

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO PARA
DETECTAR PIROGENOS EN CONEJOS Y PRUEBAS DE
LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MA. ESTHER PINTADO MORALES

1979



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.

CLAS M.T. 280 ~~280~~ 282
ADQ TESIS
FECHA 1976
PROC _____



Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE:	Oscar Amor Dodero
VOCAL:	Magdalena Acosta Segura
SECRETARIO:	Elda Peniche Quintana
1er. SUPLENTE:	Leonor Martínez Soto
2do. SUPLENTE:	Beatriz Luna Millán

Sitio en donde se desarrolló el tema: Dirección General de Laboratorios
de Salud Pública SSA.

Nombre completo y firma del sustentante: Ma. Esther Pintado Morales

Nombre completo y firma del asesor del tema: Q.F.B. Elda Peniche Quintana

Nombre completo y firma del supervisor técnico: Q.B.P. Rosario Sánchez M.

A mis padres con cariño y gratitud

A Jorge Antonio

A todos los maestros que contribuyeron a
mi formación profesional

A la Q.B.P. Rosario Sánchez M. por su
acertada guía y por haberme brindado todas
las facilidades para la realización de este
trabajo

A la Q.F.B. Elda Peniche Quintana por
magnífica asesoría y dirección

A la Q.F.B. Magdalena Acosta S.
por su comprensión y apoyo

A todos mis amigos y compañeros en
esta etapa de mi vida en especial a
Amenda, Mary Carmen, Rodolfo, Arturo
y Ernesto

CONTENIDO:

CAPITULO I

INTRODUCCION

CAPITULO II

GENERALIDADES

1.- La célula bacteriana

A) Estructura

2.- Endotoxinas

A) Composición química, estructura y propiedades

B) Relación de las partes estructurales y función biológica

C) Teorías sobre el principio tóxico

D) Propiedades biológicas

3.- Pirógenos

A) Introducción

B) Estudios 'in vivo' e 'in vitro'

C) Células productoras de pirógeno endógeno

D) Proceso de activación de los leucocitos

E) Características del pirógeno endógeno

F) Acción fisiológica

G) Mecanismo hipotalámico.

4.- Especie Limulus polyphemus

A) Descripción

B) Método de obtención del lisado de amebocitos

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO

A) Reacción febril en conejo

B) Método de lisado de amebocitos de Limulus

CAPITULO IV

RESULTADOS

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

INTRODUCCION,

La administración parenteral de fármacos contaminados con pirógenos puede producir fiebre, escalofríos, leucopenia y reacciones severas que pueden ser fatales. Las endotoxinas reciben este nombre porque su actividad para producir fiebre fué la primera actividad biológica que se conoció (35).

Las endotoxinas son no dializables, muy resistentes al calor y muy potentes, no son destruidas por la esterilización en autoclave que destruye bacterias y esporas bacterianas; debido a ésto una solución estéril para uso intravenoso puede contener suficiente pirógeno para causar fiebre y otros cambios patológicos (28).

Esto hace necesario hacer pruebas para detectar la presencia de pirógenos en las sustancias para uso parenteral.

La primera prueba para detectar pirógenos que se empleó en E.U.A. se realizó en 1944 y en ella se emplearon conejos. A pesar de los descubrimientos sobre la química y fisiología de los pirógenos, esta prueba ha permanecido prácticamente inalterable. Entre las razones que se tienen para buscar otros métodos para detectar contaminación por pirógenos se encuentran:

El método de determinación en conejo depende: de la dosis por kilogramo de peso y es específica para cada preparación, habiendo variaciones entre los diferentes países; de la sensibilidad individual de los animales a los pirógenos, ya que ésta es variable; del costo que supone mantenerlos en condiciones óptimas para llevar a cabo la prueba, los conejos pueden ser usados varias veces sólo en el caso de que las sustancias que se utilizan no sean antigénicas, si son antigénicas

no se deben utilizar los mismos animales; tampoco se pueden utilizar sustancias que produzcan reacción cruzada, además de que los animales que presentan reacción positiva, deben ser utilizados solamente hasta 3 semanas después (10).

También existen sustancias que no pueden ser probadas en conejo como son los agentes utilizados para la quimioterapia del cancer como L-esparaginasa pues, su administración en los animales produce fiebre, náuseas y vómito (116).

En vista de estos problemas se han buscado otras pruebas para detectar contaminación con pirógenos, siendo el lisado de amebocitos de Limulus una de ellas.

La prueba de lisado de amebocitos de Limulus para detectar pirógenos (endotoxinas) fué descubierta en una observación reportada en 1956 por el Dr. F. Bang, que descubrió que las infecciones causadas por bacterias Gram - en el cangrejo Limulus polyphemus producían coagulación intravascular fatal para el animal (9).

Levin y Bang demostraron posteriormente que este fenómeno se producía específicamente por acción de la endotoxina sobre los elementos celulares sanguíneos y que la porción sensible a la endotoxina se encuentra localizada en los amebocitos que son el único tipo celular presente en la sangre de estos animales (87). Con el descubrimiento de que N-etilmaleimida previene la agregación de los amebocitos y permite el lavado de las células, prepararon un lisado y observaron que fué un indicador muy sensible de la presencia de endotoxinas.

Trabajos posteriores de Cooper (34), Hochstein (68), Jorgensen (75) y otros investigadores sobre aislamiento y preparación de los

amebocitos, permitieron la detección rutinaria de endotoxinas en un rango de picogramos.

El presente trabajo se hizo con el objeto de comparar ambos métodos y para saber si la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* puede ser utilizada como sustituto del método de determinación de pirógenos en conejo, ya que se ha visto que este método presenta algunas desventajas como son el depender de la sensibilidad de los animales, el costo y la existencia de sustancias que no pueden ser probadas con este método.

En la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* no se presentan estas desventajas, ya que su costo es menor, no depende de la dosis, es un método que requiere menos tiempo para su realización y se pueden analizar sustancias que no pueden ser probadas por el método anterior.

CAPITULO II

GENERALIDADES

1.- La célula bacteriana

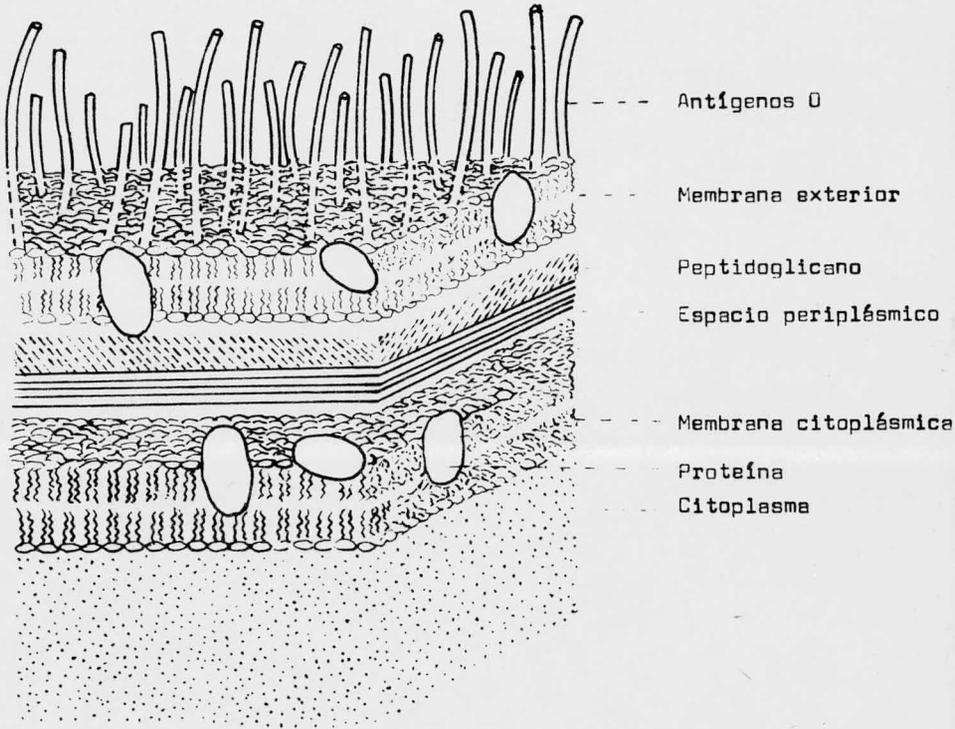
A) Estructura

Membrana citoplásmica. Está compuesta de fosfolípidos y proteínas, es la barrera fundamental del organismo y tiene las siguientes funciones:

- a) Permeabilidad selectiva y transporte de solutos hacia el interior de la célula.
- b) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa en las especies aerobias.
- c) Excreción de exoenzimas hidrolíticas.
- d) Funciones biosintéticas (84).

La estructura media es menos compleja y provee el soporte mecánico a la pared celular, es una estructura entrecruzada y se trata del mucopéptido o peptidoglicano. Su destrucción con lisozima o enzimas autolíticas sensibiliza el organismo al choque osmótico; además de esta protección, la pared celular desempeña un papel esencial en la división celular funcionando como base para su propia biosíntesis (72,173).

Estas estructuras se encuentran tanto en organismos Gram + como Gram -. La diferencia entre las bacterias Gram + y Gram - reside en la pared celular. Las primeras, además del peptidoglicano, están compuestas por ácidos teicoicos, con la tinción de Gram se tiñen de color violeta por la afinidad que tienen a los colorantes básicos y su propiedad de retenerlos debido a la presencia de ribonucleato de magnesio que forma un complejo con el colorante y el lugol siendo insoluble en alcohol-acetona (117).



Modelo de cubierta de célula bacteriana (59).

La estructura superior es exclusiva de organismos Gram - , contiene los pirógenos químicos más comunes, los lipopolisacáridos. Su estructura es fosfolipídica y presenta proteínas, probablemente no tenga función de transporte activo, pero es relativamente permeable por igual a moléculas pequeñas con o sin carga, sin embargo, bloquea la penetración de moléculas de gran tamaño, de aquí la resistencia relativa a antibióticos como actinomicina. Esta estructura es el contacto que tiene el microorganismo con el medio, en ella se encuentran los receptores para virus bacterianos; para bacteriocinas y la especificidad antigénica o el antígeno O (72,173).

En el espacio periplásmico se encuentran las enzimas hidrolíticas ya que la membrana exterior es una barrera que impide se liberen las proteínas periplásmicas al medio (59).

2.- Endotoxinas

A) Composición química, estructura y propiedades

Las endotoxinas son partes constituyentes de la pared celular de las bacterias Gram - formando la capa externa de la misma (45,115). Su naturaleza química es de lipopolisacáridos, muestran una gran tendencia a formar agregados o complejos con otras moléculas y es posible que se encuentren en forma de complejos en la pared celular y no sea producto de la extracción. Las endotoxinas no se extraen en forma de monómeros.

Las endotoxinas están constituidas por 2 componentes principalmente: lípidos unidos covalentemente y heteropolisacáridos, encontrándose también un bajo porcentaje de proteínas, así como fósforo y otros constituyentes inorgánicos como calcio, magnesio y sodio (115).

El polisacárido consiste en la mayoría de los casos, de un número grande de diferentes carbohidratos, se han encontrado 30 diferentes azúcares siendo los más abundantes glucosa, galactosa, glucosamina, L-glicero-D-manoheptosa y ácido 2-ceto-3-desoioctánico, hexosaminas y diferentes desoxiazúcares (27).

La parte lípida está formada por ácidos grasos que tienen una longitud de cadena de C_{10} a C_{22} , saturados e insaturados, los ácidos de número impar se observan en pocos casos (26,56,65).

Las proteínas presentan una mayor cantidad de aminoácidos de reacción ácida (Acido aspártico, ácido glutámico) que básica (Arginina, lisina) y poca o ninguna cisteína (168).

Es posible dividir la molécula de endotoxina en 3 regiones o componentes:

a) La región lípida b) La parte nuclear c) El polisacárido O

a) La región lípida se obtiene con la hidrólisis ácida que rompe la molécula de endotoxina en un polisacárido soluble degradado, P-etanolamida y una fracción que precipita y contiene fósforo denominada lípido A, éste es una mezcla de algunos compuestos químicos más que una estructura química definida (45,168).

La estructura básica del lípido A está formada por unidades de diglucosamina unidas entre sí por enlaces glucosídicos 1→6 y que están unidos por enlaces 1→4 fosfodiéster. (4 fosfoglucosaminil β 1→6 glucosamina, 1 fosfato) (1,58,125).

Tres de los grupos hidroxilo del disacárido se encuentran esterificados con ácido láurico, palmítico y mirístico. El grupo hidroxilo de la posición 3' está unido a la porción polisacárido de la molécula.

Los grupos amino de los residuos de glucosamina están substituídos por el ácido α -hidroximiriístico siendo éste, un componente exclusivo de la endotoxina (89,125,145,160).

Esta combinación de ácidos grasos y grupos fosfato causa que esta parte de la molécula tenga propiedades análogas a los fosfolípidos (59).

b) La parte nuclear se encuentra en la porción media de la molécula de lipopolisacárido unido a la región lípida y a la región de especificidad antigénica O. Está constituida por azúcares, grupos fosfato y etanolamina (26,45,65,167).

Su estructura es probablemente idéntica o muy similar en varios serotipos de Salmonella sp ya que es específica de grupo; en otros géneros como Escherichia sp hay algunas diferencias estructurales (125,168). Es una parte común de los núcleos de polisacáridos de enterobacterias la que contiene 2 moléculas de heptosa unidas por un lado a una porción que contenga residuos de glucosa, galactosa o glucosamina, al otro lado está unido a un trisacárido de 2-ceto-3-desoioctanato (KDO), también existen 2 grupos fosfato en la porción de heptosa, pero no se conoce si actúan como unión en las cadenas vecinas (45).

c) El polisacárido O es la última región, contiene las cadenas O específicas que confieren la especificidad inmunológica del lipopolisacárido y de la bacteria respectiva. Están formadas por secuencia repetida de azúcares que pueden ser lineales o contener 1 o más ramificaciones, el largo y la composición de estas unidades varía en los diferentes serotipos, ya que estas cadenas son específicas de especie (45,125). Estos antígenos juegan un papel significativo en la interacción inmune

de la bacteria y el huésped, son responsables de los anticuerpos antibacterianos estimulados por la inmunización de animales y el hombre por bacterias vivas, muertas o sus extractos.

Esta región se encuentra en las formas patógenas S y está ausente en las formas mutantes R que no son patógenas (37,125,160).

Estas mutantes sintetizan lipopolisacáridos que no tienen la cadena O específica y algunas partes adicionales del núcleo, pero con excepción de la antigenicidad U, las mutantes retienen todas las propiedades de endotoxigenidad y pirogenicidad de las formas S (26, 64,65,125,126).

El calcio, magnesio y otros cationes divalentes pueden estar involu-
crados en la unión de las subunidades del lipopolisacárido ya que se ha observado que éstas tienden a agregarse en presencia de estos cationes, también se cree que estén involucrados en la unión de la endotoxina a otros componentes de la pared celular, ya que la remo-
ción de toxinas de la pared celular por EDTA que puede secuestrar estos cationes, hace pensar en esta posibilidad (45,168).

B) Relación de las partes estructurales y función biológica

Se han hecho estudios para determinar qué componente de la molécula de lipopolisacárido es el responsable de la endotoxigenidad: el lípido A, el polisacárido o ambos.

Se han hecho estudios en una mutante, Salmonella minnesota Re cuyo lipopolisacárido contiene solo lípido A y KDO. Se encontró que éste fué tan activo como los lipopolisacáridos obtenidos de la forma S, indicando que la parte polisacárida no es esencial para la endotoxi-
genidad. Sin embargo por su carácter lipofílico el polisacárido unido

al lípido A puede hacerlo más soluble o puede tener influencia en la configuración del lípido A y como consecuencia ejercer una influencia indirecta en las reacciones endotóxicas (160).

El lípido A representa el centro tóxico de la endotoxina, ésto se ha determinado probando su actividad biológica en la forma de complejos solubles con acarreadores hidrofílicos como albúmina sérica bovina. Se encontró que estos complejos exhiben actividad endotóxica comparable a las formas R, por ejemplo su capacidad para producir fiebre, necrosis de la médula ósea e interacción con el complemento, como se ha observado por la reducción en la actividad hemolítica del suero de cuyo (55, 124).

De estos resultados es evidente que el principio endotóxico se encuentra en el lípido A y que para una actividad óptima, el lípido A hidrofóbico requiere un acarreador solubilizante ya que en su estado insoluble no tiene actividad anticomplementaria (115, 159).

Por otra parte se piensa que este acarreador puede causar la exposición de un grupo tóxico hipotético o bien la estabilización de una configuración tóxica.

C) Teorías sobre el principio tóxico

Hipersensibilidad.- Stetson comparó el fenómeno de Arthus y la reacción local de Schwartzman, notando en el estudio histológico de la piel y los tejidos cercanos a la inyección intradérmica cambios parecidos a los observados en las reacciones intradérmicas. Estableció también que los efectos endotóxicos como fiebre, choque y la reacción de Schwartzman pueden ser reproducidos experimentalmente por interacción de antígenos no tóxicos con sus correspondientes anticuerpos (149, 150, 151, 152).

Farr encontró que la sensibilidad a los antígenos proteicos resulta en una curva de fiebre bifásica, similar a la producida por endotoxinas (47).

Malkiel descubrió que se puede inducir una reacción anafiláctica en el ratón por una endotoxina de B. pertussis (92).

Se ha asumido que los animales normales están hipersensibilizados contra bacterias Gram - y la existencia de este estado de hipersensibilidad en el hombre y animales, es el responsable de todas las reacciones endotóxicas (24,82).

Se ha observado que los complejos Ag-Ac producidos ' in vitro ' o removidos de la circulación, son pirogénicos cuando se administran a animales normales (127). La incubación de estos complejos con células normales ' in vitro ' libera pirogeno endógeno, entonces parece ser que estos complejos son un activador de los granulocitos para la producción de pirogeno endógeno (7).

También se ha observado esta respuesta en animales sensibles a la penicilina, estos animales responden con fiebre a la inyección de conjugados de penicilina-suero y esta reactividad también puede ser inducida en animales normales por transferencia pasiva de suero de animales hiperinmunes, las células de los animales normales liberan pirogeno endógeno cuando son incubadas ' in vitro ' con el compuesto penicilínico y en presencia de suero de animales sensibilizados (6).

Relación del tamaño de la partícula y la endotoxicidad.- Ribi y col. pretenden que se requiere un cierto tamaño de partícula para las manifestaciones tóxicas. En estudios empleando la degradación mediante hidrólisis ácida se encontró que en un cierto tamaño de

partícula la preparación no es tóxica. Aisló también un hepteno del protoplasma de E. coli biológicamente inerte, cuya composición química era similar a la endotoxina activa y de peso molecular mucho más bajo (2,97,123,132).

La hipótesis explica que la formación de endotoxina activa a partir de este hepteno inactivo ocurre a través de la polimerización de las unidades en un complejo activo, que ahora tiene el tamaño necesario para producir reacciones tóxicas. Así mismo observó que la endotoxina tratada con NAD mostró degradación y pérdida simultánea de la pirogenicidad. La dilución o la diálisis permiten la recombinación de las unidades con la recuperación de sus propiedades biológicas y suponen que la organización micelar de las subunidades resulta en una molécula activa (133).

Se debe tomar en cuenta que las subunidades pueden estar en complejos con agentes como NAD o proteínas y pueden enmascarar su reactividad o bien inhibirla (115).

D) Propiedades biológicas

Efectos en la sangre:

Leucocitos.- La administración intravenosa de endotoxina a humanos produce leucopenia transitoria seguida por una marcada granulocitosis. El grado y la duración de la leucopenia es dependiente de la dosis y se muestra como el resultado de un decremento en granulocitos debido a que los circulantes se marginan en el endotelio de los capilares.

La granulocitosis es dependiente de una reserva adecuada en la médula ósea y un mecanismo adecuado de liberación de granulocitos (4, 93).

Parece que existe activación de un factor liberador de leucocitos debido a la inyección de endotoxina, o sea que todo hace suponer que la inyección de endotoxina incrementa la producción de un factor estimulante que puede regular la granulocitopoyesis (23, 119). Estudios ' in vitro ' muestran que la endotoxina en presencia de complemento, es ingerida o se adhiere a los granulocitos e induce una serie de cambios metabólicos parecidos a los asociados con la fagocitosis (32).

Plaquetas.- Se ha observado trombocitopenia en animales experimentales después de la administración de altas dosis de endotoxinas. La trombocitopenia es debida probablemente a la agregación de plaquetas, después de la cual hay una degranulación que da por resultado el incremento de la actividad del factor 3 de las plaquetas (39, 70, 94, 137, 149).

Coagulación intravascular.- Esta es una complicación importante en la septicemia causada por bacterias Gram - en el hombre (172).

La evidencia experimental indica que la endotoxina puede causar la coagulación por 2 caminos diferentes:

- a) La interacción entre las plaquetas y endotoxina libera el factor 3 de las plaquetas que en presencia de calcio y el factor V, actúan en la activación del factor X para formar tromboplastina que transforma protombina a trombina (70).
- b) La endotoxina puede activar directamente el factor XII, el componente inicial del sistema de coagulación intrínseco. La activación ocurre por la formación de un complejo entre la parte lípida y el factor XII (100).

Complemento.- Se ha observado que la endotoxina es capaz de activar el sistema del complemento por ambas vías; la clásica y la alterna.

El complemento puede ser activado sin la participación de anticuerpos o de sus primeros componentes (C'1, C'4 y C'2). Se ha demostrado que la endotoxina causa la formación de una C₃-activador-convertasa que transforma al **proactivador-C₃** en una enzima capaz de unirse a C₃.

Los productos biológicos activos, generados después de la activación del sistema del complemento, efectúan cambios en el sistema de coagulación, en la permeabilidad vascular y en la reactividad del músculo liso (52,96).

Efectos en el sistema vascular:

La interacción de la endotoxina en el sistema cardiovascular y la producción de choque se han investigado en forma extensa (157).

El síndrome de choque endotóxico, comienza con una septicemia causada por una bacteria Gram - y la endotoxemia resultante. La endotoxina reacciona con leucocitos, plaquetas, el sistema del complemento y otras proteínas del suero mostrando un incremento en los niveles séricos de enzimas proteolíticas y ciertas sustancias vasoactivas como son histamina y serotonina (66).

Esto da como resultado acumulación de sangre, principalmente en los vasos pulmonares, hay incremento de la vasoconstricción periférica con resultado de perfusión pobre a los tejidos (129).

La potencia cardíaca disminuye por una acción depresiva directa de la endotoxina al miocardio y por descenso en el retorno venoso, secundario a la acumulación de sangre. Esta disminución inicia una serie de eventos cíclicos que comienzan con una caída de la presión arterial

y perfusión periférica, se observa una liberación de las catecolaminas endógenas para compensar la falla en la presión arterial, sin embargo éstas producen constricción arteriolar y se observa anorexia y acidosis en los tejidos que es causa de congestión y dilatación capilar que completa el ciclo y acentúa la disminución del retorno venoso y potencia cardíaca.

Con el tiempo, la hipoxia celular produce ruptura lisosomal encontrándose lisis celular con propagación de daño celular y muerte (29,31, 129).

Un rasgo característico de este síndrome es la coagulación intravascular, aún no se conoce si este síndrome es una causa o efecto de choque endotóxico, pero la hemorragia localizada o generalizada debida al consumo de los factores de la coagulación, intensifica la condición de choque.

El objeto de la terapia es romper estos efectos cíclicos, restaurando y manteniendo la integridad de la microcirculación. En el hombre, el tratamiento más efectivo es el uso de antibióticos específicos y medidas de soporte como reemplazo adecuado de fluido y mantenimiento de la respiración (30,51,118).

Efectos en el sistema endócrino:

Es muy conocida la reactividad de las endotoxinas en los ejes hipotalámico-pituitario-adrenal. La endotoxina tiene un efecto selectivo en el sistema hipotálamo-pituitaria causando la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y la hormona del crecimiento, pero no tiene influencia en la liberación de la hormona luteinizante (LH) (27,53,81).

El sitio de acción de la endotoxina no ha sido bien establecido. Hay evidencia de que la endotoxina puede derivar hacia el hipotálamo me dio y actuar directamente sobre la glándula pituitaria para liberar ACTH, después de 2 horas de inyectada la endotoxina, se puede observar una elevación significativa del cortisol plasmático. La fiebre y otras tensiones no específicas asociadas no parece que estimulen la liberación de esta hormona (91,95,98,161,163,169).

Fenómeno inmunológico:

White estableció que los polisacáridos somáticos de la endotoxina en la superficie de las bacterias Gram - confieren a estos organismos sus especificidades serológicas características (162).

El polisacárido O es un antígeno potente que puede estimular la formación de anticuerpos en animales, en cantidades de submicrogra mos (134).

La respuesta inmune es característica, 3 o 4 días después de la inyección intravenosa, los anticuerpos circulantes son medibles obteniendo su concentración máxima en 6 a 8 días.

Los anticuerpos que se forman inicialmente son principalmente IgM, los tipos IgG e IgA se presentan pocos días después (130).

Otra propiedad que presentan las endotoxinas es la de aumentar la mitogenicidad de los linfocitos. Esta respuesta parece que es exclusiva de las células B y parece que no está mediada por mecanismos inmunológicos (57,139).

Se ha estudiado el efecto adyuvante de las endotoxinas, observándose lo siguiente:

a) Un incremento en los títulos de anticuerpos

b) Aumento en el número de células productoras de anticuerpos

c) Eliminación acelerada del antígeno

d) Disminución del período de latencia (74, 112).

Fenómeno de Shwartzman:

Si a un conejo se le inyecta intradérmicamente la endotoxina y si el mismo material es inyectado intravenosamente 24 horas después, se observa el desarrollo de una lesión necrótica y hemorrágica en el sitio de la inyección intradérmica (138).

La reacción no es específica ya que se pueden utilizar endotoxinas de diferentes microorganismos en las inyecciones, observándose el mismo efecto (45).

La reacción generalizada de Shwartzman requiere en el conejo de 2 inyecciones intravenosas espaciadas comúnmente con un intervalo de 24 horas. Se observa necrosis cortical renal bilateral seguida de un acúmulo de fibrina, secundaria a la coagulación intravascular; en este mecanismo están involucrados productos del granulocito como el factor promotor de la coagulación (69,83,120,148).

Efectos en el metabolismo:

Carbohidratos.- La inyección de endotoxina en animales produce una hiperglucemia que es seguida de un decremento rápido de azúcar sanguíneo a niveles hipoglucémicos y disminución del glucógeno hepático. En el ratón, la hipoglucemia es de tal severidad que puede causar la muerte (73,136).

Lípidos.- La inyección de endotoxina en conejos produce hiperlipemia que se caracteriza por un aumento rápido y transitorio de ácidos grasos. A las 24 horas hay elevación de los niveles séricos de colesterol

rol, fosfolípidos y triglicéridos (67).

Minerales.- Se ha demostrado hipoferremia proporcional a la dosis cuando se inyecta endotoxina en el hombre, con un decremento máximo en 8 o 10 horas después de la inyección (43), suponiéndose que hay un decremento en la capacidad sérica de unión con el hierro (78).

Resistencia inespecífica a la inyección.- La administración de endotoxina puede alterar la resistencia a la infección bacteriana (18,131), fúngica (79,80) y viral (135,156) en diferentes especies animales.

Este cambio en susceptibilidad se caracteriza por un incremento transitorio de ésta llamado fase negativa, seguido de un incremento de la resistencia no específica a la infección, el mecanismo no es claro pero hay una actividad aumentada en el sistema retículo-endotelial y los macrófagos (3) hay granulocitosis (33) y cambios en el metabolismo del hierro (44).

Tolerancia.- Cuando las endotoxinas se administran a hombres y animales en dosis subletales repetidas, se observa una disminución progresiva de sus efectos biológicos especialmente fiebre (13).

La tolerancia producida no es específica, ya que se puede inducir reacción cruzada con endotoxinas de microorganismos no relacionados serológicamente. Esta propiedad diferencia a las endotoxinas de otros pirógenos, como por ejemplo, algunos pirógenos de hongos patógenos no producen tolerancia, en tanto que en otros la tolerancia es muy específica (25).

El mecanismo de producción de tolerancia aún no se conoce; se ha observado que hay transferencia pasiva de tolerancia a conejos, por

lo que algunos investigadores sugieren que alguna fracción globulínica del suero, una 19 S es la responsable (60, 158).

3.- Pirógenos

A) Introducción

La fiebre resulta de una alteración en el sistema regulador de la temperatura corporal que se encuentra en el hipotálamo.

Estudios en pacientes febriles indican que el punto alrededor del cual se mantiene la temperatura del cuerpo, usualmente se eleva durante el acceso febril.

Cuando la temperatura aumenta, la pérdida y ganancia de calor son finamente balanceadas a este nivel nuevo, como la temperatura normal del cuerpo durante la salud (88).

Los pirógenos se han dividido en:

- a) Pirógenos exógenos.- Son agentes externos como las endotoxinas
- b) Pirógenos endógenos.- Son sustancias derivadas de los tejidos del animal huésped, se llaman también pirógenos leucocitarios (37).

Los pirógenos pueden producir fiebre por:

- a) Por acción directa de la endotoxina en el centro termo-regulador del cerebro; esto se basa en que la inyección de endotoxinas dentro del sistema nervioso central produce fiebre con dosis mucho menores que las producidas por inyección intravenosa (17).
 - b) Por acción indirecta; la respuesta que se observa después de la inyección intravenosa y antes del ataque febril, sugiere que se lleva a cabo algún proceso intermediario en el cuerpo (42,59,128).
- Primero se observa un período de latencia que fué establecido en voluntarios humanos mediante la medida cuidadosa de la temperatura

del cuerpo y el fluido sanguíneo de la piel, se encontró que fué aproximadamente 1 a 2 horas antes del aumento de la temperatura. La duración de este período es dependiente de la dosis (167). Cuando se incubó una alícuota de sangre con la misma dosis de endotoxina usada en los experimentos anteriores y se inyectó esta mezcla por la misma vía, la respuesta febril se observó en un lapso de 15 a 20 minutos (56).

Evidentemente la endotoxina ha interactuado ' in vitro ' con las células del huésped. El daño causado libera ciertos materiales como son pirógeno endógeno y probablemente otros que producen una reacción en cadena (168).

B) Estudios 'in vivo' e 'in vitro'

a) Estudios 'in vivo'

Se ha encontrado en animales un pirógeno endógeno circulante, en el huésped sensible, durante infecciones bacterianas y virales, después de la administración de endotoxina, partículas de plástico o antígenos. En el hombre, el pirógeno endógeno se ha demostrado después de la administración de endotoxinas, pero no se ha encontrado en fiebre natural, probablemente porque el pirógeno endógeno se encuentra en baja concentración en la sangre y en el hombre hay límites en los volúmenes que pueden ser removidos experimentalmente (55,141,142). Snell ha demostrado que el pirógeno endógeno se encuentra en concentraciones altas en exudados inflamatorios y se ha obtenido en pacientes febriles que presentan carcinoma renal (121).

Otras fuentes de pirógeno endógeno en animales han sido exudados peritoneales inflamatorios, linfocitos del ducto torácico en perito

nitis pneumococcica, extractos de piel con reacción de Arthus o Shwartzman (145).

FUENTE	ESTIMULO
Plasma	Infecciones virales y bacterianas Endotoxinas Partículas Antígeno
Exudados	Inflamación bacteriana
Linfocitos del ducto torácico	Peritonitis bacteriana
Tumor	Carcinoma renal Carcinoma de ovario
Piel	Reacción de Arthus Reacción de Shwartzman

b) Estudios 'in vitro'

Los experimentos de incubación han definido a las células capaces de liberar pirógeno endógeno, el proceso que envuelve a la célula, su desarrollo y producción; sin embargo, se hace en un medio artificial y los resultados no pueden ser paralelos a la producción 'in vivo'.

La información resultante de estos experimentos ha sido bastante notable (7, 144).

c) Células productoras de pirógeno endógeno

En los experimentos de Bennett, el granulocito fué la única célula productora de pirógeno endógeno y se creyó que si no la única, si era la mayor fuente de producción de pirógeno endógeno (14,15,16). Las suspensiones de granulocitos liberan pirógeno endógeno cuando son incubadas 'in vitro' con varios agentes microbianos; sin embargo no se explicaba la fiebre característica observada en pacientes con enfermedades en donde predominan en la sangre monocitos o macrófagos o sea que hay agranulocitosis.

Se hicieron experimentos con conejos sensibilizados frente a la tuberculina con inyecciones intravenosas de BCG. Se obtuvieron los macrofágos del pulmón y se incubaron, se observó la producción de grandes cantidades de pirógeno endógeno ' in vitro'. También se obtuvo pirógeno endógeno de células mononucleares en exudados peritoneales crónicos inducidos en conejo por aceite mineral (8,143); así como en experimentos llevados a cabo recientemente 'in vitro' con células sanguíneas de pacientes con leucemia monocítica y agranulocitosis, mostrándose que cuando se incubaron con estafilococos muertos por el calor, liberaron grandes cantidades de pirógeno endógeno (20).

Estos resultados confirman que las células mononucleares en humanos también son una fuente de pirógeno endógeno.

Las células de Kupffer pueden ser también activadas para producir pirógeno endógeno por varios agentes microbianos incluyendo tuberculina y endotoxina; en tanto que los hepatocitos que no son fagocíticos, son inactivos (40).

No se ha demostrado que los linfocitos liberen pirógeno endógeno,

en preparaciones provenientes de sangre humana, no hay liberación de pirógeno endógeno 'in vitro' en respuesta a variedad de estímulos, se sugiere que los linfocitos tienen un papel en la fiebre asociada a estados de sensibilidad tardía ya que cuando los linfocitos obtenidos de los nódulos linfáticos de conejos sensibilizados a proteínas heterólogas se encuentran 'in vitro' con el antígeno, parece que liberan una substancia no pirogénica que activa a los leucocitos sanguíneos normales para que produzcan pirógeno endógeno 'in vitro', esta substancia parece una linfocina. La existencia de estos activadores puede explicar la patogénesis de fiebre en donde no existe activador exógeno aparente, por ejemplo cuando existe inflamación sin infección concomitante (8,41).

Las células que liberan pirógeno endógeno parece que son aquellas capaces de fagocitar; sin embargo la correlación entre la fagocitosis y la liberación de pirógeno endógeno no es clara (20).

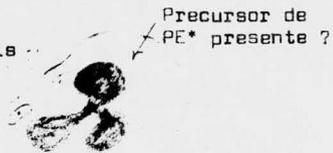
D) Proceso de activación de los leucocitos

Los leucocitos circulantes, predominantemente polimorfonucleares de conejo o humanos, no liberan pirógeno endógeno dentro de las incubaciones 'in vitro' cuando no se han estimulado con endotoxina o cuando la fagocitosis no es estimulada. Después de la activación, la célula presenta cambios metabólicos y morfológicos que también ocurren como resultado de ingestión de partículas, estos cambios incluyen incremento en la glucólisis, en la respiración, se observa lisis de gránulos con liberación de enzimas hidrolíticas dentro de las vacuolas celulares y también dentro del medio de incubación. La relación de estos eventos y la producción de pirógeno endógeno dentro de la célula no se conoce.

Activación

Principio de la producción

Fagocitosis

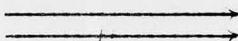


Síntesis nueva

Precursor de PE* ?

Enzimas ?

1 a 2 horas



Y

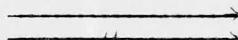
Cambios metabólicos
 Aumento de consumo de O_2
 Aumento en producción de CO_2
 Aumento de glucólisis
 Lisis de gránulos

Actinomicina D
 Puromicina
 Cicloheximida
 Fluoruro de sodio
 Iodoacetato



Final de la producción y liberación

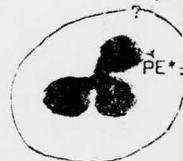
Después de 1 a 2 horas



No tiene efecto

Iodoacetato
 Actinomicina D
 Puromicina
 Cicloheximida
 Fluoruro de sodio
 Cianuro

Precursor de de PE*



Enzima - ?

PE* -> PE*

* PE Pirógeno endógeno

Diagrama esquemático de los pasos que se llevan a cabo en la producción y liberación de pirógeno endógeno por leucocitos humanos estimulados (fagocitosis).

El pirógeno endógeno no es detectable en concentraciones apreciables en las células o en el medio de cultivo durante la primera o segunda hora después de la estimulación; la producción y liberación de éste puede ser inhibida por actinomicina, puromicina o cicloheximida, agentes que interfieren con la nueva síntesis de RNA y proteínas requeridas en este proceso.

Estos inhibidores no tienen efecto cuando se agregan 2 horas después de la estimulación de la célula, ya que se ha iniciado la producción de pirógeno y que la liberación dentro del medio comienza (7,21,113, 145).

Parece que las células no necesitan un suplemento continuo de energía en este paso ya que cuando se añade fluoruro de sodio en concentraciones que bloquean la glucólisis después de las 2 primeras horas, no se observa inhibición de la producción de pirógeno. Los inhibidores del metabolismo oxidativo no evitan la liberación, pero agentes como el iodoacetato y el tiocianato que poseen grupos sulfhidrilos activos son inhibidores efectivos (21,22,99,113).

Se requiere la estructura celular intacta para la producción y liberación, ya que los homogenados celulares no generan pirógeno detectable. Los leucocitos rotos contienen solo una pequeña fracción del pirógeno liberado por las células intactas dentro del medio después de la estimulación (72,145).

Se sugiere que las células productoras de pirógeno contienen una molécula precursora no pirogénica que puede llegar a ser pirogénicamente activa por pasos enzimáticos simples (22,58,128).

Después de la activación, la célula presumiblemente sintetiza

moléculas precursoras, las enzimas necesarias o ambas. Se desconocen muchos pasos hipotéticos.

En el primer paso se cree que hay una alteración de la membrana celular por el agente estimulante que inicia los cambios en las células que llevan a la producción de pirógeno. No hay una relación clara entre los cambios metabólicos y morfológicos y la síntesis de la nueva proteína crítica que dirige la liberación de pirógeno. En resumen, aunque se han efectuado muchos experimentos no se ha identificado ni la molécula precursora, ni la enzima o enzimas necesarias para la conversión de un pirógeno activo (5,8).

Se ha estudiado el mecanismo de la liberación de pirógeno empleando células polimorfonucleares del exudado peritoneal del conejo, se ha demostrado que las células comienzan a liberar pirógeno cuando son suspendidas en solución salina fisiológica que carezca de iones potasio; la liberación cesa cuando se añaden estos iones. También se observó un incremento en la pérdida de algunas enzimas celulares debido a la permeabilidad de la membrana cuando las células están liberando pirógeno y puede ser una condición importante para la liberación (19,62,76,77).

E) Características del pirógeno endógeno

Contiene uniones peptídicas ya que se ha visto que su actividad es destruida por enzimas proteolíticas tales como pepsina, tripsina o pronasa; contiene poca cantidad de carbohidratos y una cantidad doble de lípidos en relación a aquéllos.

El producto más pirogénico de la sangre y exudados tiene un peso molecular de 10,000 a 20,000; sin embargo en algunas preparaciones se encuentran productos celulares de P.M. mayor que también son pirogénicos.

cos (145).

La molécula pierde pirogenicidad rápidamente a pH alcalino mayor de 8.1 o a una temperatura de 56 °C (101).

La estabilidad de la molécula se ve aumentada en presencia de agentes sulfhidrilo reductores, sugiriendo que éstos son esenciales para la pirogenicidad. Los pirógenos producidos por una especie son frecuentemente activos en animales de diferentes especies, por ejemplo, el pirógeno endógeno humano, produce fiebre en conejos.

Las variaciones en estructura molecular probablemente tengan diferente potencia pirogénica para un pirógeno endógeno dado en diferentes especies.

Este material difiere de las endotoxinas por 3 propiedades que son:

- 1.- Es lábil al calor
- 2.- Su incapacidad para producir tolerancia con inyecciones repetidas
- 3.- Su período de latencia (140).

F) Acción fisiológica

Se ha estudiado el sitio de acción del pirógeno endógeno inyectándolo en pequeñas cantidades en varias partes del cerebro. Se observa fiebre de rápida aparición cuando el material se introduce en el hipotálamo anterior pero no en otros sitios como el cerebelo o corteza cerebral (36).

Las neuronas termosensitivas se han encontrado predominantemente en el hipotálamo anterior. Las áreas que responden a una inyección local del pirógeno endógeno e inducen fiebre, también están localizadas en el hipotálamo anterior, el pirógeno actúa sobre el área preóptica an

terior del hipotálamo en el cerebro, para cambiar su relación temperatura/actividad (59,145).

El pirógeno endógeno altera la sensibilidad de ciertas neuronas termosensitivas que actúan hacia la periferia a través de vías termorreguladoras. Las acciones de la pérdida de calor son suprimidas y las de conservación de calor son activadas (59).

El mecanismo preciso mediante el cual el pirógeno endógeno altera la función o la clase de neuronas afectadas aún no se conoce. Se han postulado alteraciones del balance iónico en experimentos realizados con gatos, haciendo perfusiones en los ventrículos cerebrales con soluciones de diferente composición, se ha observado que la constancia de la temperatura depende del balance de los iones sodio y calcio. El calcio actúa como un bloqueador que evita el efecto hipertérmico de los iones sodio. Se cree que los pirógenos actúan removiendo el calcio y la fiebre puede ser causada por el sodio (49,50,155).

Una nueva área de investigación dentro de la causa de fiebre se ha abierto por la observación de que se inducen cambios termorreguladores profundos por la administración de epinefrina, norepinefrina y serotonina (12).

G) Mecanismo hipotalámico

Se ha sugerido que el pirógeno puede hacer que las células del hipotálamo anterior liberen un neurotransmisor, serotonina. Esto puede ser posible porque esta monoamina se encuentra en concentraciones relativamente altas en el hipotálamo y porque los aumentos de concentración en esta parte, se traducen en un aumento de tempe

ratura de tipo pirógeno en experimentos realizados en el gato (48) y mono (102).

En experimentos realizados con monos no anestesiados, se encontró que se liberó serotonina del hipotálamo anterior cuando el animal fué sometido al frío (103), aún no se conoce si esta liberación es la que dispara la fiebre cuando se trata de un pirógeno, sin embargo la evidencia de que este sea el primer paso es fuerte ya que microinyecciones de endotoxina o serotonina dentro del área anterior de un mono producen hipertermia (104,107) y la similitud de la fiebre provocada por endotoxina o serotonina puede ser la llave para entender la acción local del pirógeno.

Se observó que la endotoxina causa liberación de serotonina de las plaquetas, la misma respuesta podría ocurrir dentro de los capilares del hipotálamo anterior (71). Los minutos de latencia que se observan después de la inyección de endotoxina dentro del hipotálamo anterior, podrían explicarse en base a que la concentración local de serotonina proveniente de las plaquetas debe aumentar más de 3 veces para actuar en los sitios receptores y provocar fiebre (106).

Se cree que la región posterior del hipotálamo también juega un papel importante en la regulación de la temperatura, ya que se ha observado que cuando es perfundida una solución de cloruro de sodio a través de los ventrículos cerebrales, causa escalofrío y aumento de la temperatura en el gato conciente (49). La adición de calcio en concentraciones fisiológicas bloquea la respuesta producida por el cloruro de sodio.

La región posterior del hipotálamo no es sensible a la aplicación de

serotonina, pero la temperatura del cuerpo puede ser alterada por un cambio en el balance de los cationes mencionados en esta región. Se cree que la relación de estos 2 cationes en el fluido extracelular, más que el nivel de cada uno, gobierne al patrón de las células para mantener la temperatura en un punto específico (105). Se ha observado que la endotoxina puede disminuir la concentración de calcio sérico. La hipertermia es producida por una alteración del balance iónico de sodio y calcio, en favor del sodio, puede suceder que una disminución de calcio en el suero que fluye a través del hipotálamo, produzca un aumento en la temperatura o bien, puede ser que la alteración del balance iónico sea solo transitoria y facilitada por la acción del pirógeno sobre el sistema intersticial no conocido que mantiene los constituyentes iónicos a un nivel constante, tomando en cuenta las variaciones de la concentración sérica (108).

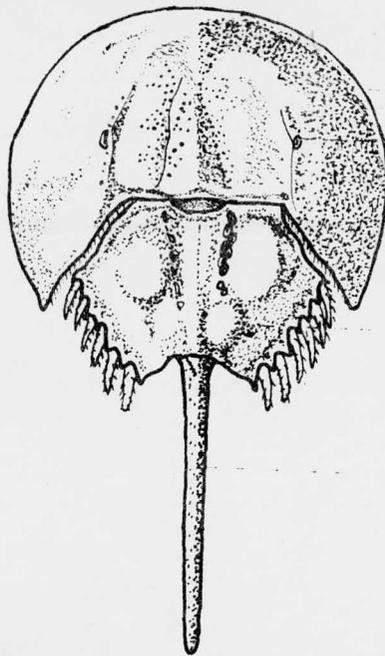
4.- Especie Limulus polyphemus

A) Descripción

Es un animal marino que pertenece al phylum Arthropoda, subphylum Chelicerata, clase Merostomata, subclase Xiphosura.

Su cuerpo se divide en cefalotórax y abdomen. Se caracteriza por 5 o 6 pares de apéndices abdominales y por un telson al final del cuerpo. No tiene antenas y el primer par de apéndices preorales se llaman queliceros.

Apareciendo en el período Ordoviciano, sólo 3 géneros y 4 especies componen los únicos representantes vivos en la actualidad; una de estas especies es Limulus polyphemus. Se encuentra en la costa noreste del océano Atlántico y en el Golfo de México. Los otros miembros de este



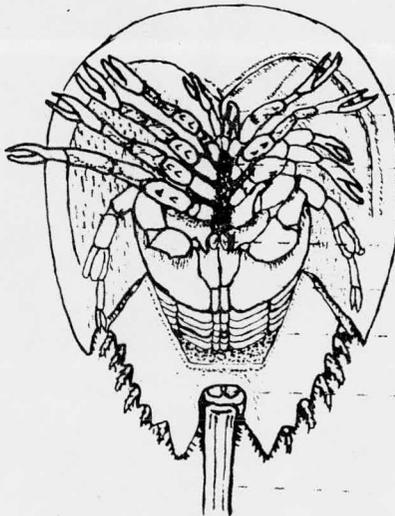
Carapacho

Ojo

Abdomen

Telson

Vista dorsal



Queliceros

Pedipalpos

Boca

Quilaria

Opérculo genital

Branquias

Poro anal

Telson

Vista ventral

Limulus polyphemus

grupo se encuentran a lo largo de la costa asiática en Japón, Corea, India oriental y Filipinas.

Vive en agua poco profunda, se traslada a través de la superficie de la arena en desplazamientos cortos, puede alcanzar una longitud de 60 cm y es de color café oscuro.

El caparazón es rugoso, tiene forma de herradura, convexo en la parte superior y cóncavo en la inferior,

En el cefalotórax presenta 5 pares de patas que utiliza para caminar. Las 4 primeras patas en su parte superior están armadas con espinas, su función es macerar y mover la comida hacia la boca, la parte inferior termina en pinza. El último par de patas no presenta espinas en su parte superior, presenta un conjunto espatulado que se utiliza para limpiar las branquias.

El último par de apéndices que se encuentra en el cefalotórax recibe el nombre de quilaria y consiste en una sola articulación armada de pelos y espinas y su función consiste probablemente en macerar y mover la comida.

El abdomen no es segmentado, presenta a cada lado 6 espinas cortas móviles que se encuentran en el borde de la parte posterior. Muestra en su parte inferior 6 pares de apéndices. El primer par forma el opérculo genital, es una estructura larga, membranosa, semejante a un ala. Los 2 poros genitales se localizan en la parte baja de esta estructura.

Posteriores al opérculo genital se encuentran 5 pares de apéndices modificados como branquias, son membranosos y con forma de ala. La parte interior de cada una de estas estructuras está formada por muchos dobleces con forma de hoja llamados laminillas, estas proveen

la superficie de intercambio gaseoso. Cada branquia contiene aproximadamente 150 laminillas, el movimiento de las branquias mantiene una circulación constante de agua sobre ellas.

El telson se encuentra en la parte posterior del abdomen, no es un telson real ya que no presenta el poro anal, es altamente móvil y puede ser usado para impulsar y colocar correctamente el cuerpo cuando el animal accidentalmente se voltea. No es utilizado por el animal como medio de defensa y el *Limulus* puede ser capturado y transportado utilizando el telson.

El *Limulus* es un animal que se alimenta de carroña, consume además moluscos, lombrices y otros organismos incluyendo algas que habitan en el fondo.

En el principio del verano, durante el apareamiento y la postura, hembras y machos se congregan en las zonas alrededor de las costas en bahías y estuarios; las hembras cavan una serie de depresiones en la arena y depositan de 200 a 300 huevos. Los huevos en cada depresión son fertilizados por el macho durante su deposición. Después los animales apareados se separan y los huevos se cubren de arena y son abandonados.

Después de un tiempo emerge del huevo una larva de aproximadamente 1 cm de largo que tiene una similitud superficial con los trilobites, un artrópodo fósil, es muy activa nadando y cavando en la arena, el telson es muy pequeño y solo tiene 2 pares de branquias, conforme pasa el tiempo se llevan a cabo varias mudas, los pares de branquias que faltan aparecen, el telson se alarga y el cangrejo joven asume la forma adulta.

La madurez sexual no se logra hasta el tercer año de vida (11, 63, 90).

Los animales marinos habitan en un medio ambiente en donde existen gran número de bacterias Gram -.

La inoculación de una especie de *Vibrio* patógena para el *Limulus*, o su endotoxina, pueden causar una enfermedad progresiva caracterizada por marcada amebocitopenia, coagulación intravascular con subsiguiente pérdida de la coagulación y muerte (9,84).

La sangre del *Limulus* contiene un solo tipo celular, el amebocito; los amebocitos tienen aproximadamente las medidas de un macrófago de mamífero y presentan gránulos, se ha descrito que tienen un núcleo que no es aparente hasta que los gránulos se desbaratan y desaparecen durante la coagulación.

La endotoxina del *Vibrio* causa la aglutinación de los amebocitos, se observa degranulación y ruptura de estas células; los gránulos antes de la ruptura se hinchan y vuelven refrigentes, se observa liberación de enzimas que causan la formación de un gel que inmoviliza a la bacteria que contiene la endotoxina.

El amebocito tiene un papel muy importante en la coagulación. Cuando se extrae sangre completa del *Limulus*, se forman rápidamente conglomerados compuestos de amebocitos agregados, posteriormente este agregado disminuye y aparece una fase líquida. Este material se ha llamado pre-gel y produce gelificación cuando se expone a las endotoxinas bacterianas (84).

El plasma del animal libre de células no es coagulable, pero esta propiedad le puede ser conferida por la adición de amebocitos. El lisa-

do celular preparado de amebocitos produce un gel en presencia de endotoxinas lo que indica que la proteína que coagula proviene totalmente de los amebocitos. No se requieren los factores del plasma para esta reacción. La cinética de la reacción entre el lisado de amebocitos y la endotoxina se estudió midiendo los cambios en la densidad óptica; los resultados indican que la conversión de la proteína en un gel en presencia de endotoxinas es mediado por una enzima que se designa como pro-coagulante (86,87).

B) Método de obtención del lisado de amebocitos

Los animales se colocan en agua corriente y a temperatura ambiente unas horas antes de ser sangrados, se manipulan de manera que de de expuesta la membrana entre los segmentos torácico y abdominal, esta área se limpia con alcohol al 70 %. La aguja se inserta dentro del seno ventral de la cámara cardíaca. Después de la punción, la sangre de color azul se colecta en frascos de centrifuga silico nizados colocados en un baño a 40 °C que contengan volúmenes iguales de solución de cloruro de sodio al 3% adicionada de 0.125 % N-etilmaleimida que debe ser agregada justo antes de usarse y amo tiguador de Tris. El tubo de centrifuga se deja reposar durante 90 minutos agitando ocasionalmente de manera suave. La mezcla se centrifuga a 300 rpm por 6 minutos para que los amebocitos sedimenten. Todo el material utilizado debe estar libre de pirógenos. La N-etil maleimida actúa como un anticoagulante y estabiliza la membrana cel lular durante el proceso de lavado.

El lavado consiste en la resuspensión cuidadosa de las células en solución de cloruro de sodio al 3 % caliente (40 °C) y se centrif fugan a 300 rpm por 6 minutos. El fluido sobrenadante se descarta

y las células se vuelven a resuspender en la misma solución; esto se repite 3 veces.

Después del tercer lavado, las células son transferidas a tubos graduados con tapón de rosca para proceder a lisarlas (68,111,122). El medio usado para suspender las células para lisarlas puede ser agua destilada (87) o amortiguador Tris que tenga un pH de 7 y que contenga solución salina al 3 % (170). El medio se usa en una proporción de una parte del paquete de células y dos partes de medio. Después de añadir el medio, los amebocitos pueden ser lisados por varios métodos:

Mezclador vortex: La suspensión celular se lleva a la máxima velocidad de mezclado durante 1 minuto para que se lleve a cabo apropiadamente la lisis.

Sonificación: La suspensión se trata en un " Sonifier Cell Disrupter, Melville N.Y. " con el pulso máximo de 10 unidades por 2 o 3 segundos.

Lisis osmótica: Los amebocitos lavados se suspenden en agua destilada.

Todos los lisados celulares se llevan a cabo a -70° C.

Ya obtenido el lisado, éste se lleva a 4° C durante 24 horas, después de este período, el lisado se centrifuga a 900 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante es removido y guardado a -20° C hasta que se lleva a cabo la prueba de sensibilidad.

Esta prueba se hace con objeto de determinar la sensibilidad de cada lote de lisado. Para esto se utilizan preparaciones de lipopolisacáridos de bacterias Gram - como son Klebsiella o E. coli, las dilu-

ciones que se emplean son de 0.1 a 0.0001 μ g/ml. El método empleado para llevar a cabo esta prueba está explicado en MATERIAL Y METODO. Una vez realizada esta prueba, el lisado está listo para ser liofilizado. El lisado se introduce en las ampulas, los tapones se insertan parcialmente y se llevan al liofilizador que ha sido previamente enfriado a -50°C y se secan durante 24 horas. Transcurrido este lapso y estando las ampulas aún con vacío, se colocan los tapones firmemente. El liofilizado se retira del aparato y se guarda a 4°C . Está listo para su uso (68).

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO

A) Reacción febril en conejo:

Baño de agua a 37 °C

Tele-termómetro YSi modelo 47 TA de 11 canales

Matraces Erlenmeyer de 125 ml con tapón esmerilado

Pipetas serológicas de 1,5 y 10 ml

Agujas hipodérmicas de metal

Jeringas de vidrio de 5, 10 y 20 ml

Torundas de algodón impregnadas de alcohol y benzal

Conejos

B) Método de lisado de amebocitos de Limulus

Estufa a 37 °C

Agitador Vortex

Tubos de ensayo de 12 X 75 mm con tapón de rosca (desechables)

Pipetas serológicas de 0.1, 1, 5 y 10 ml

Matraces Erlenmeyer de 125 ml con tapón esmerilado

Lisado de amebocitos de Limulus comercial

Endotoxina de E. coli

Agua libre de pirógenos

Soluciones de HCl 0.1 mol/litro y NaOH 0.1 mol/litro

Nota: Todo el material y las soluciones deben estar libres de pirógenos.

Muestras problema para ambos métodos:

Gamma globulina humana y equina

Albúmina humana

Factor antihemofílico

Sueros para aplicación en gran volumen (Solución salina isotónica, solución salina glucosada, solución de Darrow, solución de lactato 0.6 mol/litro)

Ampicilina

Nota: Todo el material biológico se obtuvo de preparados co
merciales.

El material de vidrio, así como las agujas hipodérmicas de metal, se conservaron libres de pirógeno mediante el siguiente tratamiento: El material se lavó perfectamente con Extrán y se enjuagó con agua corriente, posteriormente con agua des
tilada, se envolvió con papel de aluminio y se metió al horno a 250 °C por espacio de 2 horas.

Las soluciones de HCl y NaOH se prepararon con agua libre de pirógenos, en forma aséptica y se llevaron al autoclave durante 2 horas a 121 °C.

A) Reacción febril en conejo

Fundamento:

La endotoxina al ser inyectada por vía intravenosa al animal, interactúa con las células de éste (leucocitos principalmente) activándolas y haciendo que liberen pirógeno endógeno, éste actúa en el área preóptica anterior del hipotálamo obser
vándose un aumento en la temperatura rectal del animal.

Método:

Se emplearon conejos Nueva Zelanda machos cuyo peso osciló entre 1.5 y 2.5 Kg.

Los conejos se encuentran en jaulas individuales en un local
→ adyacente al cuarto en donde se lleva a cabo la prueba,) los
animales se alimentan con alimento concentrado. Se les reti-
ra el alimento 1 día antes de la prueba, sólo toman agua.
(Dos días antes de la prueba, a los animales se les hace una
prueba en blanco inyectándoles agua destilada libre de piró-
genos, para determinar si su temperatura es estable, con obje-
to de que no existan grandes variaciones en la temperatura
basal) que debe encontrarse entre los 38 a 39.8 °C, los anima-
les que presentan una temperatura mayor, así como los que
presentan una variación muy marcada en su temperatura basal
son eliminados.

El local donde se lleva a cabo la prueba se encuentra libre de
ruidos con objeto de que los animales no se pongan nerviosos y
en consecuencia presenten un aumento en la temperatura, la luz
está controlada así como la temperatura y humedad con objeto
de que las condiciones sean constantes y los resultados más
exactos.

El día de la prueba los animales se trasladan a este local 30
a 45 minutos antes de llevarla a cabo con objeto de que se a-
climaten, durante este lapso se inmovilizan en sus cajas de
sujeción y se les coloca el termómetro, ya que están prepara-
dos se les toma la temperatura basal.

Diez minutos después a los animales se les inyectan las mues-
tras problema previamente calentadas a 37 °C en la vena mar-
ginal de la oreja y se dejan tranquilos. A los 60 minutos se

toma la primera lectura, a los 120 minutos se toma la segunda lectura y a los 180 minutos se toma la tercera. Cuando termina la prueba, los animales se trasladan a sus jaulas; los que no han presentado reacción febril se pueden utilizar posteriormente empleando otro tipo de sustancias. Los animales febriles se desechan.

Se utilizaron 3 conejos por muestra, la dosis inyectada y las sustancias probadas fueron las siguientes:

Gemma globulina humana y equina	1 ml/kg de peso
Factor antihemofílico	1.7 ml/kg de peso
Albúmina	3 ml/kg de peso
Antibióticos:	
Ampicilina sódica 20 mg/ml	1 ml/kg de peso
Soluciones que se aplican en gran volumen:	
Solución isotónica de cloruro de sodio	10 ml/kg de peso
Solución salina glucosada	
Solución de Darrow	
Solución de dextrosa	
Solución de lactato 0.6 mol/litro	
Endotoxina en concentraciones de:	
1000, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125,	1 ml/kg de peso
1.6, 0.8, 0.4 ng/ml	

Se empleó el método de la U.S. Pharmacopeia XVIII, en el cual la elevación individual de la temperatura de un animal no debe ser superior a 0.6 °C de su temperatura basal y la suma del

cambio máximo de 3 temperaturas no sea superior a 1.4 °C. Si se cumple lo anterior se considera que el producto no tiene pirógenos. Si no se cumple lo anterior se repite la prueba usando 5 conejos.

B) Método de lisado de amebocitos de Limulus

Fundamento:

Levin y Bang sugieren que la gelificación del lisado de amebocitos de Limulus mediada por endotoxina, se inicia enzimáticamente (84). El exámen posterior del gel muestra una matriz de fibras muy finas cuyo diámetro varía de 50 a 100 μ m (54). La evidencia en los estudios indica que son necesarias cuatro substancias para que se lleve a cabo la reacción; estas sustancias son: La enzima pro-coagulante, las proteínas coagulantes (Coagulógeno), cationes divalentes principalmente iones calcio y lipopolisacárido de bacterias Gram-.

La reacción se cree que se inicia con la activación de la enzima pro-coagulante debida a los iones calcio y la endotoxina.

La enzima activada cataliza la ruptura hidrolítica de las proteínas coagulantes, dando como resultado subunidades de polipéptido. Estas proteínas se rompen en tres partes a las que se les ha dado el nombre de cadenas A , B y C. Las cadenas A y B se encuentran unidas por enlaces disulfuro formando el coágulo. La cadena C liberada de la porción inerte de la molécula no se incorpora en el coágulo (54,84,109,146,147,153,154,171).

El mecanismo mediante el cual las proteínas coagulantes son rotas por la enzima pro-coagulante se cree que es similar al que

realiza la tripsina, ya que la reacción de coagulación es inhibi
da por substancias como el di-isopropil fluorofosfato el cual
inhibe a la tripsina (110,154).

Enzima pro-coagulante

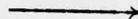
PM 150,000

+

Iones calcio

+

Endotoxina



Activación de la enzima

pro-coagulante

La enzima activada rompe el coagulogeno en subunidades de polipéptido

Proteínas coagulantes

(Coagulógeno)

PM 21,000

Enzima



activada

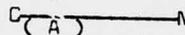
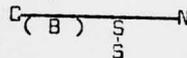
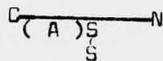
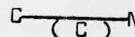
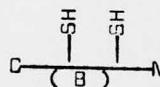
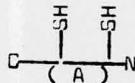
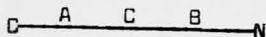
Cadenas A y B

Se encuentran en el gel

+

Cadena C

No se incorpora al gel



Oxidación de los grupos

sulfhidrilo

Matriz proteica del gel via

uniones disulfuro

Método:

Preparación de los controles positivos:

El agua que se emplea debe ser libre de pirógenos y precalentada a 37 °C.

Todas las manipulaciones se hacen asépticamente.

Se hidrata la endotoxina de E. coli por adición de 5 ml de agua al frasco ampula que la contiene, agitando vigorosamente 30 minutos con mezclador Vortex. La concentración de esta solución es de 500 microgramos por mililitro. Se rotula como solución A.

De esta solución stock se preparan las siguientes diluciones agitando cada solución por 60 segundos en el Vortex.

- 1.- Se añade 1 ml de la solución A a 99 ml de agua. Esta solución tiene una concentración de 5 microgramos por mililitro y se rotula solución B.
- 2.- Se añade 1 ml de la solución B a 9 ml de agua. Esta solución tiene una concentración de 0.5 microgramos por mililitro y se rotula solución C.
- 3.- Se añade 1 ml de la solución C a 9 ml de agua. La concentración de esta solución es de 0.05 microgramos por mililitro y se rotule Control Positivo de Agua.
- 4.- Se añade 1 ml de solución B a 9 ml de muestra problema. La concentración de esta solución es de 0.5 microgramos por mililitro y se rotula solución D.
- 5.- Se añade 1 ml de la solución D a 9 ml de la misma muestra. La concentración de esta solución es de 0.05 microgramos por mililitro y se rotula Control Muestra Positivo.

El control de agua positivo se hace con objeto de saber si el lisado de amebocitos está reaccionando apropiadamente o sea que su actividad no se encuentra destruída por degradación.

El control de muestra positivo se hace con el objeto de saber si no hay en la muestra alguna substancia que inhiba la formación del gel.

Se prepara también un control de agua negativo o sea que a éste no se le agrega endotoxina con objeto de saber si el agua que se ha empleado para llevar a cabo la reacción se encuentra libre de pirógenos.

Preparación de la muestra:

El pH de la muestra debe encontrarse dentro de los valores 6.0 a 7.5, si se encuentra fuera de éstos, debe ser ajustado con solución 0.1 mol/litro de NaOH o bien de HCl 0.1 mol/litro estéril y libre de pirógenos.

Si no se lleva a cabo el ajuste del pH de la muestra, se puede producir la gelificación pero en un grado bajo, o sea que se forma un gel firme pero muy frágil y en el momento de invertir se rompe dificultando la lectura del resultado.

Preparación del reactivo de Limulus:

- 1.- Se hidrata el liofilizado añadiendo en forma aséptica 1.2 ml de agua estéril y libre de pirógenos al frasco que lo contiene. Se agita de manera suave y continua durante 30 segundos. No se debe formar espuma.
- 2.- Se distribuye el lisado hidratado en los tubos desechables de 10 X 75 mm con tapón que están estériles y

libres de pirógenos, en cantidades de 0.1 ml. Se tapa inmediatamente.

El lisado se debe guardar en un congelador cuya temperatura sea inferior a -10°C si no es usado ese mismo día.

Procedimiento general:

Determinación de la prueba de compatibilidad-inhibición de la muestra:

Antes de llevar a cabo esta prueba en una formulación o producto dado, es necesario determinar si no hay interferencia de la solución por probar con la reacción que se lleva a cabo entre el reactivo y la endotoxina.

Una vez que se ha establecido la ausencia de inhibición para una solución o formulación dada, este procedimiento no necesita ser repetido.

- 1.- Se calientan a 37°C los tubos previamente preparados con el lisado.
- 2.- Se añade de manera aséptica 0.1 ml a cada tubo de:
 - a) Agua de control positivo
 - b) Control muestra positivo
 - c) Agua estéril inyectable que se utilizó para hidratar el lisado con objeto de que sea el control negativo
- 3.- Se mezcla bien el contenido de los tubos
- 4.- Los tubos se incuban a 37°C cuidando de no agitarlos durante 15 minutos.

Al final de este período se observa la presencia del rotón do el tubo cuidadosamente un ángulo de pocos grados. Si el gel

parece firme se continúa la rotación a 180 grados o hasta que el gel empiece a perder su forma. Los gels que mantienen su forma cuando son rotados 180 grados se consideran firmes. Si en algún punto de la rotación el gel en el tubo empieza a perder su forma, cuidadosamente se coloca el tubo en su posición original para evitar la destrucción irreversible de la formación del gel.

La siguiente tabla resume los resultados que pueden mostrar los controles:

	Tiempo	Control positivo	Control muestra	Control negativo
	min.	de agua	positivo	de agua
1 ^o	15	Gel firme	Gel firme	No hay gel
2 ^o	15	Gel firme	No hay gel	No hay gel
3 ^o	15	No hay gel	No hay gel	No hay gel
4 ^o	15	No hay gel	Gel firme	No hay gel
5 ^o	15	No hay gel	No hay gel	Gel firme

El primer caso indica:

Los resultados que se deben esperar y se puede proceder a probar las muestras.

El segundo caso indica:

Una inhibición de la actividad del reactivo que puede deberse a una resuspensión pobre de la endotoxina en la muestra o que existe inhibición debido a alguna sustancia presente en la muestra.

El tercer caso indica:

La actividad del reactivo destruida por deterioro.

Preparación inadecuada de las soluciones de endotoxina. Se recomienda repetir el procedimiento incluyendo la preparación y diluciones.

Empleo de agua contaminada para hidratar el reactivo. Se debe descartar el frasco.

El cuarto caso indica:

Preparación inadecuada de las soluciones de endotoxina. Se recomienda repetir el procedimiento.

La muestra está contaminada por endotoxina no conocida. Se recomienda ensayar con otra muestra. Si no hay inhibición se procede con las otras muestras.

El quinto caso indica:

Contaminación. Se recomienda repetir el procedimiento teniendo cuidado especial en la asepsia.

Ensayo de las muestras:

- 1.- Asépticamente se agrega 0.1 ml de la muestra dentro de los tubos con reactivo calentados a 37 °C y se mezcla cuidadosamente. Se recomienda trabajar por duplicado.
- 2.- Se deben preparar controles de agua positivo y negativo para verificar que los resultados de la prueba sean válidos.
- 3.- Los tubos se incuban a 37 °C evitando moverlos durante 60 minutos. Al final del período de incubación se observa cada tubo para detectar la presencia del gel.

La presencia de endotoxina en concentraciones menores que las consideradas pirogénicas puede dar como resultado la formación de un gel firme si el período de incubación es mayor del tiempo recomendado, es importante que los tubos se observen exactamente al final del tiempo de incubación para evitar resultados falsos positivos.

Resultados:

Los resultados son interpretados como positivos o negativos.

Un resultado positivo se define como la formación de un gel firme capaz de mantener su integridad cuando el tubo de prueba es invertido 180 grados.

Este resultado considera la presencia de endotoxina en cantidad suficiente para producir una respuesta febril si el material fuera inyectado a un paciente. Una prueba negativa se caracteriza por la ausencia total de gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad cuando es rotado 180 grados. La concentración de endotoxina es menor que el nivel pirogénico y puede causar floculación, granulación y/o un incremento en viscosidad. Estas reacciones se consideran negativas desde el punto de vista de pirogenicidad.

De acuerdo con los resultados que se han obtenido, algunos autores han hecho una escala para cuantificar el grado de gelificación del lisado (75) :

Reacción	Descripción
4 +	Gel firme con opacidad considerable.
3 +	Gel suave con opacidad moderada o considerable.
2 +	Gel frágil con opacidad escasa o moderada y que presenta pequeños gránulos adheridos a los lados del tubo cuando éste se inclina.
1 +	Gel muy frágil con opacidad escasa y que presenta algunos gránulos adheridos a los lados del tubo.
-	No hay incremento visible de opacidad o viscosidad.

Para nuestros fines se consideró la primera reacción (4 +) positiva y las demás negativas.

CAPITULO IV

RESULTADOS

En los resultados obtenidos con albúmina humana (Tabla # 1), se aprecia lo siguiente: De las 10 muestras probadas 8 resultaron positivas en la prueba ' in vitro ' cuando la prueba ' in vivo ' fué negativa. Se hicieron diluciones y cuando se llegó a la dilución 1:5 se observó que en ésta, los resultados correlacionaron con los obtenidos ' in vivo '. Este tipo de comportamiento pudiera deberse a que las soluciones de albúmina son muy viscosas, ya que la albúmina que se utilizó tenía una concentración del 25 %, esto podría dificultar la observación del punto final, otra posibilidad podría ser que la concentración de endotoxina fuera menor que la requerida por los animales para presentar una respuesta febril y que el método ' in vitro ' al ser más sensible (Tabla # 7) lo haya detectado.

La tabla # 2 nos muestra los resultados obtenidos con el factor antihemofílico, en este caso las 5 muestras fueron positivas cuando se probaron sin diluir en el método ' in vitro ', aquí la dilución requerida fué de 1:10 para que existiera una correlación con el método ' in vivo '. En este caso puede que exista una activación de la gelificación por alguna substancia presente, pudiendo ser el fibrinógeno remanente del proceso de separación o bien la substancia en sí, ya que se ha observado que algunas substancias provenientes de la sangre tienen reacción cruzada con la reacción de gelificación y puede ser que este efecto se vea disminuido por la dilución.

La tabla # 3 nos presenta los resultados obtenidos con las solu-

ciones que se aplican en gran volumen, se trata de soluciones de electrolitos que no contienen sustancias activadoras ni inhibidoras y la concentración de éstos es baja, se observa una correlación del 100 %.

En el caso de los antibióticos (Tabla # 4) se observó que una muestra fué positiva en el método ' in vitro ' en tanto que fué negativa en el método ' in vivo '.

Los resultados obtenidos con gammaglobulina humana y equina (Tablas # 5 y 6) nos muestran que en la primera se observa una correlación del 100 % y en la segunda se observan 2 muestras positivas solo con el método ' in vitro ', así como que la única muestra positiva ' in vivo ' también fué positiva ' in vitro '.

La correlación entre ambos métodos empleando estas proteínas se observa que es mayor que en el caso de la albúmina, la concentración promedio de éstas es de 16.5 % y parece que no es necesario diluir como en el caso de la albúmina.

La tabla # 7 nos muestra la sensibilidad de ambos métodos a una endotoxina en particular, siendo en este caso de E. coli, observándose que la sensibilidad del método ' in vitro ' es varias veces mayor que la del método ' in vivo '.

Muestra #	Pirógenos Suma de los aumentos de temperatura registrados en los 3 animales.	Limulus	
		Sin dilución	Con dilución
1	0.8	-	
2	0.5	+	1:5 -
3	0.9	-	
4	0.1	+	1:5 -
5	0.6	+	1:5 -
6	0.5	+	1:5 -
7	0.0	+	1:5 -
8	0.8	+	1:5 -
9	0.4	+	1:5 -
10	0.7	+	1:5 -

Tabla # 1

Factor antihemofílico o factor VIII de la coagulación

Muestra #	Pirógenos Suma de los aumentos de temperatura registrados en los 3 animales.	Limulus	
		Sin dilución	Con dilución
1	0.5	+	1:10 -
2	0.3	+	1:10 -
3	0.5	+	1:10 -
4	0.2	+	1:10 -
5	0.6	+	1:10 -

- 63 -

Tabla # 2

Soluciones que se aplican en gran volumen

Muestra #	Pirógenos Suma de los aumentos de temperatura registrados en los 3 animales.	Limulus Sin dilución
1	0.5	-
2	0.3	-
3	0.3	-
4	0.5	-
5	0.3	-
6	0.3	-
7	0.0	-
8	0.4	-
9	0.2	-
10	0.5	-
11	0.4	-
12	0.4	-
13	0.4	-

Tabla # 3

Antibióticos

Ampicilina

Muestra #	Pirógenos Suma de los aumentos de tempera tura registrados en los 3 anima les.	Limulus Sin dilución
1	0.7	-
2	0.5	-
3	0.3	-
4	0.3	-
5	0.0	+
6	0.0	-
7	0.4	-
8	0.0	-
9	0.6	-

Muestra #

Pirógenos
Suma de los aumentos de temperatura registrados en los 3 animales.

Limulus
Sin dilución

1	0.7	-
2	0.8	-
3	0.1	-
4	0.1	-
5	0.3	-
6	0.4	-
7	0.3	-
8	0.6	-
9	0.3	-
10	0.5	-
11	0.3	-
12	0.2	-
13	0.4	-
14	0.6	-
15	0.2	-
16	0.3	-
17	0.0	-

- 99 -

Tabla # 5

Gammaglobulina equina

Muestra #	Pirógenos Suma de los aumentos de temperatura registrados en los 3 animales.	Limulus Sin dilución
1	0.5	-
2	2.6	+
3	0.8	+
4	0.3	-
5	0.4	-
6	0.2	-
7	0.2	-
8	0.3	-
9	1.1	+
10	0.4	-
11	0.7	-
12	0.8	-

- 67 -

Tabla # 6

Sensibilidad a la endotoxina de E. coli de ambos métodos

Concentración de endotoxina.
(ng/ml)

Pirógenos
Suma de los aumentos de temperatura registrados en los 3 animales

Lisado de amebocitos de Limulus.

1000	6.7	+
100	6.6	+
50	4.0	+
25	4.6	+
12.5	2.2	+
6.25	1.4	+
3.125	0.7	+
1.6	0.7	+
0.8	-	+
0.4	-	+
0.2	-	-

Tabla #: 7

CAPITULO V

CONCLUSIONES

La prueba 'in vitro' no se recomienda como un sustituto del método 'in vivo' porque la reacción de gelificación se produce casi específicamente con lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas y aunque se ha observado que hay reacción de gelificación con el peptidoglicano de bacterias Gram positivas (163), se requiere una concentración muy alta de este material para producir una respuesta positiva con este método (1,000 a 400,000 veces más alta que la requerida en el caso de la endotoxina), por lo que no es utilizable para detectar en forma práctica este tipo de contaminación.

Otro tipo de sustancias de origen fúngico y viral, que causan aumento en la temperatura, no son detectadas por este método.

También se observa que en el método 'in vitro' en relación con el método 'in vivo' existen pruebas falsas positivas y falsas negativas en especial con materiales biológicos (albúmina, gammaglobulina), en este estudio no se observaron falsas negativas, pero es lógico pensar que estos materiales pueden estar contaminados con otros tipos de pirógenos, no solo con endotoxinas.

Existen sustancias que inhiben la reacción de gelificación inespecíficamente como son timerosal a concentraciones mayores de 0.1 %, cloruro de benzalconio a concentraciones mayores de 0.01 %, gluconato de calcio 0.67 mol/litro; dado que esto puede suceder, se podría pensar que en la preparación farmacéutica la inhibición se deba al vehículo o conservador y no al compuesto activo; por lo que para evitar este tipo de resultado se debe realizar una prueba de control con endotoxina y la sustancia para detectar inhibición inespecífica.

Las pruebas falsas positivas pueden deberse a la presencia de sustancias que por sí mismas activan la formación del gel como son trombina, tromboplastina, polinucleótidos sintéticos como el poly-I:poly-U (35,166); así como la concentración de proteínas que podría producir alguna dificultad en la observación del punto final o algún cambio de sensibilidad, pudiendo ser necesario diluir la muestra para evitar este efecto.

Siendo el método 'in vitro' más sensible, puede detectar concentraciones de endotoxina que los conejos no detectan y que inyectados al hombre pudieran ser causa de alguna reacción; el porqué de este fenómeno aún no se ha explicado, ya que se acepta en la literatura (10) que las reacciones del conejo y del hombre a la presencia de pirógenos son semejantes, los resultados obtenidos entre los diferentes laboratorios en pruebas 'in vivo' difieren de un laboratorio a otro, este tipo de comportamiento puede deberse a variaciones individuales de sensibilidad en los animales.

En suma, en este tipo de productos biológicos el método 'in vitro' puede ser útil para detectar la fuente de contaminación por endotoxina como una prueba de control de calidad, ya que con este método se pueden llevar a cabo un gran número de pruebas todos los días, pero no puede ser recomendado para reemplazar al método 'in vivo' ya que para fines prácticos solo detecta lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas y no otro tipo de pirógenos.

Existen sustancias como son los agentes utilizados para la quimioterapia del cáncer en las que es necesario aplicar el método

'in vitro' para llevar a cabo la determinación de contaminación por pirógenos, este es el caso de la L-asparaginasa que es una enzima antileucémica y que tiene efectos muy tóxicos para el conejo, ya que su administración a estos animales les produce fiebre, náusea, vomito; por lo que no puede ser utilizado este método para efectuar la determinación.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams, G.A., Singh P.P. Structural features of lipid A preparations isolated from Escherichia coli and Shigella flexneri. Biochim. Biophys. Acta 202:553 1970.
- 2.- Anacker, R.L., Finkelstein R.A. Origin and properties of naturally occurring hapten from Escherichia coli. J. Bacteriol. 88:1705 1964
- 3.- Arredondo, M.I., Kampschmidt R.F. Effect of endotoxin on phagocytic activity of the reticuloendothelial system of the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112:78 1963
- 4.- Athens, J.W. Leukokinetic studies IV. The total blood circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subject. J. Clin. Invest 40:989 1961
- 5.- Atkins, E. Pathogenesis of fever Physiol. Rev. 40:580 1960
- 6.- Atkins, E., Heijn C. Studies on tuberculin fever III. Mechanisms involved in the release of endogenous pyrogen in vitro. J. Exp. Med. 122:207 1965
- 7.- Atkins, E., Bodel P.T. in Pyrogens and Fever. 1a. Ed. Churchill Livingstone, London 81, 1971
- 8.- Atkins, E., Bodel P.T. Physiology in Medicine. N. Eng. J. of Med. 280:27 1972
- 9.- Bang, F.B. A bacterial disease of Limulus polyphemus. Bull. John Hopkins Hosp. 98:325 1956
- 10.- Bangham, D.R. in Pyrogens and Fever. 2a. Ed. Edit. Churchill Livingstone. London 207, 1971
- 11.- Barnes, B. Invertebrate Biology 3a Ed. Edit. Saunders N.Y. 452, 1974

- 12.- Beckman, A.L., Eisenman J.S. Effect of intrahypotalamic norepinephrine on thermoregulatory response in the rat. Fedn. Proc. Fedn. Socs. Exp. Biol. 29:253 1970
- 13.- Beeson, P.B. Tolerance to bacterial pyrogens I. Factors influencing its development. J. Exp. Med. 86:29 1947
- 14.- Bennett, I.I., Beeson P.B. The properties and biologic effects of bacterial pyrogens. Medicine 29:365 1950
- 15.- Bennett, I.I., Beeson P.B. Studies on the pathogenesis of fever I. The effect of injection of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon the body temperature of normal rabbits. J. Exp. Med. 98:447 1953
- 16.- Bennett, I.I., Beeson P.B. Studies on the pathogenesis of fever II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 98:493 1953
- 17.- Bennett, I.L. Jr., Petersdorf R.G. The pathogenesis of fever: Evidence for direct cerebral action of bacterial endotoxin. Trans. Assoc. Am. Physicians 60:64 1957
- 18.- Berger, F.M. et al. Increased host resistance to infection elicited by lipopolysaccharides from Brucella abortus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131:1376 1969
- 19.- Berlin, R.D., Wood J.B. Jr Studies on the pathogenesis of fever XII. Electrolytic factors influencing the release of endogenous pyrogen from polymorphonuclear leukocyte. XIII. Effect of phagocytosis on the release of endogenous pyrogen by polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 119:697 1964
- 20.- Bodel, P., Atkins E. Release of an endogenous pyrogen from rabbit mononuclear cells. N. Eng. J. Med. 276:1002 1967

- 21.- Bodel, P.T., Dillard M. Studies on steroid fever I. Production of leukocyte pyrogen by etiocholanone. *Ann. Int. Med.* 69:875 1968
- 22.- Bodel, P.T. Mechanism of endogenous pyrogen production I. Investigation of new protein synthesis in stimulated human blood leukocytes. *J. Biol. Med.* 1971
- 23.- Boogs, D.R., Marsh J.C. Neutrophil release activity in plasma of dogs injected with endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* 72:177 1968
- 24.- Bonilla-Soto, O. Protective action of endotoxin on allergic phenomena. *J. Allergy* 36:249 1965
- 25.- Braude, A.L. Mechanism of action of a toxic bacterial antigen. *J. Clin. Invest.* 39:1266 1960
- 26.- Burton, A.J. Purification and characterization of the Lipid A component of the lipopolysaccharides for Escherichia coli. *Biochemistry* 3:411 1964
- 27.- Carroll, B.J. Evaluation of three acute tests of hipotalamic-pituitary-adrenal function. *Metabolism* 18:476 1969
- 28.- Cherkin, A. Destruction of bacterial endotoxin pyrogenicity by hydrogen peroxide. *Immunochemistry* 12:625 1975
- 29.- Cho, Y.W. Direct cardiac action of E. coli endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141:705 1972
- 30.- Christy, J.H. Treatment of Gram negative shock. *Am. J. Med.* 50:77 1971
- 31.- Christy, J.H. Pathofisiology of Gram negative shock *AM. Heart J.* 81:594 1971
- 32.- Cline, M.J. Mechanism of endotoxin interaction with human leukocytes. *J. Haematol.* 51:539 1968
- 33.- Cluff, L.E. Effects of endotoxin on susceptibility of infections. *J. Infect. Dis.* 122:205 1970

- 34.- Cooper, J.F. , Hochstein H.D. The Limulus test for endotoxin (pyrogen)
in Radiopharmaceuticals and Biologicals. Bull Parenteral Drug Assoc.
26:153 1972
- 35.- Cooper, J.F. Detection of endotoxin in biological products by the
Limulus test. Develop. Biol. Standard 34:7 1977
- 36.- Cooper, K.E. Observations on the site and mode of action of pyrogens in
the rabbit brain. J. Physiol. 191:325 1967
- 37.- Cooper, K.E. in Pyrogens and Fever 1st Ed. Edit. Churchill Livingstone
London, 5 1971
- 38.- Corrigan, J.J. Jr Heparin therapy in septicemia with disseminated intravas-
cular coagulation. N. Eng. J. Med. 283:778 1970
- 39.- Das, J. Clearance of endotoxin with platelets: Role in increasing the occur-
rence of the Limulus gelation test and in combating experimental endotoxemia.
Surgery 74:235 1973
- 40.- Dinarello, C.A. Production and release of endogenous pyrogen by
leukocytes. Trans. Am. Physns. 81:334 1968
- 41.- Dumonde, D.C. 'Lymphokines'. Nonantibody mediators of cellular immunity
generated by lymphocyte activation. Nature 224:38 1969
- 42.- Elin, R.J. in Handbook of Microbiology 2nd Ed. Edit. A.I. Laskin,
Cleveland: CRC , 1060 1973
- 43.- Elin, R.J., Wolff S.M. Effect of fever in serum iron in man. Clin. Res.
21:2598 1973
- 44.- Elin, R.J., Wolff S.M. The role of iron in nonspecific resistance to
infection induced by endotoxin. J. Immunol. 112:737 1974
- 45.- Elin, R.J., Wolff S.M. Biology of endotoxin Annu. Rev. Med. 27:127
1976
- 46.- Farmer, T.A. Jr. The plasma 17-hydroxycorticosteroid response to

corticotrophin GU-4885 and lipopolisaccharide pyrogen.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 21:433 1976

- 7.- Farr, R.S. The febrile response of sensitized rabbits to the intravenous injection of antigen. Anat. Record 118:385 1954
- 8.- Feldeberg, W. Changes in temperature produced by microinjection of amines into the anterior hypothalamus of cats. J. Physiol. Lond. 177:239 1965
- 9.- Feldeberg, W. Perfusion from cerebral ventricle to cisterna magna in the unanesthetized cat. Effect of calcium on body temperature. J. Physiol. Lond. 207:403 1970
- 10.- Feldeberg, W. in Pyrogens and Fever. 1a Ed. Edit. Churchill Livingstone London, 115 1971
- 11.- Filkins, J.P. Heparin protection in endotoxin shock. Am. J. Physiol. 214:1074 1968
- 12.- Frank, M.M. Contributions of the classical and alternate complement pathways to the biological effects of endotoxin. J. Infect. Dis. 128:176 1973
- 13.- Frohman, L.A. Growth hormone releasin action of a Pseudomona endotoxin. Metabolism 16:57 1967
- 14.- Gaffin, S.L. The clotting of white cells of Limulus induced by endotoxin I. Preparation and characterization of clot-forming proteins. Biorheology 13:273 1976
- 15.- Galanos, C. Biological activities of Lipid A complexed with bovine serum albumin. Europ. J. Biochem. 31:230 1972
- 16.- Gerbrady, J., Craston W.I. The initial process in the action of bacterial pyrogens in men. Clin. Sci. 13:453 1954
- 17.- Geri, I. Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin. J. Immunol. 108:1008 1972
- 18.- Gmeiner, J., Lüderitz O. Biochemical studies on lipopolysaccharides of



- Salmonella R mutants VI. Investigations on the structure of the lipid A component. Eur.J.Biochem. 7:370 1969
- 59.- Good, C.M. The biochemistry of pyrogens. Biochemical Freehold N.J. Millipore Corporation.
- 60.- Greisman, S.E. Mechanisms of endotoxin tolerance VI. Transfer of the 'anamnestic' tolerance response with primed spleen cells. J. Immunol. 103:1237 1969
- 61.- Hanh, H.H., Cherd D.C. Studies on the pathogenesis of fever XV. The production of endogenous pyrogen by peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 126:385 1967
- 62.- Hanh, H.H. Studies on the pathogenesis of fever XIX. Localization of pyrogen in granulocytes. J. Exp. Med. 131:165 1970
- 63.- Hegner and Engeman, Invertebrate Zoology 2 Ed. Edit. Mac Millan N.Y., 447 1968
- 64.- Hellerqvist, C.G. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell wall lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium. Carbohydr. Res. 9:237 1969
- 65.- Hellerqvist, C.G. Structural studies on the O-specific side-chains of the cell wall lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium LT2. Carbohydr. Res. 16:39 1971
- 66.- Hinshaw, L.B. Shock and Hypotension: Pathogenesis and Treatment, 2a Ed. Edit. L.J. Mills N.Y., 431 1965
- 67.- Hirsch, R.L. Hyperlipidemia, fatty liver and bromosulfophtelein retention in rabbits injected intravenously with bacterial endotoxins. J. Lipid. Res. 5:563 1964
- 68.- Hochstein, H.D. Further developments of Limulus ameobocyte lysate test. Bull Parenteral Drug Assoc. 26:153 1973



- 69.- Horn, R.G. Studies on the pathogenesis of the generalized Shwartzman reaction. The role of granulocytes. Lab. Invest. 18:101 1968
- 70.- Horowitz, H.I., Des pres R.M. Effects of bacterial endotoxins in rabbit platelets II. Enhancement of platelets factor 3 activity 'in vitro' and 'in vivo'. J. Exp. Med. 116:913 1962
- 71.- Humprey, J.H. Release of histamine and 5-hydroxytryptamine from platelets by antigen-antibody reactions. J. Physiol. Lond. 128:9 1955
- 72.- Jawetz, Melnick y Aldeberg Microbiología Médica 6a. Ed. Edit. El Manual Moderno México D.F., 5 1975
- 73.- Jeffries, C.D. Liver carbohydrate levels in mice treated with endotoxin, cortisone and elipten. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132:540 1969
- 74.- Johnson, A.G., Gaines S. Studies on the O-antigen of Salmonella typhosa V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 103:225 1956
- 75.- Jorgensen, J.H. Preparation, sensitivity and specificity of Limulus lisate for endotoxin assay. Appl. Microbiol. 26:42 1973
- 76.- Kaiser, H.K., Wood D.B.Jr. Studies on the pathogenesis of fever IX. The production of endogenous pyrogen by polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 115:27 1962
- 77.- Kaiser, H.K., Wood w.B.Jr. Studies on the pathogenesis of fever X. Effect of enzymes inhibitors on the production and activity of leukocyte pyrogen. J. Exp. Med. 115:37 1962
- 78.- Kampschmidt, R.F. Effect of endotoxin upon total iron-binding capacity of the serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116:420 1964
- 79.- Kimball, H.R. Effect of bacterial endotoxin on experimental fungal infections. J. Immunol. 100:24 1968
- 80.- Kobayashi, H. Effect of Escherichia coli and its endotoxin on the

- resistance of mice to experimental cryptococcal infection. Jpn. J. Microbiol. 13:223 1969
- 81.- Kohler, P.O. Effect of pyrogen on blood levels of pituitary tropic hormones. Observations of the usefulness of the growth hormone response in the detection of pituitary disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. 27:219 1967
- 82.- Kovats, T.G. Shwartzman reaction in endotoxin-resistant rabbits induced by heterologous endotoxin. Immunology 12:445 1967
- 83.- Latour, J.G., Prejean J.O. Corticosteroids and the generalized Shwartzman reaction. Mechanism of sensitization in the rabbit. AM. J. Pathol. 65:189 1971
- 84.- Levin, J., Bang F.B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265 1964
- 85.- Levin, J., Bang F.B. Role of endotoxin in invertebrates coagulation. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337 1964
- 86.- Levin, J., Bang F.B. Blood coagulation in invertebrates. Fed. Proc. 26:1707 1967
- 87.- Levin, J., Bang F.B. Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics. Thrombo. Diathes. Haemorr. 19:186 1968
- 88.- Litter, M. Farmacología. 5a Ed. Edit. El Ateneo México D.F., Sección IX. 1975
- 89.- Lüderitz, O. Comprehensive Biochemistry 3a Ed. Edit. Florkin Amsterdam, 295, 1968
- 90.- Mac Genirie and Mac Genitie, Natural History of Marine Animals 2a. Ed. Edit. Mc Graw Hill N.Y., 325 1959
- 91.- Makara, G.O. Corticotrophin release induced by E. coli endotoxin after removal of the media hypothalamus. Endocrinology 88:412 1971
- 92.- Malkiel, S. Anaphylactic reactions in the mice induced by Bordetella

pertussis lipopolysaccharide. *J. Allergy* 35:306 1964

- 93.- Marsh, J.C. The granulocyte response to endotoxin in patients with hematological disorders. *Blood* 23:581 1964
- 94.- Mc Kay, D.G. An electron microscope study of the effects of bacterial endotoxin on the blood vascular system. *Lab. Invest.* 15:1815 1966
- 95.- Melby, J.C. Secretion and metabolism of cortisol after injection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* 56:50 1960
- 96.- Mergenhagen, S.E. Significance of complement to the mechanism of action of endotoxin. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 50:37 1969
- 97.- Milner, K.C. Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties III. Structure and biological properties of surface antigens from Gram negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* 27:352 1963
- 98.- Moberg, G.P. Site of action of endotoxins on hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am. J. Physiol.* 220:397 1971
- 99.- Moore, D.M. Pathogenesis of fever XX. Suppression and regeneration of pyrogen-producing capacity of exudate granulocytes. *J. Exp. Med.* 131:179 1970
- 100.- Morrison, D.C. Direct evidence for Hageman factor activation by bacterial lipopolysaccharides. *J. Exp. Med.* 140:797 1974
- 101.- Murphy, P.A. in *Pyrogens and Fever* 1a Ed, Edit. Churchill Livingstone London, 59 1971
- 102.- Myers, R.D. The hypothalamus *Adv. Pharmac.* 6:318 1968
- 103.- Myers, R.D., Kawa A. Evoked release of 5-HT and NEFA from the hypothalamus of the conscious monkey during thermoregulation. *Experientia* 25:705 1969
- 104.- Myers, R.D. Feeding and temperature response in the unrestrained rat

- after injections of cholinergic and aminergic substances into the cerebral ventricles. *J. Physiol. Lond.* 202:483 1969
- 105.- Myers, R.D., Veale W.L. Body temperature, possible ionic mechanism in the hypothalamus controlling the set point. *Science* 170:95 1970
- 106.- Myers, R.D. in *Pyrogens and Fever* 1a Ed. Edit. Churchill Livingstone London, 131 1971
- 107.- Myers, R.D., Ruby T.A. Fever in the monkey produced by the direct action of pyrogen on the hypothalamus. *Experientia* 1971
- 108.- Myers R.D., Veale W.L. Changes in body temperature of the unanesthetized monkey produced by sodium and calcium ions perfused through the cerebral ventricles. *J. Physiol. Lond.* 1971
- 109.- Nakamura., Shin., et al. A clottable protein (Coagulogen) of Horseshoe crab hemocytes structural change of its polypeptide chain during gel formation. *J. Biochem.* 80:649 1976
- 110.- Nakamura., Shin. et al. Amino acid sequence studies on the fragments produced from Horseshoe crab Coagulogen during gel formation: Homologies with primate fibrinopeptide B. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 72:902 1976
- 111.- Nandan, R. An improved 'in vitro' pyrogen test: To detect picograms of endotoxin contamination in intravenous fluids using *Limulus* amoebocyte lysate. *J. Lab. Clin. Med.* 89:910 1977
- 112.- Neter, E. Endotoxins and the immune response. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 47:82 1969
- 113.- Norlund, J.J. Studies on the origin of human leukocytic pyrogen. *J. Exp. Med.* 131:727 1970
- 114.- Nowotny, A. M. Relation of structure to function in bacterial O antigen I. Isolation methods. *J. Bacteriol.* 85:418 1963

- 115.- Nowotny, A.M. Molecular aspects of endotoxin reactions. *Bact. Rev.*
33:72 1969
- 116.- Dettgen, H.F. Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 25:253 1970
- 117.- Pliego, Castañeda Amanda Tesis Facultad de Química U.N.A.M. 1978
- 118.- Priano, L.L. Lack of significant protection afforded by heparin during endotoxin shock. *Am. J. Physiol.* 200:901 1971
- 119.- Guesenberry, P. Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony-stimulating factor. *N. Eng. J. Med.* 286:227 1972
- 120.- Rappaport, S.I. Pseudomonas septicemia with intravascular clotting leading to the generalized Schwartzman reaction. *N. Eng. J. Med.* 271:80 1964
- 121.- Rawlins, M.D. Pyrexia in renal carcinoma. *Lancet* 1:1371 1970
- 122.- Reinhold, R.B. A technique for quantitative measurement of endotoxin in human plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137:334 1971
- 123.- Ribí, E.R. in *Bacterial endotoxins*, 4a Ed. Edit. Rutgers University Press N.J., 16 1971
- 124.- Rietschel, E. Th. Pyrogenicity and immunogenicity of lipid A complexed with bovin serum albumin. *Infect. Immunity* 8:173 1973
- 125.- Rietschel, E.Th. Chemical structure and biological activity of endotoxins and lipid A. *Arch. Pharmacol.* 287:73 1975
- 126.- Robbins, P.J. in *Microbial toxins* 3a Ed. Edit. S. Hadis N.Y. Academic Press 473 1971
- 127.- Root, R.K. Mechanisms in experimental immune fever. *J. Exp. Med.*
129:309 1968
- 128.- Root, R.K. The hypothalamus. *J. Lab. Clin. Med.* 75:679 1970
- 129.- Rosemberg, J.C. Lethal endotoxin shock: Oxygen deficit, lactic levels and other metabolic changes. *J. Am. Med. Assoc.* 196:767 1966

- 130.- Rosen, R.D. The antibody response in nasal washings and serum to S. typhosa endotoxin administered intravenously. J. Immunol. 99:246 1967
- 131.- Rowley, D. Stimulation of natural immunity to E. coli infections: Observations on mice. Lancet 1:232 1955
- 132.- Rudbach, J.A. Physical structure of a native protoplasmic polysaccharide from Escherichia coli. J. Immunol. 98:1 1967
- 133.- Rudbach, J.A. Hybrid formation between bacterial endotoxins. J. Exp. Med. 126:73 1967
- 134.- Rudbach, J.A. Molecular immunogenicity of bacterial lipopolisaccharides antigens: Establishing a quantitative system. J. Immunol. 106:933 1971
- 135.- Sauter, C. Interferon-like inhibitor and lisosomal enzyme induced in mice injected with endotoxin. Nature London 212:626 1966
- 136.- Shanda, J.W.Jr. The hypoglycemic activity of endotoxin I. Occurrence in animals hyperreactive to endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130:413 1969
- 137.- Sheegren, J.N. Febrile and hematologic responses of rhesus monkeys to bacterial endotoxins. Am. J. Physiol. 212:884 1967
- 138.- Shwartzmen, G. Studies on Bacillus typhosus toxic substances I. The phenomenon of local skin reactivity to B. typhosus culture. J. Exp. Med. 48:247 1928
- 139.- Smith, R.T. Mitogenicity of bacterial endotoxins. Characterization of the mitogenic principle. J. Immunol. 3:352 1973
- 140.- Snell, E.S. Properties of human endogenous pyrogen. Clin. Sci. 16:615 1957
- 141.- Snell, E.S. An examination of the blood of febrile subjects for pyrogenic properties. Clin. Sci. 21:115 1961

- 142.- Snell, E.S. Pyrogenic properties of human pathological fluids.
Clin. Sci. 23:141 1962
- 143.- Snell, E.S. in The Biological Basis of Medicine Vol. 2 4a Ed.
Academic Press N.Y., 397 1968
- 144.- Snell, E.S. in Microbial Toxins. Academic Press N.Y. 227 1971
- 145.- Snell, E.S. Gram negative bacterial endotoxin and the pathogenesis
of fever. Prog. Drug Res. 19:402 1975
- 146.- Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of Limulus
polyphemus blood cells. Throm. Diath. Haemorr. 23:170 1970
- 147.- Solum, N.O. The coagulogen of Limulus polyphemus hemocytes. A
comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule.
Throm. Res. 2:55 1973
- 148.- Starzl, T.E. Shwartzman reaction after human renal homotransplantation.
N. Eng. J. Med. 278:642 1968
- 149.- Stetson C.A.Jr. Studies on the mechanism of the Shwartzman phenomenon.
Certain factors involved in the production of the local hemorrhagic
necrosis. J. Exp. Med. 93:489 1951
- 150.- Stetson, C.A.Jr. Similarities in the mechanisms determining the Arthus
and Shwartzman phenomena. J. Exp. Med. 94:347 1951
- 151.- Stetson, C.A.Jr. Vascular effects of endotoxins. Bull. N.Y. Acad. Med.
37:486 1961
- 152.- Stetson, C.A.Jr. in Bacterial endotoxins. Rutgers University Press
N.J., 658 1964
- 153.- Sullivan, J.D. Purification and properties of the clotting enzyme
from Limulus lisate. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 66:848 1975
- 154.- Tai, J.Y. Studies on Limulus amebocyte lisate. Isolation of
pro-clotting enzyme. J. Biol. Chem. 252:2178 1977

- 155.- Thompson, R.H. Studies on the pathogenesis of fever. Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol. 18:159 1959
- 156.- Wagner, R.R. Effect of bacterial endotoxin on resistance of mice to viral encephalitis including comparative studies of the interference phenomenon. J. Immunol. 83:87 1959
- 157.- Waisbren, B.A. Bacteremia due to Gram negative bacilli other than Salmonella. A clinical and therapeutic study. Ams. Arch. Inter. Med. 88:467 1951
- 158.- Watson, D.W. Modifications of host response to bacterial endotoxins. Specificity of pyrogenic tolerance and role of hypersensitivity in pyrogenicity, lethality and skin reactivity. J. Exp. Med. 118:425 1963
- 159.- Westphal, O. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. Angew. Chem. 66:407 1954
- 160.- Westphal, O. Bacterial endotoxins. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49:1 1974
- 161.- Wexler, B.C. Effects of a bacterial polysaccharide on the pituitary-adrenal axis. Metabolism. 12:49 1963
- 162.- White, P.B. Relation of the alcohol-soluble constituents of bacteria to their spontaneous agglutination. J. Pathol. Bacteriol. 30:113 1972
- 163.- Wildfeuer, A. Investigations on the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin. Appl. Microbiol. 28:867 1974
- 164.- Wolff, S.M. Comparison of the effect on the pyrogens, etiocholanone and bacterial endotoxin on plasma cortisol and growth hormone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 28:337 1968
- 165.- Wolff, S.M. Biological effects of bacterial endotoxins in man. J. Infect. Dis. 128:259 1973

- 166.- Wolff, S.M. Nonspecificity of the *Limulus* amoebocyte lysate test:
Positive reactions with polynucleotides and proteins. *J. Infect. Dis.*
128:349 1973
- 167.- Wood, J.B.Jr. Studies on the cause of fever. *N. Eng. J. Med.*
258:1023 1958
- 168.- Work, E. in *Pyrogens and Fever*. 1a Ed. Edit. Churchill Livingstone
London, 23 1971
- 169.- Wright, L.J. Effects of dexamethasone and aspirin on the responses
to endotoxin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:13 1972
- 170.- Yin, E.T. Picogram-sensitive assay for endotoxin: Gelation of *Limulus*
polyphemus blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharides
and lipid A from Gram-negative bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.*
261:284 1972
- 171.- Young, N.S. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin.
J. Clin. Invest. 51:1790 1972
- 172.- Yoshikawa, T. Infection and disseminated intravascular coagulation.
Medicine 50:237 1971
- 173.- Zinsser, *Microbiología* 4a Ed. Edit. U.T.H.E.P. México, 55 1971



TESIS "CLASICAS"

**PASEO DE LAS FACULTADES 32-D
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA 20. D. F.**