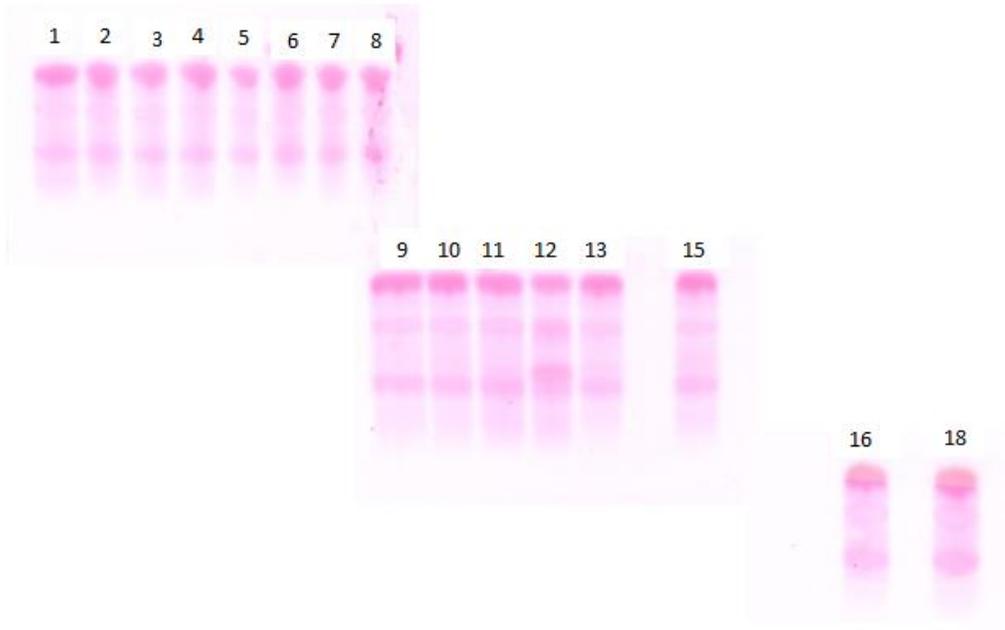


Imagen 13. Placa de electroforesis en acetato de celulosa coloreada con rojo de Ponceau.

9.7. Índices esplénico, cardiaco, hepático y renal

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:

$$\text{Índice del órgano} = \left(\frac{W \text{ órgano (g)}}{W \text{ ratón (g)}} \right) * 100$$

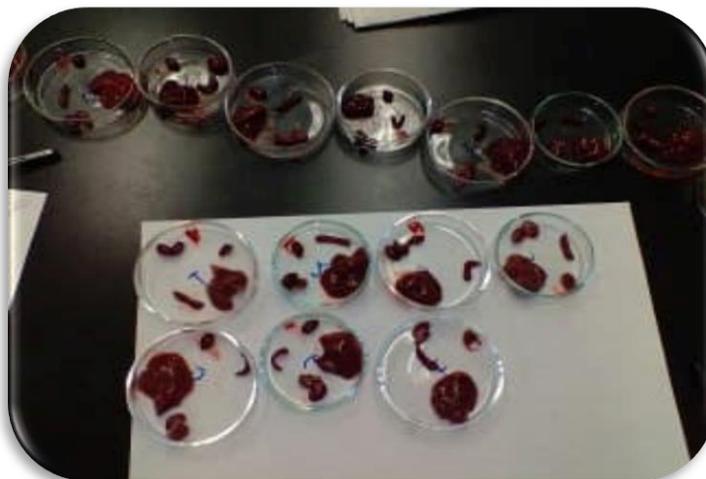
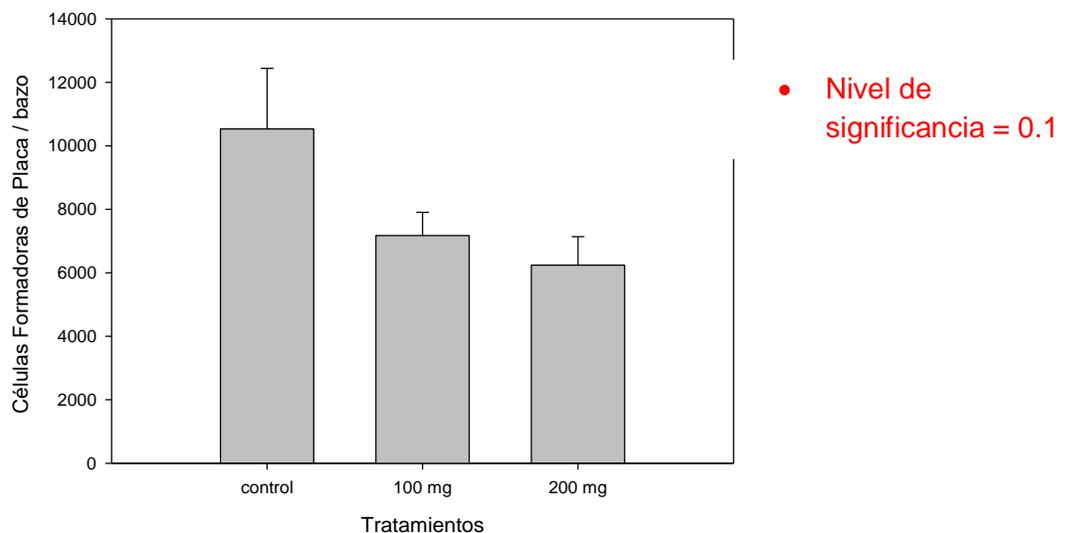


Imagen 14. Órganos diseccionados (bazo, corazón, hígado y riñones) para calcular índices orgánicos

10. Resultados

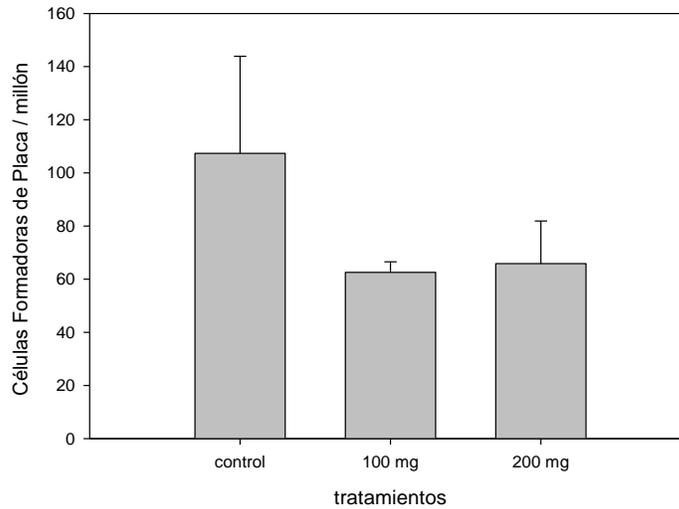
La cantidad de extracto sólido que se obtuvo a partir de la raíz de *Astragalus radicans* que inicialmente peso 30 g fue de 2.7123 g por lo que se determinó que el rendimiento de la extracción fue de 9.041 %.

10.1. Comparación de medias de las células formadoras de anticuerpo / millón de células nucleadas con la técnica Jerne



Gráfica y tabla 1. Los valores representan las medias ± desviaciones estándares de la cuantificación de Células formadoras de placa/ bazo de los diferentes grupos tratados. 10533.33 ± 1908.59; 7173.33 ± 732.53 y 6240.00 ± 896.57, grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente P= 0.190 NS.

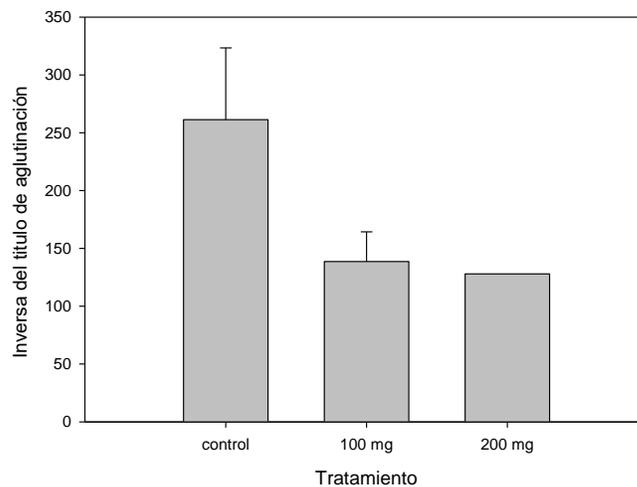
10.2. Comparación de las medias de las células formadoras de anticuerpo / bazo con la técnica Jerne



- Nivel de significancia = 0.1

Gráfica 2. Los valores representan las medias \pm desviaciones estándares de la cuantificación de Células formadoras de placa / millón de los tres grupos tratados. 107.36 \pm 36.54; 62.56 \pm 3.97 y 65.84 \pm 16.07, grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente P= 0.382 NS.

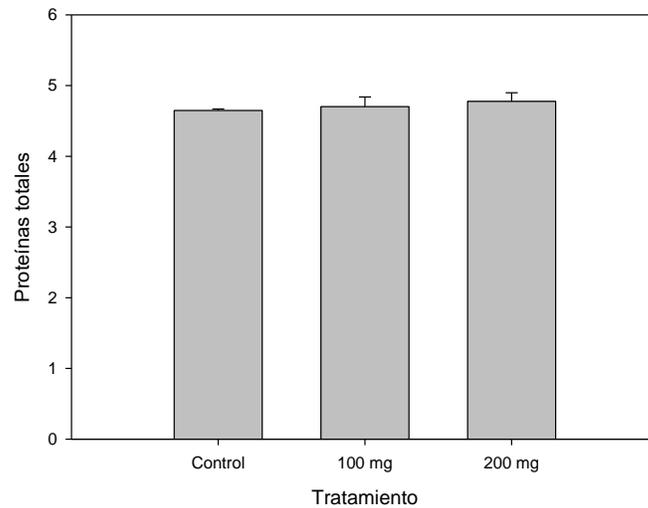
10.3. Comparación de las medias del inverso del título de microhemaglutinación



- Nivel de significancia = 0.1

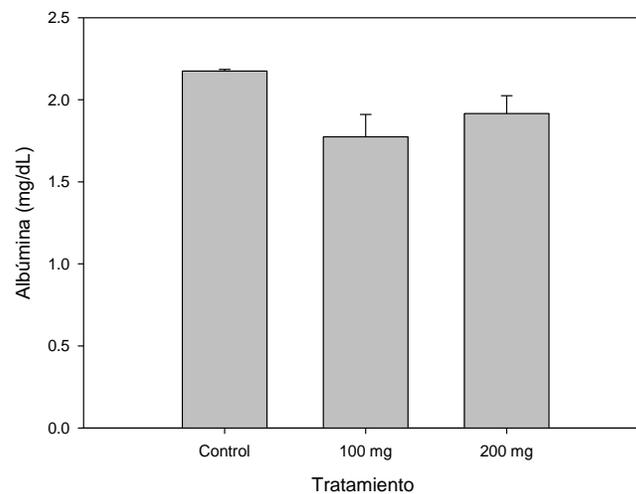
Gráfica 3. Representa las medias del inverso de la dilución del título en microhemaglutinación \pm desviaciones estándares de los grupos tratados. 261.33 \pm 62.05; 138.66 \pm 25.68 y 128.00 \pm 0.00, grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente con una P=0.127 NS.

10.4. Comparación de las medias de la concentración de proteínas totales



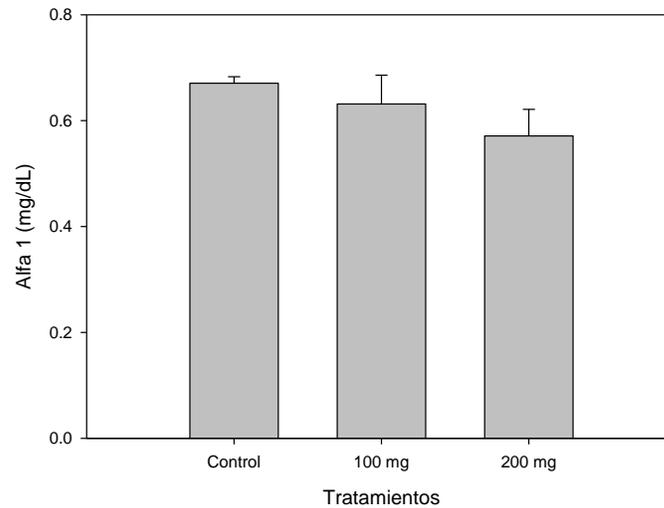
Grafica 4. Representa las medias \pm las desviaciones estándares de la concentración de proteínas totales de los grupos tratados. Grupo control 4.64 ± 0.019 ; 100 mg con una media de 4.70 ± 0.13 y 200 mg con una media de 4.77 ± 0.12 . $P= 0.675$ NS.

10.5. Comparación de las medias de la concentración de Albúmina en proteínas totales



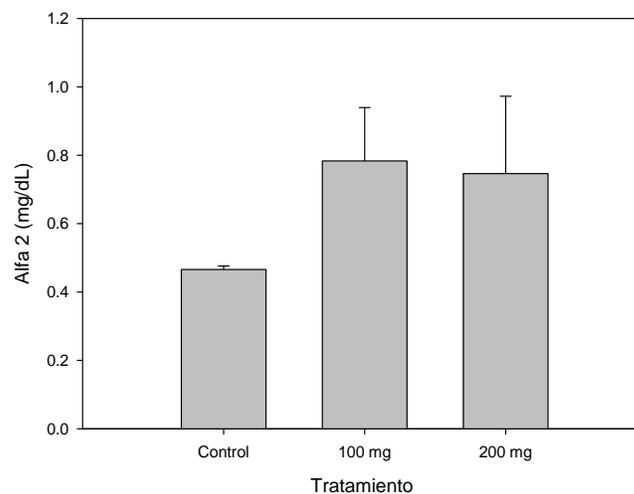
Gráfica 5. Representa las medias \pm desviaciones estándares 2.17 ± 0.0098 ; 1.77 ± 0.13 y 1.91 ± 0.10 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente de mg / dL de Albúmina $P= 0.198$ NS.

10.6. Comparación de las medias de la concentración de α_1 -globulina en proteínas totales



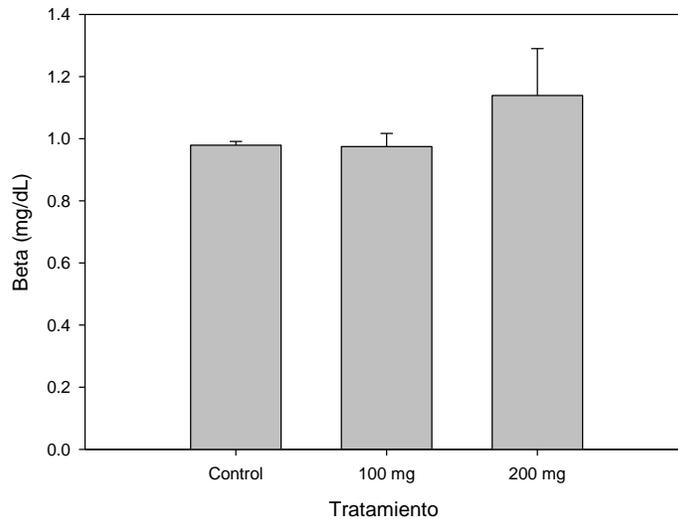
Gráfica 6. Representa las medias \pm desviaciones estándares de α_1 -globulina en mg/dL de los grupos tratados, 0.67 ± 0.01 ; 0.63 ± 0.13 y 0.57 ± 0.11 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente $P=0.258$ NS.

10.7. Comparación de medias de la concentración de α_2 -globulina en proteínas totales



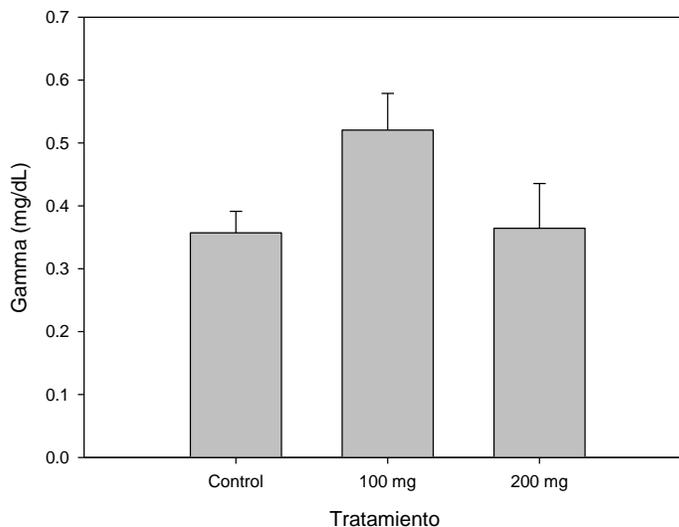
Gráfica 7. Representa las medias \pm desviaciones estándares de α_2 -globulina en mg/dL de cada uno de los grupos tratados. 0.46 ± 0.01 ; 0.78 ± 0.15 y 0.74 ± 0.22 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente $P=0.320$ NS.

10.8. Comparación de medias de la concentración de β -globulina en proteínas totales



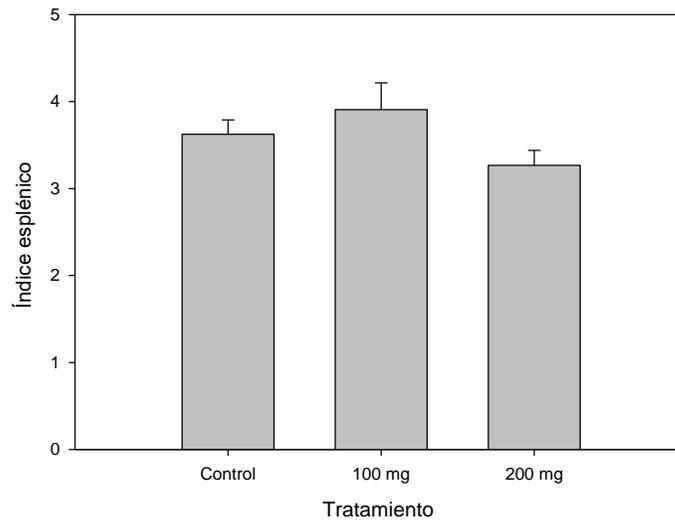
Gráfica 8. Representa las medias \pm desviaciones estándares de β -globulina en mg/dL de cada uno de los grupos tratados. 0.979 ± 0.01 ; 0.974 ± 0.04 y 1.13 ± 0.15 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente $P=0.349$ NS.

10.9. Comparación de medias de la concentración de γ -globulina en proteínas totales



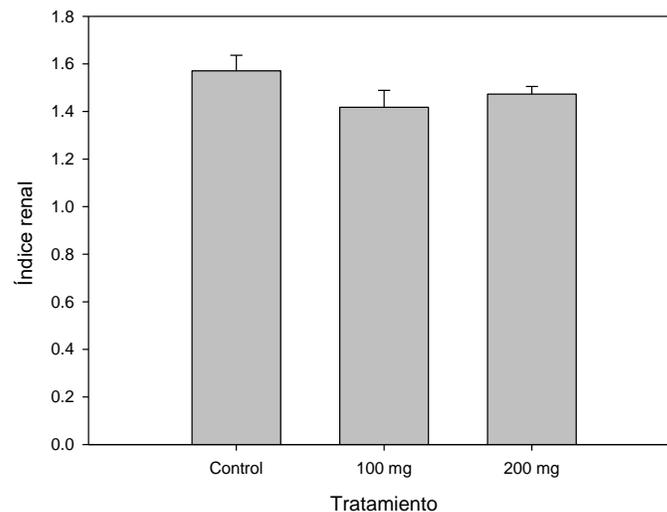
Gráfica 9. Representa las medias \pm desviaciones estándares de γ -globulina. 0.35 ± 0.03 ; 0.52 ± 0.05 y 0.36 ± 0.07 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente $P=0.125$ NS.

10.10. Comparación de medias del índice esplénico



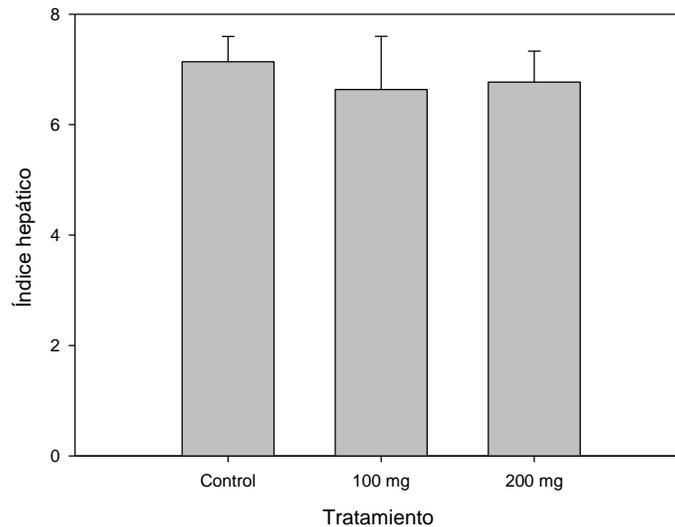
Gráfica 10. Representa las medias \pm desviaciones estándares de los índices esplénicos de cada uno de los grupos tratados. 0.362 ± 0.016 ; 0.390 ± 0.030 y 0.326 ± 0.017 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente, $P=0.162$ NS.

10.11. Comparación de las medias del índice renal



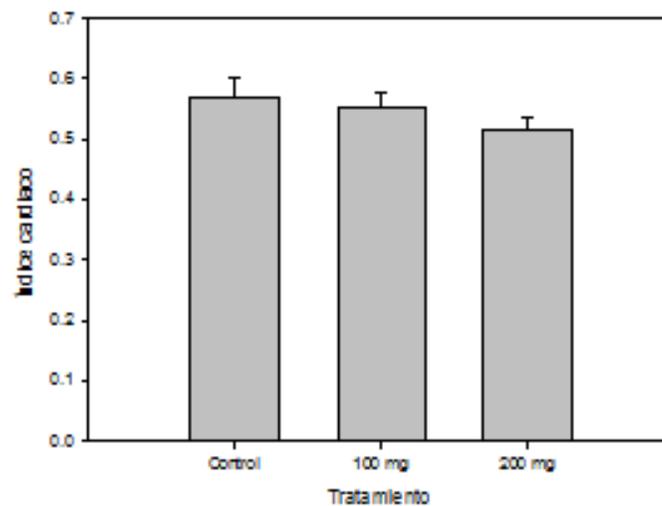
Gráfica 11. Representa las medias \pm desviaciones estándares de los índices renales de cada uno de los grupos tratados. 1.57 ± 0.06 ; 1.41 ± 0.07 y 1.47 ± 0.03 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente, $P=0.224$ NS.

10.12. Comparación de las medias del índice hepático



Gráfica 12. Representa las medias \pm desviaciones estándares de los índices hepáticos de cada uno de los grupos tratados. 7.13 ± 0.18 ; 6.63 ± 0.39 y 6.77 ± 0.24 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente, $P=0.472$ NS.

10.13. Comparación de las medias del índice cardiaco



Gráfica 13. Representa las medias \pm desviaciones estándares de los índices cardiacos de cada uno de los grupos tratados. 0.568 ± 0.031 ; 0.550 ± 0.028 y 0.514 ± 0.022 , grupo control, 100 mg y 200 mg respectivamente, $P=0.981$ NS.

11. Discusión de resultados

Con base en los resultados obtenidos del presente estudio se puede observar que la ministración diaria del extracto acuoso de *Astragalus radicans* produjo una disminución en el número de células formadoras de anticuerpos con respecto al grupo de animales a los que sólo se les ministró solución salina, es decir, que el número de células que producen inmoglobulinas del tipo M se vio reducido. En la gráfica 1 (células formadoras de anticuerpos / bazo), se observa también que el número de células productoras de anticuerpos es dependiente de la concentración de Astrágalo que se ministre, mientras mayor sea la concentración del extracto menor será la producción de células formadoras de placas. Podemos encontrar una diferencia de medias en un intervalo de confianza del 90 % entre el grupo control (solución salina isotónica) y el grupo en tratamiento de 200 mg / kg, con una significancia $P= 0.078$. En la gráfica 2 (células formadoras de anticuerpo / millón), se puede observar que igualmente el número de células productoras de anticuerpos se ve reducido en los grupos en tratamiento a comparación del grupo control, no encontrando una diferencia significativa entre sus medias en el intervalo señalado.

Analizando los datos obtenidos de la prueba de hemaglutinación después de 15 días de tratamiento con el extracto, se encontró diferencia significativa de las medias comparadas igualmente en un intervalo de confianza del 90 % entre el grupo control (solución salina isotónica) contra el grupo en tratamiento de 200 mg / kg de extracto acuoso de *Astragalus radicans* $P=0.099$. Se puede observar que de

igual manera el título de hemaglutinación depende de la concentración que se ministra. El número de células que producen inmoglobulinas del tipo G se ve significativamente reducida.

Para las proteínas totales no se observó un cambio en los niveles séricos de los ratones tratados con el extracto acuoso de *Astragalus radicans* comparado con el grupo control después de 15 días de tratamiento ya que no se observa una diferencia significativa entre sus medias ($P=0.675$) usando un nivel de significancia de 0.05.

Con el análisis de los electroferogramas fue posible determinar que se produjo una alteración en los niveles de inmunoproteínas de los ratones tratados con extracto de *Astragalus radicans*. Encontramos que en la albúmina se presentó una disminución significativa de esta proteína en los ratones tratados con el extracto, comparados con el nivel de albúmina de los ratones a los que sólo se les ministró solución salina isotónica; se puede observar una diferencia de medias en el grupo tratado con 100 mg /kg de extracto respecto al grupo control, $P=0.029$. Para la α_1 -globulina no se muestra una diferencia significativa de medias, pero podemos observar en la gráfica que los niveles de esta proteína disminuyen proporcionalmente a la concentración del extracto de *Astragalus radicans*. Para la α_2 -globulina se observa una mayor concentración de ésta proteína en los grupos tratados que en el grupo control, sin diferencia de medias al igual que β -globulina y γ -globulina no se muestra una diferencia de medias significativa en la cantidad presente en suero de los animales tratados con solución salina isotónica y los que recibieron el extracto de *Astragalus radicans*.

Se observó que, para el índice esplénico, índice renal, índice hepático e índice cardiaco no se muestran diferencias significativas en las medias, $P = 0.162$; $P = 0.224$; $P = 0.472$ y $P = 0.390$ respectivamente.

En el análisis estadístico no se muestra diferencia significativa entre el peso corporal de los ratones en tratamiento con extracto acuoso de *Astragalus radicans* y los ratones que sólo recibieron solución salina, así que puede deducirse que el extracto de *Astragalus radicans* no produce cambios en la masa corporal.

12. Conclusiones

Se evaluó el efecto inmuno-regulador del extracto acuoso de *Astragalus radicans* en un modelo *in vivo* en ratones CD1 y se encontró que la cantidad de células formadoras de anticuerpos son menores en los animales tratados en relación con los animales testigo del ensayo, así mismo el título de anticuerpos medidos por hemaglutinación tuvo el mismo comportamiento, los títulos menores se encontraron en los animales tratados, lo que nos sugiere una regulación en la respuesta inmune.

13. 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.

Diseñar un ensayo utilizando un tercer grupo para poder determinar la dosis mínima efectiva y la dosis letal.

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

Diseñar un ensayo para evaluar el extracto de las raíces de *Astragalus radicans* frente a enfermedades autoinmunes y alergias para demostrar su efectividad.

14. Referencias

1. Benacerraf B., Unanue E. Inmunología, 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1986.
2. Carmona S, La inmunología en la salud y la enfermedad, 1ª ed., México: Médica Panamericana, 2010.
3. Rojas E. Inmunología de memoria. 2ª ed. México: Médica Panamericana; 2001.
4. Parham P. Inmunología. 2ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2006.
5. Regueiro J. López C. Gonzáles S. Martínez E. Inmunología, biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2002.
6. Brostoff J, Male D y Roitt. Inmunología. España: Editorial Harcourt-Brace; 1997.
7. Peakman M. Vergani D. Inmunología básica y clínica. 2ª ed. España: Elsevier; 2011.
8. Chú A. Cuenca S. Barreto L. Inmunología básica y clínica – Vol. I. Ecuador: Utmach; 2015.
9. Playfair J. inmunología en esquemas. 6ª ed. Reino Unido: Servicios bibliográficos; 1997.
10. Kimball JW. Introduction to immunology. EEUU: Macmillan Publishing Company; 1990.
11. Iáñez Pareja, E. Curso de inmunología general. España: Universidad de granada; 1999.

12. Margni R. Inmunología e inmunquímica. Fundamentos. 5ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 1996.
13. Roitt I, Delves P, Martín S, Burton D. Inmunología. Fundamentos. 12ª ed. Buenos aires: Médica Panamericana; 2014.
14. Rojas W. Anaya J. Aristizábal B. Inmunología. Compendio de la 15ª edición de Inmunología de Rojas. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas; 2010.
15. Barrett J. Inmunología. Introducción a la inmunología y la inmunobiología. México: Nueva editorial interamericana; 1972.
16. Vargas T. Antígenos y anticuerpos. Revista de actualización clínica investiga 2014; 44.
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000500003&lng=es&nrm=iso&fbclid=IwAR3k_020X-0aPNjsWCR2KNcqAgmP0-EUiOwN9Jlt-2HSwHmowVus1IJrVjY (último acceso 30 Abril 2019).
17. Parslow T. Stites D. Terr A. Imboden J. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. México: Editorial el manual moderno; 2002.
18. Rojas E. inmunología de memoria. 3ª ed. México: Panamericana; 2006.
19. Wesley AJ. Principios de inmunología. México: Editorial Reverté SA; 2005.
20. Pasqualini C. Entretelones del invento de los anticuerpos monoclonales. Revista de medicina Argentina (Buenos Aires) 2008; 68 (6): 475 – 477.
21. Marroquín S. Mora J. Cabrera Y. Pimentel M. Abad J. Palestino F. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología e inmunología para el área de la salud. México: UNAM; 2009.

22. Florentino S. Gutiérrez M. Rueda N. et al. La inmunología en el diagnóstico clínico. Santafé de Bogotá: Centro Editorial Javeriano; 1994.
23. Díaz J. Fernández M. Paredes F. Aspectos básicos de bioquímica clínica. España: Ediciones Díaz de Santos; 1997.
24. McGilvery R. Conceptos bioquímicos. España: Editorial Reverté; 1997.
25. Aguilar L. García A. Corona T. Manual de laboratorio de bioquímica celular y de los tejidos I. México: UNAM; 2017.
26. Stites D. Stobo J. Fudenberg H. Wells J. inmunología básica y clínica. 5ª ed. México: El manual moderno; 1985.
27. Stites D. Terr A. Inmunología básica y clínica. 7ª ed. México: El manual moderno; 1993.
28. Parslow T. Stites D. Terr A. Imboden J. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. México: El manual moderno; 2002.
29. Legorreta X, Plantas, medicina y poder: Breve historia de la herbolaria mexicana. México: Pax México; 1997.
30. Flores R. Atlas de las plantas medicinales y curativas. La salud a través de las plantas. España: CULTURAL, S.A; 1997.
31. Lozoya X. La herbolaria en México. Revista de Medicina Alternativa, 1998; 19(92): 63-69.
32. Castillo GE Martínez SI. Manual de fitoterapia. España: Editorial Elsevier; 2007.
33. CONABIO. Astragalus radicans Humb. Ex Hornem.
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/astragalus-radicans/fichas/ficha.htm> (último acceso 08 Febrero 2019).

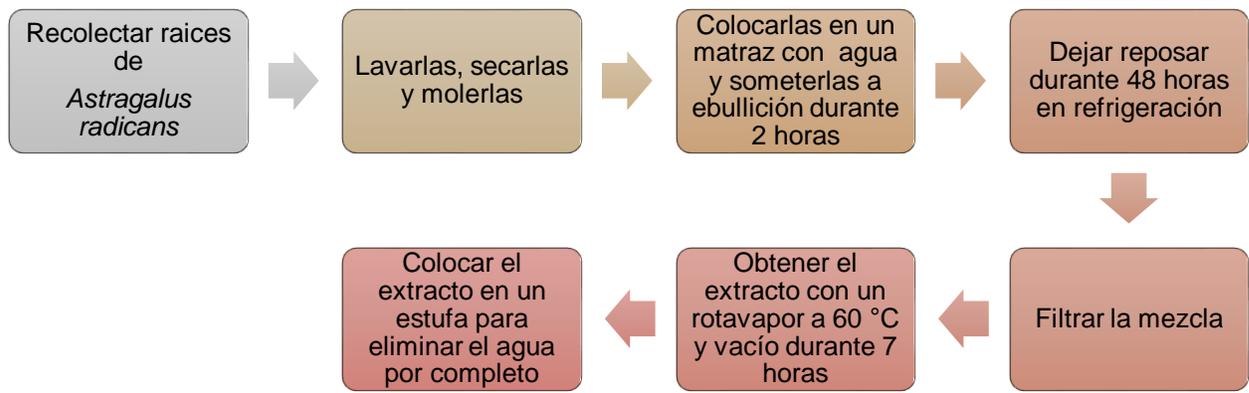
34. Berdonces JI. Gran enciclopedia de las plantas medicinales, diccionario de plantas medicinales. España: Editorial OCEANO; 2008.
35. Progressive Health. Chinese herbs for anemia. http://www.progressivehealth.com/content/default.asp?pa=1&utm_exp=4620948-118.pWedl1vwSB-mVVR25K-3CQ.1 (último acceso 18 Febrero 2019).
36. Zamon R. Wat is Astragalus, and will it get rid of my cold?. California. https://www.huffingtonpost.ca/2014/12/08/what-is-astragalus_n_6289286.html (último acceso 18 Febrero 2019).
37. Chinese Herbs. Astragalus Heart benefits. Chinese herbs & Co. <http://www.chinese-herbs.org/astragalus/astragalus-heart-benefits.html> (último acceso 18 Febrero 2019).
38. Healthy eating. Astragalus & blood sugar. SFGATE. <https://healthyeating.sfgate.com/astragalus-blood-sugar-5138.html> (último acceso 18 Febrero 2019).
39. Zhao B. Zhang X. Wound healing effect of an *Astragalus membranaceus* polysaccharide and its mechanism. Molecular Medicine Reports. 2017; 15 (6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436241/> (último acceso 18 Febrero 2019).
40. Memorial Sloan Kettering. Astrágalo. <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/astragalus> (último acceso 18 Febrero 2019).

41. Dharmananda Subhuti. Astrágalo, aspectos prácticos de la administración de la hierba. <http://www.itmonline.org/arts/astragalus.htm> (último acceso 18 Febrero 2019)
42. Milton S. Hershey Medical Center. Astrágalo. Pennstate Hershey. <http://pennstatehershey.adam.com/content.aspx?productId=107&pid=33&gid=000223> (último acceso 18 Febrero 2019).
43. Ramírez M. COFEPRIS le da su lugar a la herbolaria mexicana. El economista [Internet] 2018 [Consultado 17 Sep 2018]; Disponible en: <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/Cofepris-le-da-su-lugar-a-la-herbolaria-mexicana-20180606-0026.html>

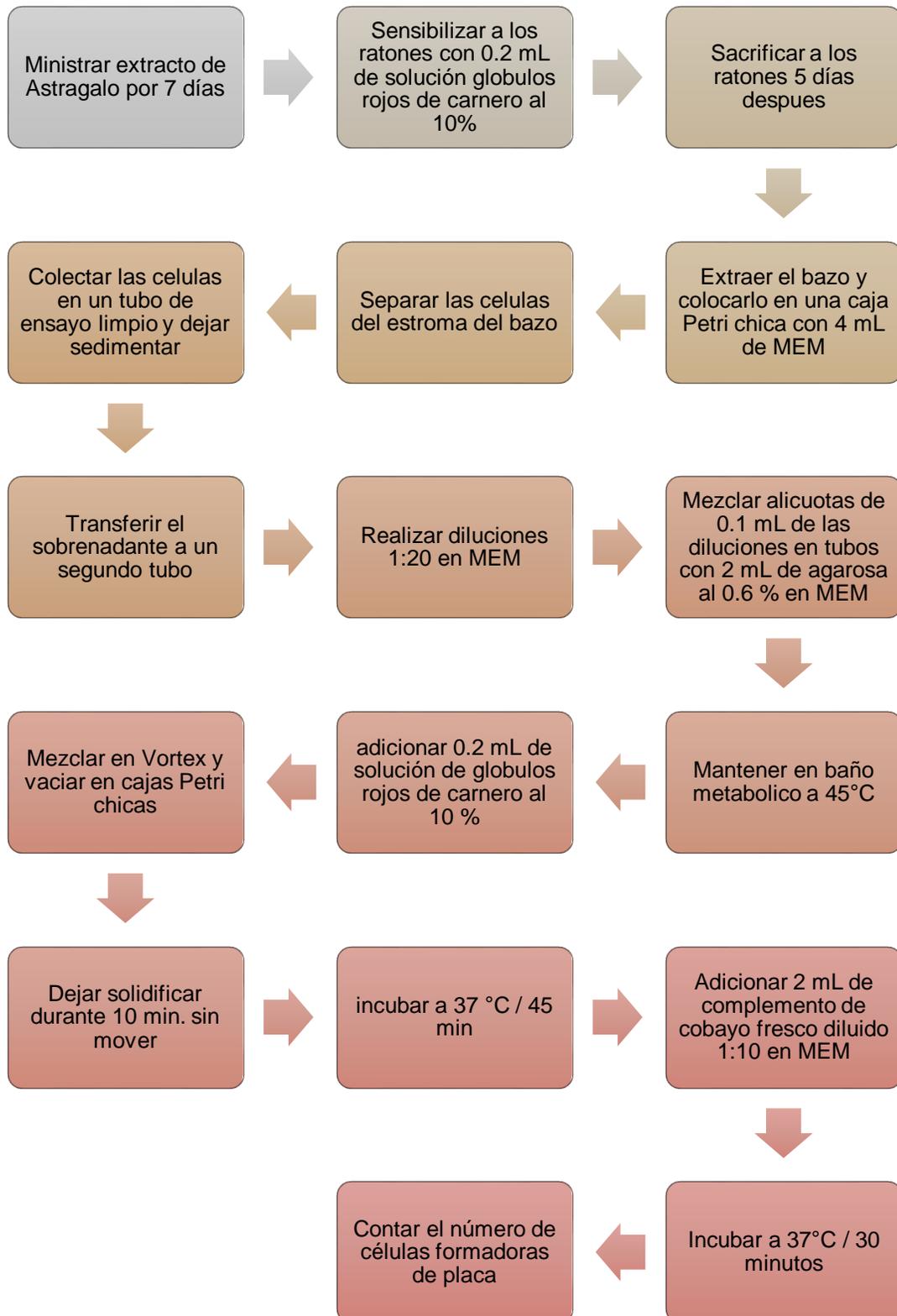
15. Anexos

15.1. Diagramas de flujo de los métodos realizados

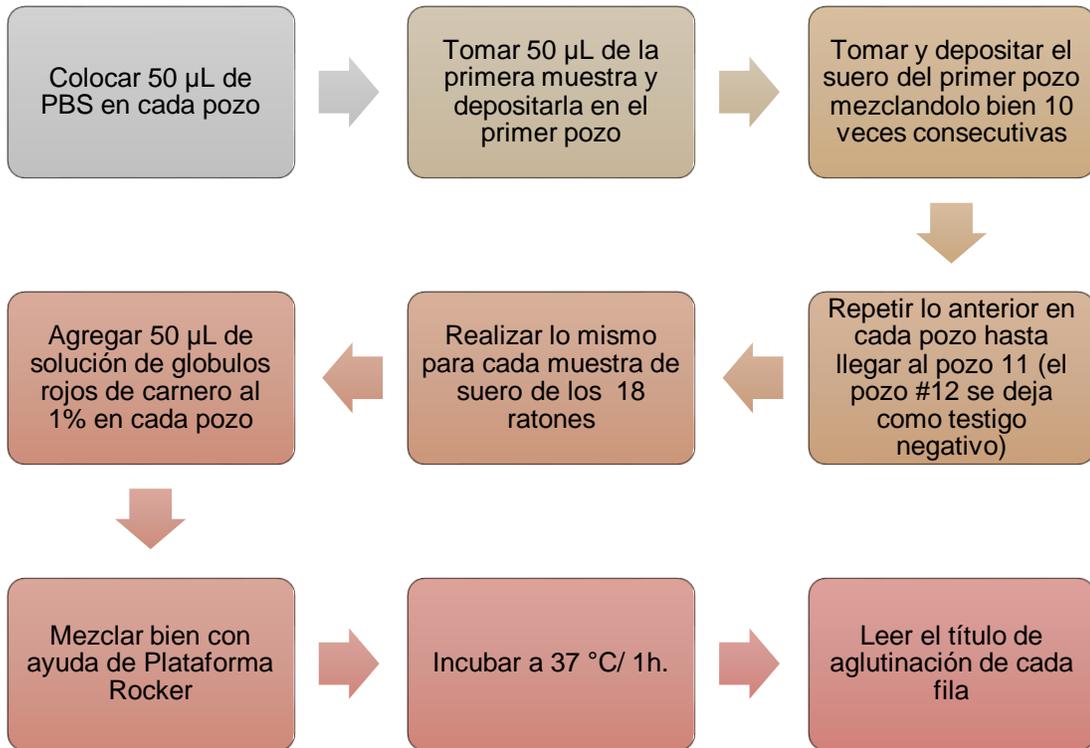
15.1.1. Diagrama de flujo de la obtención del extracto de las raíces de *Astragalus radicans*



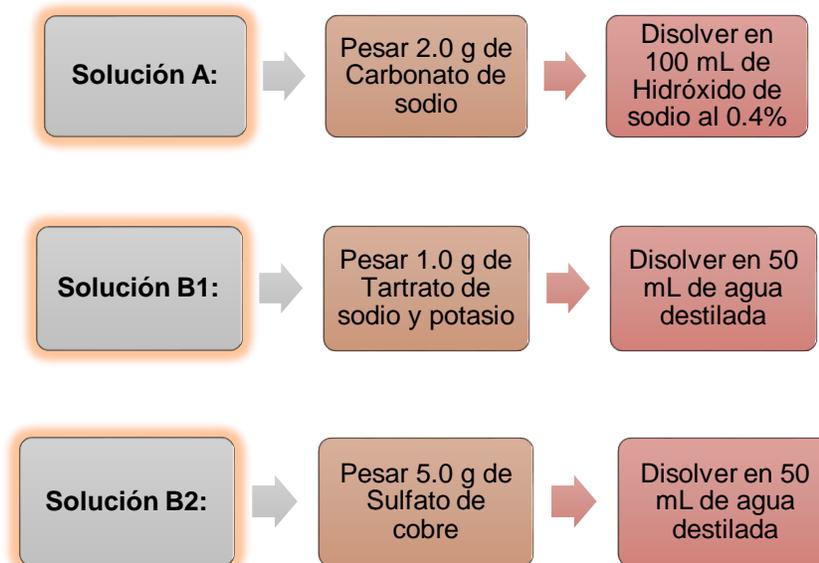
15.1.2. Diagrama de flujo de la técnica de Jerne



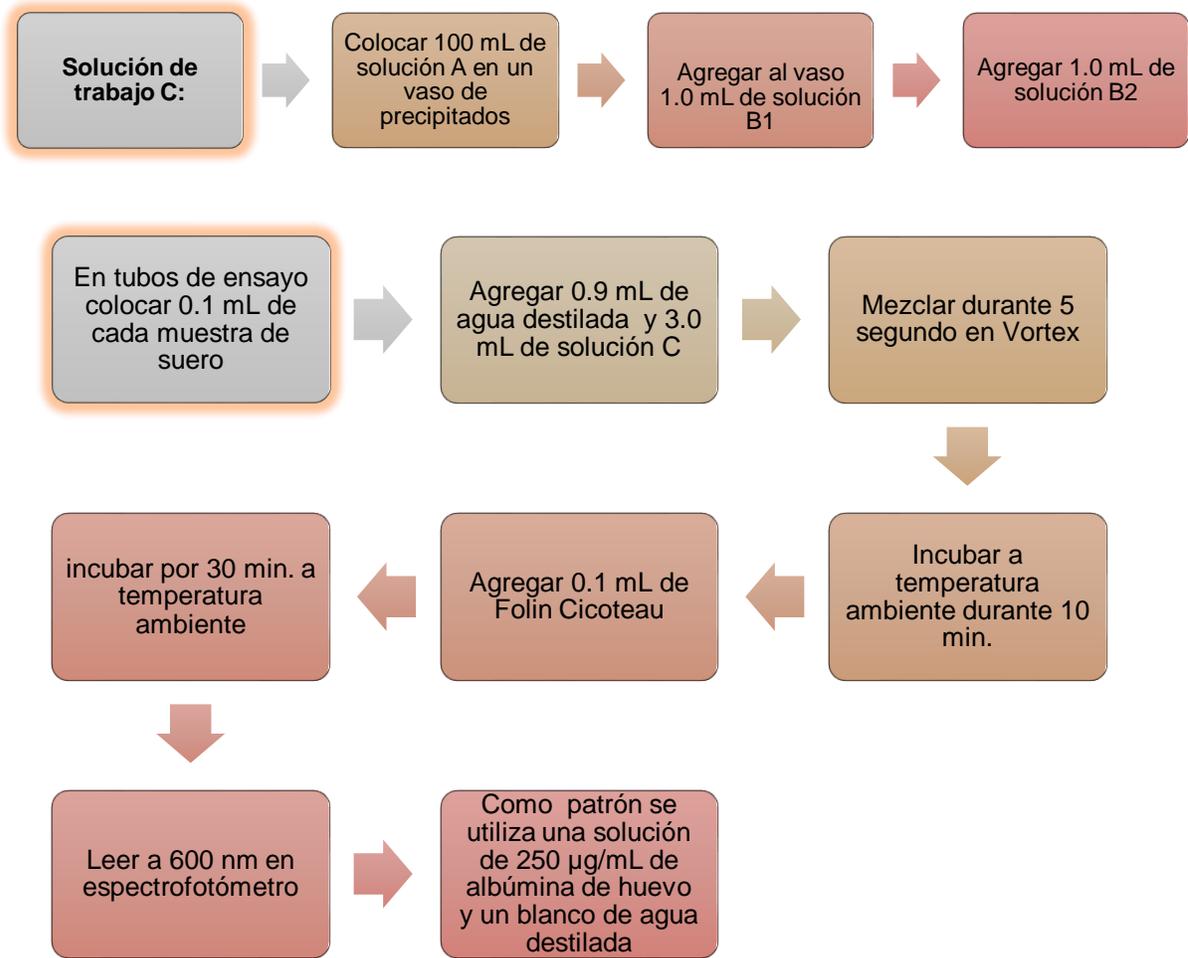
15.1.3. Diagrama de flujo para Microhemaglutinación



15.1.4. Diagrama de flujo para la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry



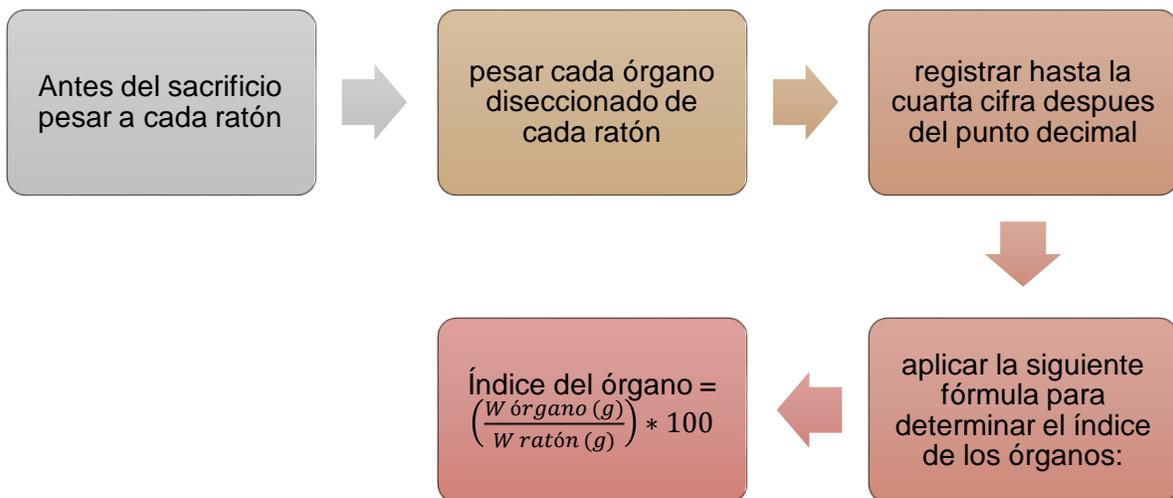
Evaluación del efecto inmuno-regulador del extracto acuoso de Astragalus radicans en ratones CD1 | Calderón Chávez Karen Monserrat



15.1.5. Diagrama de flujo para electroforesis de proteínas séricas en acetato de celulosa



15.1.6. Diagrama de flujo para determinar índices orgánicos



Electroferogramas

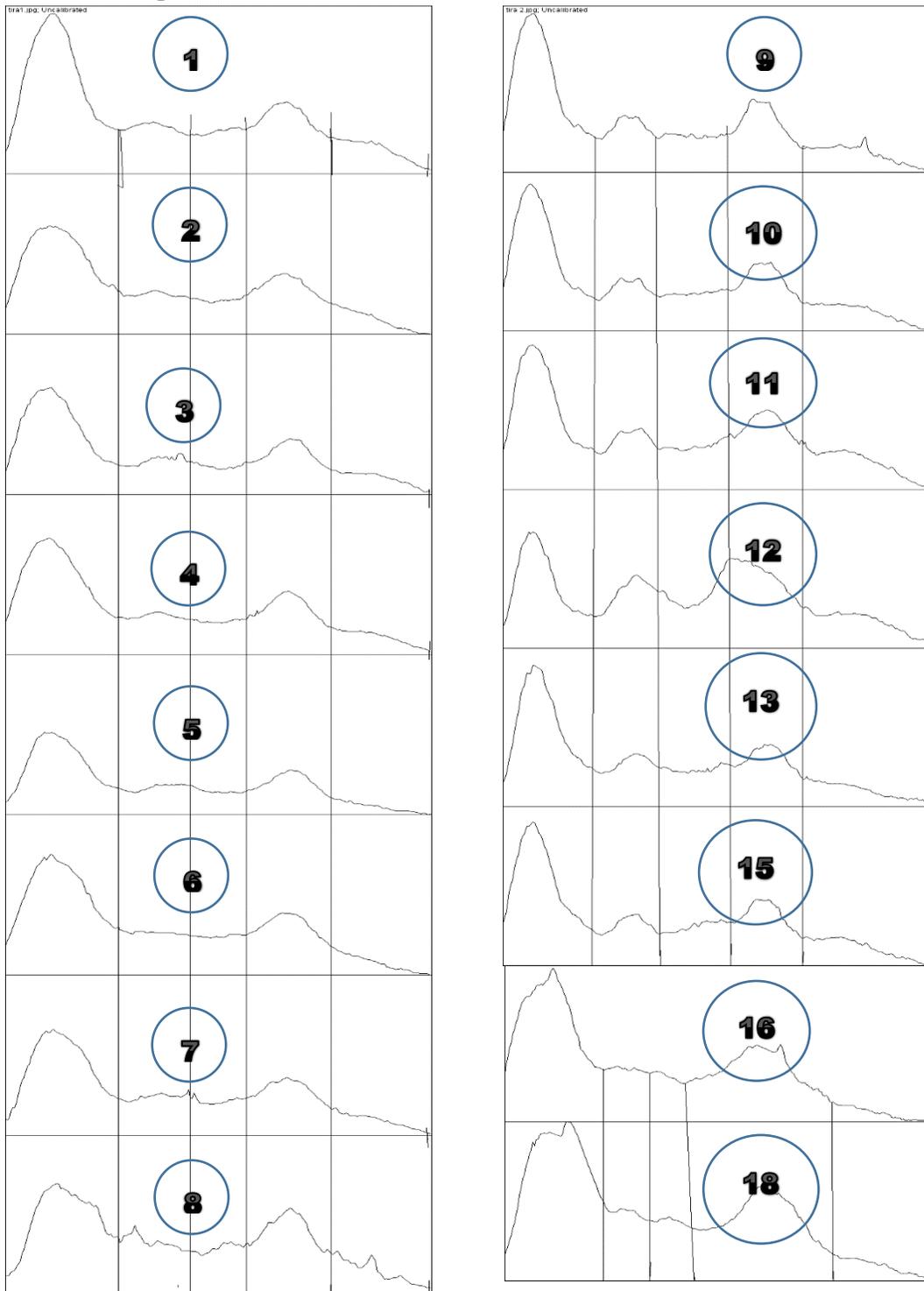


Imagen 15. Electroferogramas de los grupos de ratones en tratamiento (1-6: grupo control; 7-12: grupo 100 mg / kg y 13-16 : grupo 200 mg / kg.

- Cálculos para obtener el número de células formadoras de placa

de células contadas $\times 10^*$ $\times 4$ (mL totales) = # CFP/ bazo

Células contadas	Factor de dilución	mL totales	CFP / bazo
264	10	4	10560
300	10	4	12000
224	10	4	8960
144	10	4	5760
472	10	4	18880
176	10	4	7040
200	10	4	8000
248	10	4	9920
164	10	4	6560
112	10	4	4480
168	10	4	6720
184	10	4	7360
200	10	4	8000
68	10	4	2720
132	10	4	5280
204	10	4	8160

Tabla 3. Células formadoras de placa / bazo obtenidas a partir de las células formadoras de placa en cada una de las cajas Petri

- Cálculos para obtener UFP/millón

Células contadas $\times 10^*$ $\times 20^*$ = células / $mm^3 \times 1000$ = células / mL
 $\times 4$ mL MEM = células $\times 10^6$ / bazo

$$\frac{\# \text{ de CFP/bazo}}{\text{células} \times 10^6 / \text{bazo}} = \# \text{ UFP / millón}$$

*Factores de dilución

GB	GB	GB/mm ³	GB/ mL	GBX10 ⁶ /mL	GBX10 ⁶ /bazo	UFP/millón
136	1360	27200	27200000	27.2	108.8	1.25
171	1710	34200	34200000	34.2	136.8	1.25
137	1370	27400	27400000	27.4	109.6	1.25
199	1990	39800	39800000	39.8	159.2	1.25
83	830	16600	16600000	16.6	66.4	1.25
154	1540	30800	30800000	30.8	123.2	1.25
154	1540	30800	30800000	30.8	123.2	1.25
163	1630	32600	32600000	32.6	130.4	1.25
121	1210	24200	24200000	24.2	96.8	1.25
113	1130	22600	22600000	22.6	90.4	1.25
158	1580	31600	31600000	31.6	126.4	1.25
144	1440	28800	28800000	28.8	115.2	1.25
126	1260	25200	25200000	25.2	100.8	1.25
146	1460	29200	29200000	29.2	116.8	1.25
194	1940	38800	38800000	38.8	155.2	1.25
135	1350	27000	27000000	27	108	1.25
118	1180	23600	23600000	23.6	94.4	1.25
74	740	14800	14800000	14.8	59.2	1.25

Tabla 4. Células formadoras de placa / bazo obtenidas a partir de las células formadoras de placa por célula nucleada

- **Tabla ANOVA de un factor ($p < 0.1$) de las células formadoras de anticuerpos por bazo y por millón con prueba de Tukey.**

Variable dependiente	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	90% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
CFPporbazo	control	100mg	3360.00000	1822.66878	.190	-686.5056	7406.5056
		200mg	4293.33333*	1822.66878	.078	246.8277	8339.8389
	100mg	control	-3360.00000	1822.66878	.190	-7406.5056	686.5056
		200mg	933.33333	1822.66878	.867	-3113.1723	4979.8389
	200mg	control	-4293.33333*	1822.66878	.078	-8339.8389	-246.8277
		100mg	-933.33333	1822.66878	.867	-4979.8389	3113.1723
CFPpormillón	control	100mg	44.80000	32.75505	.382	-27.9195	117.5195
		200mg	41.51667	32.75505	.434	-31.2028	114.2361
	100mg	control	-44.80000	32.75505	.382	-117.5195	27.9195
		200mg	-3.28333	32.75505	.994	-76.0028	69.4361
	200mg	control	-41.51667	32.75505	.434	-114.2361	31.2028
		100mg	3.28333	32.75505	.994	-69.4361	76.0028

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.1.

CFPporbazo

HSD Tukey^a

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.1	
		1	2
200mg	6	6240.0000	
100mg	6	7173.3333	7173.3333
control	6		10533.3333
Sig.		.867	.190

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

CFPpormillón

HSD Tukey^a

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.1
		1
100mg	6	62.5650
200mg	6	65.8483
control	6	107.3650
Sig.		.382

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

- Tabla ANOVA de un factor ($p < 0.1$) del título de hemaglutinación

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	90% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
control	100mg	122.66667	56.76574	.113	-4.0873	249.4206
	200mg	133.33333*	59.53641	.099	.3926	266.2740
100mg	control	-122.66667	56.76574	.113	-249.4206	4.0873
	200mg	10.66667	59.53641	.982	-122.2740	143.6074
200mg	control	-133.33333*	59.53641	.099	-266.2740	-.3926
	100mg	-10.66667	59.53641	.982	-143.6074	122.2740

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.1.

Evaluación del efecto inmuno-regulador del extracto acuoso de *Astragalus radicans* en ratones CD1 | Calderón Chávez Karen Monserrat

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.1	
		1	2
200mg	5	128.0000	
100mg	6	138.6667	138.6667
control	6		261.3333
Sig.		.982	.127

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.625.
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

- Tabla ANOVA de un factor ($p < 0.05$) del nivel de inmunoglobulinas en proteínas totales con prueba de Tukey

Variable dependiente	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
albumina	control	100mg	.401333 [*]	.137894	.029	.04043	.76224
		200mg	.259533	.144625	.207	-.11899	.63806
	100mg	control	-.401333 [*]	.137894	.029	-.76224	-.04043
		200mg	-.141800	.144625	.601	-.52032	.23672
	200mg	control	-.259533	.144625	.207	-.63806	.11899
		100mg	.141800	.144625	.601	-.23672	.52032
alfa1	control	100mg	.039333	.058463	.783	-.11368	.19235
		200mg	.099633	.061317	.268	-.06085	.26012
	100mg	control	-.039333	.058463	.783	-.19235	.11368
		200mg	.060300	.061317	.599	-.10018	.22078
	200mg	control	-.099633	.061317	.268	-.26012	.06085
		100mg	-.060300	.061317	.599	-.22078	.10018
alfa2	control	100mg	-.317333	.204763	.299	-.85326	.21859
		200mg	-.280367	.214757	.415	-.84245	.28171
	100mg	control	.317333	.204763	.299	-.21859	.85326
		200mg	.036967	.214757	.984	-.52511	.59905
	200mg	control	.280367	.214757	.415	-.28171	.84245
		100mg	-.036967	.214757	.984	-.59905	.52511

Evaluación del efecto inmuno-regulador del extracto acuoso de *Astragalus radicans* en ratones CD1 | Calderón Chávez Karen Monserrat

beta	control	100mg	.004333	.125868	.999	-.32510	.33377
		200mg	-.199000	.132012	.317	-.54451	.14651
	100mg	control	-.004333	.125868	.999	-.33377	.32510
		200mg	-.203333	.132012	.303	-.54884	.14218
	200mg	control	.199000	.132012	.317	-.14651	.54451
		100mg	.203333	.132012	.303	-.14218	.54884
gamma	control	100mg	-.177833	.074517	.076	-.37286	.01720
		200mg	-.007233	.078154	.995	-.21178	.19732
	100mg	control	.177833	.074517	.076	-.01720	.37286
		200mg	.170600	.078154	.109	-.03395	.37515
	200mg	control	.007233	.078154	.995	-.19732	.21178
		100mg	-.170600	.078154	.109	-.37515	.03395
proteinas totales	control	100mg	-.05333	.14430	.928	-.4310	.3243
		200mg	-.12767	.15134	.683	-.5238	.2684
	100mg	control	.05333	.14430	.928	-.3243	.4310
		200mg	-.07433	.15134	.877	-.4704	.3218
	200mg	control	.12767	.15134	.683	-.2684	.5238
		100mg	.07433	.15134	.877	-.3218	.4704

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

albumina

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
100mg	6	1.77400	
200mg	5	1.91580	1.91580
control	6		2.17533
Sig.		.591	.198

alfa1

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
200mg	5	.57120
100mg	6	.63150
control	6	.67083
Sig.		.258

alfa2

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
control	6	.46583
200mg	5	.74620
100mg	6	.78317
Sig.		.320

beta

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
100mg	6	.97467
control	6	.97900
200mg	5	1.17800
Sig.		.293

gamma

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
control	6	.35717
200mg	5	.36440
100mg	6	.53500
Sig.		.087

proteínastotales

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
control	6	4.6483
100mg	6	4.7017
200mg	5	4.7760
Sig.		.675

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.625.
- b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

- Tabla ANOVA de un factor (P < 0.05) de los índices de daño orgánico con prueba de Tukey.

Variable dependiente	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
bazo	control	100mg	-.0283000	.0318188	.656	-.111579	.054979
		200mg	.0356700	.0333718	.548	-.051673	.123013
	100mg	control	.0283000	.0318188	.656	-.054979	.111579
		200mg	.0639700	.0333718	.171	-.023373	.151313
	200mg	control	-.0356700	.0333718	.548	-.123013	.051673
		100mg	-.0639700	.0333718	.171	-.151313	.023373
riñón	control	100mg	.1528333	.0848169	.205	-.069156	.374823
		200mg	.0972533	.0889567	.534	-.135571	.330078
	100mg	control	-.1528333	.0848169	.205	-.374823	.069156
		200mg	-.0555800	.0889567	.809	-.288405	.177245
	200mg	control	-.0972533	.0889567	.534	-.330078	.135571
		100mg	.0555800	.0889567	.809	-.177245	.288405
higado	control	100mg	.5043500	.4068421	.451	-.560470	1.569170
		200mg	.3676233	.4266996	.672	-.749169	1.484416
	100mg	control	-.5043500	.4068421	.451	-1.569170	.560470
		200mg	-.1367267	.4266996	.945	-1.253519	.980066
	200mg	control	-.3676233	.4266996	.672	-1.484416	.749169
		100mg	.1367267	.4266996	.945	-.980066	1.253519
corazón	control	100mg	.0182333	.0391461	.888	-.084223	.120690
		200mg	.0547367	.0410567	.401	-.052720	.162194
	100mg	control	-.0182333	.0391461	.888	-.120690	.084223
		200mg	.0365033	.0410567	.656	-.070954	.143960
	200mg	control	-.0547367	.0410567	.401	-.162194	.052720
		100mg	-.0365033	.0410567	.656	-.143960	.070954

bazo

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
200mg	5	.326680
control	6	.362350
100mg	6	.390650
Sig.		.162

riñón

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
100mg	6	1.417600
200mg	5	1.473180
control	6	1.570433
Sig.		.224

hígado

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
100mg	6	6.634533
200mg	5	6.771260
control	6	7.138883
Sig.		.472

corazón

HSD Tukey^{a,b}

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
200mg	5	.514080
100mg	6	.550583
control	6	.568817
Sig.		.390

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.625.
- b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.