



Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
C U A U T I T L A N**

**Manual de Modelos Experimentales en la
Enseñanza de la Bioquímica de Sistemas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JAVIER ROLANDO AMBROCIO HERNANDEZ

Director de Tesis

DR. RICARDO V. SANTIAGO DIAZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 1985.



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 está 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.

MANUAL DE MODELOS EXPERIMENTALES EN LA
ENSEÑANZA DE LA BIOQUIMICA DE SISTEMAS.

I N D I C E

	Pag.
CAPITULO I. Principios Generales.	4
I.1. Introducción.	
I.2. Objetivos generales en el manejo de los modelos experimentales.	9
I.2.1. Método Científico.	
I.2.2. Protocolo del trabajo experimental.	
I.2.3. Seminarios de introducción para el trabajo experimental.	
I.2.4. Trabajo experimental.	
I.2.5. Seminarios para el análisis y discu- sión de los resultados obtenidos durante el trabajo experimental.	
I.2.6. Ejercicios a resolver involucrando los modelos experimentales.	
I.2.7. Reporte de resultados.	
CAPITULO II. Los modelos experimentales. Su elaboración general.	14
II.1. Antecedentes o introducción.	
II.2. Objetivos.	
II.3. Material y métodos.	
II.4. Exposición de resultados.	
II.5. Análisis y discusión de los resultados.	
II.6. Conclusiones.	
II.7. Bibliografía.	
CAPITULO III. Los modelos experimentales. Su adapta- ción y aplicación en el laboratorio.	
III.1. Inducción al Hígado Graso.	17
III.2. Regeneración Hepática.	30
III.3. Perfusión Hepática.	47

III.4.	Inducción al Hipotiroidismo.	58
III.5.	Inducción al Estado Hemolítico.	74
III.6.	Obtención de Macrófagos Alveolares	89
CAPITULO IV. Apéndices.		
IV.1.	Recopilación de Datos.	102
IV.1.1.	Conceptos generales sobre la recopilación de datos.	
IV.1.2.	Principales fuentes de la recabación de datos, su manejo e importancia.	
IV.1.3.	Algunas sugerencias sobre la forma - de recabación de datos.	
IV.2.	Manejo y marcaje de animales de laboratorio. Consideraciones generales y técnicas.	111
IV.2.1.	Manejos y marcajes de rata.	
IV.2.2.	Manejos y marcajes de conejo.	
IV.3.	Vías de administración de sustancias y tipos de recolección de sangre. Consideraciones <u>ge</u> nerales.	120
IV.3.1.	Toma de muestras en rata y conejo.	
IV.3.2.	Tipos de inoculación en rata y conejo.	
IV.4.	Técnicas Quirúrgicas. Consideraciones <u>genera</u> les aplicables a animales de laboratorio.	136
IV.4.1.	Algunas consideraciones sobre la <u>eta</u> pa prequirúrgica.	
IV.4.2.	Algunas consideraciones sobre la <u>eta</u> pa quirúrgica.	
IV.4.3.	Algunas consideraciones sobre la <u>eta</u> pa postquirúrgica.	
IV.5.	Preanestésicos, anestésicos y complicaciones anestésicas.	143
IV.5.1.	Signos clínicos durante cada una de de las fases de la anestesia.	
IV.6.	Colección, preparación y preservación de <u>sue</u> ro y plasma.	146

IV.7.	Elaboración de curvas de calibración. <u>Consi</u> <u>deraciones</u> generales.	153
IV.8.	Técnicas de apoyo. Consideraciones <u>Genera</u> <u>les</u> .	156
IV.8.1.	Determinación de proteínas totales y albúmina.	
IV.8.2.	Determinación de lípidos totales y - colesterol.	
IV.8.3.	Determinación de glucosa.	
IV.8.4.	Determinación de urea.	
IV.8.5.	Determinación de aminoácidos séricos.	
IV.8.6.	Determinación de bilirrubinas.	
IV.8.7.	Determinación de Urobilinógeno.	
IV.8.8.	Determinación de cuerpos cetónicos.	
IV.8.9.	Recuento de glóbulos rojos.	
IV.8.10.	Elaboración de frotis sanguíneos.	
IV.8.11.	Tinciones de frotis sanguíneos.	
	IV.8.11.1. Tinción de Wrigth.	
	IV.8.11.2. Tinción de Giemsa.	
	IV.8.11.3. Tinción con azul de cre silo brillante (reticulocitos y cuer pos de Heinz).	
	IV.8.11.4. Prueba de inestabilidad del glutatión eritrocítico.	
IV.9.	Elaboración de tablas y gráficos empleados pa ra mostrar los resultados y observaciones de los modelos experimentales implicados en el - presente manual.	204
IV.10.	Parámetros biológicos de animales de lab.	208
CAPITULO V. Epílogo.		
V.1.	Discusión y comentarios generales respecto al presente manual.	211
V.2.	Conclusiones generales.	212
V.3.	Bibliografía general de apoyo al curso.	214
	V.3.1. Bibliografía general del presente manual.	

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

	Pag.
1. Metabolismo del CCl_4 y sus posteriores efectos sobre el hepatocito.	19.
2. Acciones de diferentes concentraciones de CCl_4 sobre lisosomas hepáticos.	23
3. Efecto de la composición del medio para la solubilización de CCl_4 , así como actividad de -ATPasa mitocondrial ante diferentes concentraciones del solvente.	24
4. Efecto de diferentes concentraciones de CCl_4 - sobre algunas actividades enzimáticas lisosomales.	
5. Efecto del CCl_4 sobre el nivel de fosfolípidos y sobre el contenido de ácidos grasos totales en suero e hígado.	26
6. Efecto del CCl_4 , luego de algunas semanas, sobre algunos órganos.	27
7. Factores hepatotróficos.	31
8. Cambios hormonales que se presentan posterior a una inoculación con CCl_4 y que tienen tendencia hacia una regeneración hepática.	40
9. Cambios en actividades enzimáticas posteriores a una hepatectomía parcial.	42
10. Valores de mediciones de funcionamiento hepático luego de una hepatectomía parcial.	45
11. Aparato para realizar una perfusión hepática <u>in vitro</u> .	52
12. Método para la preparación de hepatocitos y células no parenquimatosas (Diagrama).	56
13. Algunas interrelaciones hormonales.	59
14. Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas.	61
15. Mecanismo de retroalimentación negativa para las hormonas tiroideas.	
16. Cambios hormonales, así como en la captación de -Yodo radiactivo, en presencia de diferentes pato-	

logías tiroideas.	70
17. Cambios del AMPc en presencia de diferentes activadores o inhibidores en ratas hipotiroideas.	72
18. El eritrocito, sus precursores y su degradación.	75
19. Mecanismo de acción de la fenilhidrazina.	77
20. Algunos cambios hematológicos posteriores a la inducción con fenilhidrazina en ratas.	83
21. Algunos cambios hematológicos posteriores a la inducción con fenilhidrazina en conejos.	86
22. Acción sobre la Ca^{++} ATPasa por parte de la fenilhidrazina <u>in vivo</u> .	87
23. Funciones del Macrófago alveolar.	90
24. Recuperación de los macrófagos alveolares posterior a la centrifugación con un gradiente de densidad.	97
25. Esquemas generales para la elaboración de informes científicos y reportes.	102
26. Manejo de animales de laboratorio.	113
27. Parámetros a seguir durante los diferentes estados de la anestesia.	145
28. Tabla recomendada para anotar los resultados de determinaciones físicas de los animales en estudio. Tabla General.	204
29. Tablas tipo para determinaciones de laboratorio empleadas en los modelos experimentales. Tipo de gráfica requerida para interpretar las variaciones en las diferentes determinaciones.	205
30. Tipo de gráficas con dos parámetros en función del tiempo.	206
31. Esquema de tabulación para inducción al estado hemolítico.	207
32. Parámetros biológicos de algunos animales de laboratorio. Indices de laboratorio.	208
I. Constantes Biológicas.	
II. Hematograma.	
III. Química Sanguínea.	
IV. Hormonas.	

CAPITULO I. PRINCIPIOS GENERALES.

I. 1. Introducción.

La cátedra de Bioquímica de Sistemas, como parte integral de la formación del Químico Farmacéutico Biólogo, presenta características que no sólo pueden ser transmitidas, sino que además; es parte de toda una ciencia que involucra hechos que tienden a ser verificados y/o demostrados. Es precisamente por lo último, por lo que la materia en sí fomenta o activa inquietudes con tendencia a la investigación científica, y las cuales de alguna forma tienen que ser orientadas con un fin específico y adecuado.

En bioquímica, como en toda ciencia experimental, la modificación o alteración experimental del organismo o tejido que se estudia, canaliza hacia aproximaciones durante el estudio de los eventos fisiológicos o metabólicos. Es por ello, que el adecuado conocimiento, tanto del manejo como de la aplicabilidad, de los modelos experimentales; cobra una importancia vital en la enseñanza práctica de la cátedra ya mencionada.

Los modelos experimentales, como aproximaciones a los verdaderos sistemas existentes, presentan características que los ubican como selectos de acuerdo al estudio para el que se requieran. Esto es, por ser modelos trazados de acuerdo a lo que el investigador desea estudiar, presentan algunas variantes que siempre tienen que ser consideradas. Por ello se ha descrito (White, 1970) una serie de niveles de organización de estos modelos experimentales, los cuales pueden mostrarse a continuación (en orden de importancia en sentido decreciente).

El organismo intacto: Su empleo es muy común debido a que las velocidades o cambios de las sustancias que llegan y salen de un tejido dado, se afectan o modifican por las actividades de otros tejidos. El problema de emplear tal modelo, es que en un animal intacto surgen muchas dificultades experimentales dado que en él se verifican muchos procesos a la vez. Por lo cual, el empleo de una gran diversidad de técnicas exploratorias permitirá estable-

cer los cambios dados de acuerdo al estudio efectuado. De éstos últimos hay ejemplares tales como: Administración de algún tipo de metabolito marcado de tal fin que se pueda estudiar su distribución, empleo de procedimientos quirúrgicos con acceso a algunos tejidos internos, escisiones parciales o completas de algún órgano o tejido, etc.

- En la Perfusión de un órgano o extremidad aislados. Aún cuando aquí puedan perderse algunos mecanismos regulares que actúan sobre el órgano o la extremidad en su estado normal, tales experimentos se han empleado ampliamente para la determinación de los órganos en que ocurre una reacción particular y, en el estudio de los productos de que se pueden formar en un órgano después de añadir un precursor dado al fluido de perfusión.

En un órgano seccionado: Mediante cortes finos de tejidos u órganos, es posible la obtención de laminillas que pueden ser conservadas por horas en medios líquidos y gaseosos especiales. Aún cuando algunos sucesos se desviarán de los normales, éstas técnicas han demostrado ser de una gran utilidad debido a la simplicidad de las operaciones experimentales subsiguientes.

- Posterior a la desmenuzación mecánica del tejido, aún existe un nivel más bajo de organización y por medio de este proceso es posible separar por centrifugación diferencial diversas estructuras particulares de la célula-Núcleos, mitocondrias y microsomas-, además agregando sustractos adecuados puede ser determinado en cada una de éstas fracciones celulares la presencia o ausencia de una actividad enzimática dada.

- El nivel más bajo de organización es el de la enzima en solución. Puede considerarse como un paso importante debido a que la información obtenida con esta y otras técnicas ha podido ayudar al establecimiento del conocimiento actual del metabolismo.

En el presente manual se consideran los dos aspectos fundamentales en el desarrollo óptimo de los procesos experimentales: Su aspecto teórico y su aspecto práctico. En los dos primeros capítulos

se sientan las bases para el apoyo, el diseño y la conformación de los modelos experimentales. Es en ellos donde radica el vínculo enseñanza-aprendizaje, por que de ahí derivarán los resultados óptimos a obtener en el empleo de los modelos experimentales de caso. Presumiéndose que las bases reales para la estructuración de la secuencia por realizar en los modelos, ya han sido previamente fundadas con los capítulos anteriores; un capítulo posterior, en donde ya se muestran algunos tipos de modelos experimentales, es lo que forma en sí el cuerpo del manual. Es en este punto donde el conocimiento relativo a lo adquirido en la teoría, tiene que ser mostrado o evidenciado mediante un planteamiento experimental dado. Los modelos experimentales tratados aquí, tienen sus orígenes en lo conformado en el programa de estudio actual de la materia que se imparte en la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. Aún cuando esta parte experimental se apega al método científico, no se busca el solo definir los vocablos implicados en el caso; además, se trata de que con ejemplos bastante ilustrativos se pueda comprender la importancia de toda esta secuencia. Los puntos de contacto con el aspecto teórico de la materia, demostrados durante el desarrollo experimental, vienen a hacerse más manifiestos al momento de recuperar, clasificar y exponer los resultados conseguidos. En este mismo punto se ha determinado el proporcionar el apoyo bibliográfico por cada modelo experimental, éste se encuentra lo más actualizado posible. De acuerdo a lo mencionado al último, se han seleccionado de algunos artículos (dentro de cada modelo) el exponer algunos de sus tópicos internos considerados relevantes que se espera sean de utilidad a lo obtenido en cada experimento.

Como parte de apoyo al manual se ha estructurado un último capítulo, en donde por medio de apéndices; conceptos importantes sobre la recabación de datos, formas de manejo de animales de laboratorio, tipos de administración de fluidos (así como sus vías), técnicas quirúrgicas, etc. han sido descritas en algunos casos de forma detallada con su respectiva bibliografía. Aunado al contenido de tal capítulo, el alumno encontrará una serie de cuadros en donde diversos parámetros de laboratorio (para algunos animales

de experimentación) y obtenidos por otros investigadores s6n mostrados.

I. 2. Objetivos generales en el manejo de los modelos experimentales.

El fin fundamental al elaborar este manual con todas las características detalladas a continuaci6n, se ha centrado en buscar hacer al alumno m6s cr6tico (y no t6cnico) al desarrollar su trabajo experimental; por esto mismo cuenta con herramientas que enriquecer6n su conocimiento.

I. 2.1. M6todo cient6fico. Es muy com6n que al expresar tal t6rmino, la motivaci6n adquirida en un principio para un experimento dado, se reduzca en intensidad. Pero ello es debido a una inadecuada orientaci6n sobre la importancia de comprender dichos conceptos. Debe entenderse que al emplear el m6todo cient6fico, es contar con m6todos bien organizados que no s6lo evitan el que hacer infructuoso, e innecesario; sino que definen, organizan y establecen el camino m6s 6ptimo a seguir al efectuar un estudio. Adem6s aunado a esto, debe comprenderse bien que para llegar a la teor6a concerniente a lo que se est6 estudiando, tiene que realizarse: (a) una adecuada selecci6n de las variables pertinentes al evento, (b) tambi6n se necesita establecer las funciones entre 6stas variables, (c) deben de considerarse los valores de las constantes num6ricas de 6stas relaciones y (d) hay que buscar las relaciones entre 6stas y otras teor6as. Estos t6rminos, con un adecuado orden pueden ser perfectamente comprendidos.

En este manual se entender6, y al efectuar los estudios, que lo que se est6 realizando son hechos cient6ficos que no s6lo est6n en funci6n de lo que por fuera se est6 realizando, sino que tambi6n estos dependen del m6todo seguido para el registro de lo que est6 efectuando. Asimismo, la forma de pensar del observador es muy importante respecto a las conjeturas que el est6 deduciendo.

I. 2.2. Protocolo del Trabajo Experimental. Con el apoyo ofrecido por el presente manual, se espera que el alumno sea capaz de

elaborar su propio diseño experimental, para lo cual deberá orientársele respecto a los puntos integrales de dicho diseño, así como se les recalcará la importancia de cada uno de ellos. Una vez que se hayan asignado los diferentes protocolos por tema, a cada grupo de estudiantes, se les hará las recomendaciones necesarias para que su trabajo sea lo más actualizado posible (Para ello será toda la sección de recopilación de datos). Se buscará que no solamente apoyen su experimento con bibliografía, sino que además tengan oportunidad de consultar referencias hemerográficas. Asimismo, se les hará patente la necesidad de estructurar un trabajo que pueda ser adaptable a las condiciones que privan en el laboratorio de Bioquímica de Sistemas y que posteriormente ellos puedan mostrar. A este respecto, aún cuando el manual ofrece varias alternativas en algunas metodologías, es conveniente que el alumno establezca otras con el fin de incrementar su visión en lo que a técnicas se refiere (Principalmente el conocimiento de cuando y por qué han de emplearse): El tiempo para la elaboración del trabajo estará dado de acuerdo al empleado para establecer los términos introductorios del temario del curso de laboratorio. Por otro lado, el diseño del trabajo estará básicamente influenciado por lo que se describe en el capítulo II (Los modelos experimentales. Su elaboración general).

I. 2.3. Seminarios de introducción para el trabajo experimental. Esta parte ofrece la oportunidad para que el alumno exponga ante sus compañeros, sus fines prácticos para un tema dado. Es, para que él transmita el conocimiento adquirido, actualizado y necesario para llevar a buen fin todo el desarrollo experimental. A cada grupo de integrantes les corresponderá el establecer la importancia de realizar tal actividad. En suma su exposición contará básicamente por lo proporcionado con su diseño experimental, así como él podrá apoyarse con el material que considere pertinente para su exposición (Rotafolios, exposición al pizarrón, diapositivas, etc). Es en este punto donde podrá exponer las características de la metodología que piensa utilizar y con lo cual se le aprobará o rechazará en sus proposiciones, dependiendo de la factibilidad de aplicarlas.

I. 2.4. Trabajo experimental. Prácticamente su desarrollo estaría regido por lo contenido en el capítulo III (Algunos tipos de Modelos Experimentales) de acuerdo al tema que se vaya a estudiar. Tanto las necesidades de implementos de laboratorio, así como los conceptos más importantes sobre antecedentes al trabajo, ya se encuentran delineados. De hecho, cada tema ya tiene estructurado su desarrollo secuencial, lo que la hace más rendible en cuanto a datos por obtener se refiere. Cuatro de los seis temas propuestos, requieren del empleo de animales de laboratorio vivos (ratas y conejos principalmente); los otros dos, sólo emplean un animal como donador del órgano ya establecido. En la parte correspondiente a técnicas de laboratorio por emplear, el capítulo correspondiente a técnicas de apoyo (Cap. IV), ya establece tanto fundamentos, como secuencia de las pruebas por realizar. En éste último caso, recomendamos que se seleccione (en caso de existir diferentes pruebas) aquellas que se adapten a las necesidades del experimento, así como a la posibilidad de que sean empleadas (tanto por tiempo, como por material).

I. 2.5. Seminarios para el análisis y discusión de los resultados obtenidos durante el trabajo experimental. Así como en el seminario de introducción, ésta es parte del complemento en la enseñanza del laboratorio, además facilita el que los integrantes de todo el grupo intercambien conceptos respecto a los resultados que hayan obtenido. Es aquí donde entran en juego los conocimientos que ellos hayan adquirido a lo largo de la sesiones. Es, por otro lado, momento para que ellos sean capaces de interpretar diversas formas de agrupaciones de datos (tablas, gráficos, etc), así como de definir lo que ellas indican. Sumando a todo lo anterior, es el momento oportuno para hacerles detectar que otros tópicos (respecto al tema) ellos necesitan dominar a la hora de elaborar su reporte de resultados. Este análisis y discusión de resultados los orientará en la forma en que ellos pueden atacar la cuestión, así como el poder definir sus conclusiones más acertadas. Mucho tiene que ver aquí lo comentado dentro del método científico.

I. 2.6. Ejercicios a resolver involucrando los modelos experi

mentales. Es una necesidad que se presenta, sobre todo durante el aprendizaje en la exposición de los resultados. Se ha considerado conveniente el incluir esta parte, seleccionando de algunos artículos los adecuados al caso, problemas que involucren o apoyan la interpretación de sus resultados, esto deriva en que el alumno, al estar él continuamente presentando el suceso, se verá en la necesidad de revisar constantemente sus antecedentes. Con ello, podrá en el momento que se le requiera, exponer el aprendizaje adquirido. En la resolución de un problema dado, ha sido pensado que la resolución del mismo (a nivel de integrantes de equipo) favorece el intercambio de opiniones y que al ser aplicado en forma individual podrá producir un mayor rendimiento.

1.2.7. Reporte de resultados. Básicamente constituirá el complemento de lo ofrecido por el protocolo experimental, previamente elaborado por los alumnos y ello por que es el resultado de lo que ya habían diseñado. El patrón para la elaboración del reporte de resultados, estará constituido por los puntos siguientes:

1.2.7.1. Un informe de actividades a manera de introducción - (Mencionando, sin detallar; metodología, los nombres de las técnicas empleadas y tipo de determinación realizada con ellas, etc).

1.2.7.2. Resultados. Para cada modelo experimental ya se han definido las características de la agrupación de datos (tablas, gráficos, secuencia, etc.).

1.2.7.3. Análisis y discusión de los resultados. Es considerado útil que una vez que el alumno haya agrupado adecuadamente sus datos, éstos sean debidamente interpretados. Se busca con esto, de acuerdo a lo mencionado en métodos científicos, que puedan establecer relaciones entre lo que muestran sus diferentes parámetros empleados, ya sea individualmente o involucrando todos ellos, con la posibilidad de establecer más adecuadamente sus teorías al respecto. Con el análisis, ellos podrán definir las variantes en sus datos de acuerdo al momento de estudio. Con la discusión ellos podrán, en base a sus conocimientos teóricos, refutar o apoyar un punto determinado.

I.2.7.4. Conclusiones. Con los puntos establecidos anteriormente para la elaboración del reporte, se considera que es más accesible el establecer sus conjeturas que al caso corresponde.

I.2.7.5. Bibliografía. Con ésto se motivará al alumno para que describa las referencias que haya empleado en la elaboración de su reporte, esto le favorecerá en la posterior evaluación del modelo en estudio.

Capítulo II. LOS MODELOS EXPERIMENTALES. Su elaboración general.

Cada punto considerado aquí, ya está desarrollado en cada uno de los modelos experimentales propuestos en el presente manual. Lo que a continuación será descrito, corresponde a la base en la cual se apoyó la estructuración de cada modelo. Esto último implica, que llegado el momento de ampliar, revisar, anular o integrar alguno de ellos; se cuente con un parámetro adecuado al caso.

II.1. Antecedentes o introducción.

Este inciso corresponde a lo que se denomina comúnmente campo general o tópicos experimentales respecto al modelo que esté estudiando. Para su estructuración se han considerado algunos puntos que sitúan como relevante tal información:

II.1.1. Origen. Se definirá de donde parte el modelo en cuestión, que es de lo que él trata y de como se ubica dentro de lo que constituye el sistema fisiológico mamífero en general.

II.1.2. Importancia. Como su nombre lo indica, se destaca el papel del modelo como integrante de un organismo viviente. Por otro lado, se establece cual es la significancia de estudiar tal modelo desde el punto de vista experimental.

II.1.3. Contenido y alcance. En este punto se hace referencia a lo que involucra el modelo, con que o quienes se relaciona, que se ha establecido actualmente (experimentalmente hablando), en base a él o por él; asimismo, se indica que es lo que motiva a realizar a futuro respecto al tema.

II.1.4. Limitaciones. Con ello se indica que o cuales han sido los problemas al realizar estudios de tal magnitud y que no se ha podido considerar en ellos.

II. 2. Objetivos.

Cada modelo presenta sus objetivos propios, tanto generales como particulares. Aquí estableceremos el correspondiente al tema en general.

Con una adecuada orientación del alumno, en la forma de selec

cionar, organizar, fundamentar, analizar e interpretar lo concerniente a la elaboración de un modelo experimental; será posible conformar todo un esquema de trabajo que lo ayude en la comprensión de un tema establecido, así como el que él incremente su caudal de aprendizaje.

Para cada tema seleccionado, se contará con un modelo adecuado, lo que facilitará la labor de formar un cuadro que ilustre lo contenido en tal tema.

II. 3. Material y métodos.

El material seleccionado para cada uno de los modelos establecidos en el presente manual, presenta características de ser adecuado a lo ofrecido en el Laboratorio de Bioquímica de Sistemas. No es de gran complejidad, lo que hace de los modelos el que sean fácilmente adaptables. De hecho los métodos propuestos, de acuerdo al caso, han sido seleccionados en función de su aplicabilidad rápida y sencilla, además de que no involucran sustancias de elevado costo y riesgo.

II. 4. Exposición de los resultados.

Ya, en el diseño de los modelos, se ha contemplado la forma en la que el alumno puede llevar el registro de sus datos de la forma más ordenada posible. Se les ha indicado el tipo de registro diario (así como sus diferentes características) del experimento, y para ello, es necesario consultar lo referente al apéndice 10 del presente manual. En este punto no solamente se involucran aquellas tablas necesarias el registro de resultados, sino que también se menciona el tipo de presentación de acuerdo al modelo experimental que esté sujeto al estudio.

II.5. Análisis y Discusión de los resultados.

Como previamente se había mencionado, en cada modelo, ya se han propuesto algunos tipos de agrupación de datos para su fácil interpretación.

II. 6. Conclusiones.

El alumno podrá concluir lo que respecta a sus resultados apo

yándose no solo con lo que él ha investigado, sino con lo que en cada modelo se anexa para su complemento.

II.7. Bibliografía.

Aparte de establecer las referencias consultadas en el momento de estructurar el modelo en cuestión, se citan además puntos considerados como relevantes para el conocimiento del alumno. Se describe para cada artículo seleccionado, sus resultados (Principalmente los gráficos y tablas), su análisis y discusión de resultados (en algunos casos resumidos) y sus conclusiones (más importantes). Se busca con ello el fomentar la consulta del estudiante hacia las referencias originales y actuales (en los casos requeridos), así como el que el pueda manejar lo que considere que puede serle de utilidad. La bibliografía establecida al final del modelo, sólo es aplicable al modelo que se estudia, y aún cuando existan referencias comunes dentro de la bibliografía general, éstas han sido especificadas por considerarse importantes en ese momento.

Capítulo III. LOS MODELOS EXPERIMENTALES. Su adaptación y aplicación en el laboratorio.

III.I. Inducción al Hígado Graso.

Introducción.

El hígado es el órgano parenquimatoso más grande del organismo, ocupa un sitio importante en la funcionalidad corporal. Tal actividad está principalmente fundada en los constituyentes del órgano (Células epiteliales, de Kupffer, sus propias secreciones, etc). El intentar enumerar cada una de tales actividades, implicaría todo un contexto propio, pero basta mostrar para ello algunas de estas: (a) Células epiteliales. Principalmente efectúan las funciones en las que las transformaciones químicas provenientes de los alimentos o productos de la digestión del organismo son efectuadas (lo que es muy importante desde el punto de vista metabólico para la generación, utilización, mantenimiento o degradación de los distintos nutrientes). Asimismo, la versatilidad de tales células se puede encontrar en la capacidad de almacenamiento que presentan (glucógeno, grasas, proteínas y vitaminas como fuente de economía energética corporal) y la producción de proteínas séricas (con lo que se establece el orden correspondiente a la presión oncótica sanguínea, el transporte facilitado de algunas sustancias, la síntesis de algunos factores de coagulación, etc). Todo ello representa el papel fisiológico relevante que presentan tales células, pero así como intervienen en cuestiones de producción y mantenimiento de la economía corporal; también juegan un papel importante dentro de lo que corresponde a acciones de destoxificación, mediante la elaboración de las sales biliares, colesterol y otros. (b) Células de Kupffer. La acción principal de ellas se encuentra en que; son las responsables, en mayor grado, de la degradación hemoglobínica; participan en la formación de determinadas globulinas séricas y además actúan como células de limpieza de elementos macromoleculares y corpusculares (bacterias, pigmentos, etc.)^{7,8,9,12.}

Por todas las características anteriormente mencionadas, se ha

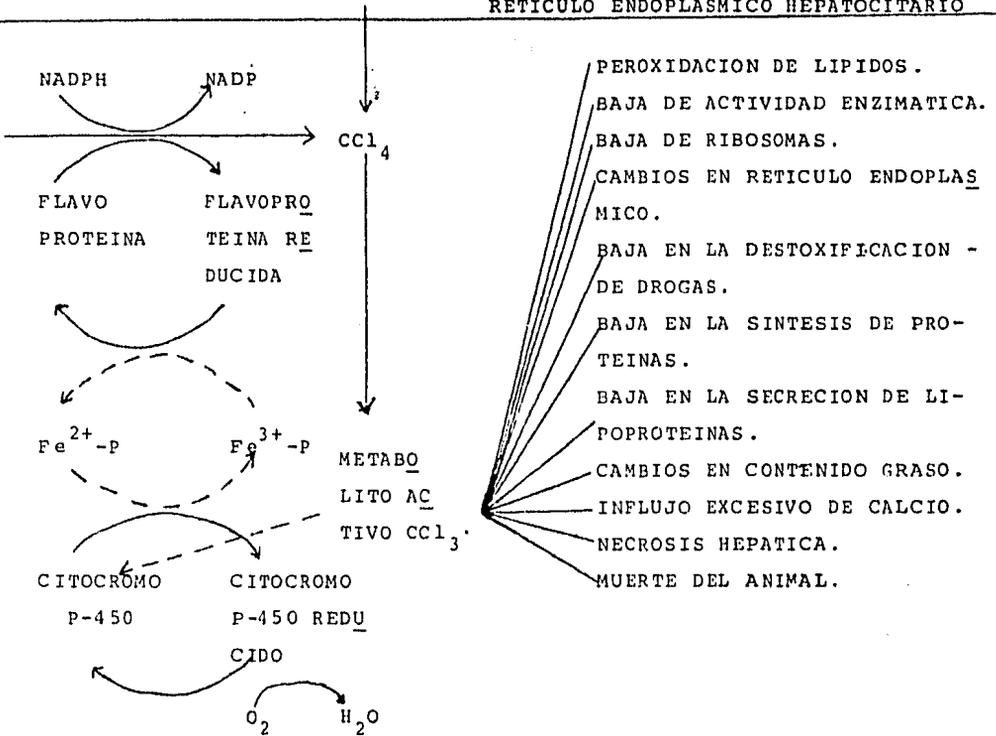
considerado al órgano como un excelente modelo en el estudio bioquímico, fisiológico e histológico de alguno de los sistemas corporales. Con el empleo de agentes químicos tóxicos (con acción a un nivel hepático), ha sido factible el obtener buenos ejemplos que muestran las alteraciones a las que se puede ver sometido el órgano; así como, de que manera influye a nivel de organización corporal total. Y dado que el daño provocado al hígado a este nivel de organización se manifiesta claramente, es necesario efectuar un análisis de los parámetros relacionados con el grado de la afección^{2,18}.

Muchos han sido los estudios efectuados para determinar la forma en que el agente hepatotóxico tetracloruro de carbono provoca las alteraciones patológicas, fundamentalmente ya ha sido establecido que se requiere de un previo proceso de biotransformación para que el pueda provocar sus efectos^{1,4,5,6,15,16,17}. Esta actividad bioquímica no es sino solo un mecanismo con el cual el organismo intenta inactivar al compuesto, y para ello emplea el sistema de transporte electrónico de los microsomas del retículo endoplásmico hepatocitario. El principal metabolito formado es un radical muy tóxico ($\text{CCl}_3\cdot$), el cual provocará cambios en diversos sistemas del equilibrio celular, lo que traerá como consecuencia a posible muerte celular (ver figura anexa). No solamente tal metabolito será la causa de tantos cambios, sino que el compuesto original (CCl_4) también puede afectar seriamente algunos sistemas que se encuentren implicados^{3,6,11,13,15,16,17}. Los estudios para tales fines han sido diversos, y se han involucrado tanto pruebas *in vitro*^{3,4,11,14,17}, como *in vivo*^{4,6,10,13,16}, y todas ellas orientan a definiciones en las que se ha postulado lo siguiente⁵:

-Período comprendido entre los 10 y 20 minutos posteriores a la inoculación. Hay fragmentación de la cisterna del retículo endoplásmico rugoso. Anexo a tales lesiones, hay una predecesión -- con la alteración de los fosfolípidos de la membrana microsomal. Asimismo, ya hay conjugaciones diénicas que indican el inicio de los procesos de peroxidación.

-Posteriormente a los 30 minutos ya se encuentran las primeras lesiones mitocondriales. Es aquí donde ha sido posible demos-

RETICULO ENDOPLASMICO HEPATOCITARIO



SISTEMA DE TRANSPORTE ELECTRONICO MICROSOMAL.

Representación esquemática del posible lugar (a nivel de la Flavoproteína) de la conversión del CCl₄ a su metabolito tóxico y sus posteriores efectos sobre el hepatocito. La líneas punteadas implican inhibición¹.

trarse cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, - con lo que existe un ingreso incrementado de iones Calcio (el cual tiende a acumularse)^{11,15}.

- Dos horas después, hay el primer acúmulo de triglicéridos en las células hepáticas, los cuales aumentan progresivamente alcanzando un máximo dentro de 12 a 24 horas. En este intervalo de tiempo, hay alteraciones de la permeabilidad de la membrana de los lisosomas, con lo que se establece una baja en la oxidación de los ácidos grasos en mitocondrias.

Ha sido establecido que la manifestación de los cambios posteriores, ya implican alteraciones que afectan al organismo en general^{4,8,9,13}. Todo lo anteriormente expresado se fundamenta en la actividad hepatocitaria a nivel corporal, la cual se deteriora en presencia del tóxico; P. ej. Se ha asociado el problema con una fuerte infiltración grasa tanto a nivel tisular como hepático¹³ y no es sino una demostración en la actividad de síntesis, transporte y almacenamiento lipídico en la que el hígado es el principal responsable del control de ello. Hablando en lo que respecta al hígado como tal, este sufre varias lesiones que lo afectan seriamente: Se ha visto que existe un hígado graso difuso^{8,9,13}, -- hay destrucción del tejido hepático y/o muerte hepatocitaria¹⁴, -- malfuncionamiento hepático (como por ejemplo ictericia)^{2,5,8,9,12}, etc.

Objetivos.

-Mediante la inducción a un estado patológico, con un agente hepatotóxico, el alumno comprenderá la importancia del funcionamiento total del hígado. Con ello podrá establecer como es que un mal funcionamiento del órgano, contribuye a que se desencadenen -diversas afecciones a nivel del organismo general.

-Con el empleo de algunos parámetros de laboratorio, previamente establecidos, se buscará que sea posible el determinar los tipos diferentes de mecanismos fisiológicos involucrados. Esto -- tendrá que ser definido, tanto a nivel local, como general; lo que apoyará el que pueda relacionarse la interacción de los diferen--

tes órganos corporales, así como la manera en que se ven afectados por la situación.

Hipótesis.

El funcionamiento hepático normal, al enfrentarse a una situación que lo desequilibra; tiende a originar alteraciones que repercuten por todo el sistema fisiológico corporal, lo que provoca que éste se comporte anormalmente.

Metodología.

El presente modelo puede ser aplicado, con resultados similares, en dos especies animales diferentes: rata y conejo. Se recomienda que dependiendo del animal elegido, se seleccione adecuadamente tanto la secuencia de la inducción establecida posteriormente, así como las determinaciones que habrán de efectuarse.

Ratas. Son seleccionadas con un peso promedio de 200 gramos. Un grupo de ratas constituirá el grupo control (el cual no recibirá tratamiento alguno, excepto que solo habrá de administrársele aceite mineral) y el otro funcionará como grupo tratado. El tratamiento consistirá en la administración por vía oral de CCl_4 disuelto en aceite mineral (En concentración al 5% V/V), la dosis será de 0.1 ml. por 100 gramos de peso corporal⁷. La administración será aplicada dos veces por semana, durante dos semanas.

Previo a la inducción y a partir del momento de ésta, serán registrados el comportamiento y el peso diario del animal. Si los dos grupos contienen un número apto de animales suficientes para dividirlos en dos, uno de los grupos divididos podrá ser sacrificado a la primera semana, el otro a la segunda. De no ser así, los animales deberán de ser sacrificados a la segunda semana. Las tomas de muestras séricas y de orina, habrán de ser obtenidas previo a la inducción, así como cada tercer día posterior al inicio de ella. También deberá de muestrearse a los animales durante el inicio de la inducción (las muestras recolectadas, serán procesadas por igual hasta el final del estudio, mientras tanto pueden-

ser preservadas). La vía óptima de la recolección de sangre es la vena de la cola o la punción retroorbital. Todas las determinaciones consistirán en:

a) Sangre: Proteínas totales y albúmina; lípidos séricos totales; ácidos grasos libres; bilirrubinas (total y conjugada).

b) Orina: Determinación de cuerpos cetónicos.

Durante el momento de sacrificio de los animales, habrán de ser anotados los efectos causados por el hepatotóxico a nivel de órganos corporales, observando: cavidad peritoneal, riñones, intestinos, corazón e hígado (En éste último, realizar un corte transversal y observar). Todas las observaciones realizadas, de preferencia, habrán de ser comparadas con el grupo de animales control. Si se desea efectuar un corte al hígado, para aplicarle histología, éste será recuperado (evitando el que transcurran más de cinco minutos) y será colocado en formol al 10%.

Conejos. Serán seleccionados con un peso aproximado a 2 kg, además de que serán animales adultos. Al igual que lo descrito para ratas, ellos serán inducidos al estado patológico durante el mismo lapso de tiempo. Las excepciones que se harán son: La vía de administración empleada será la de inhalación del CCl_4 con el empleo de un algodón empapado del solvente (De utilidad será el empleo de una campana de vidrio en donde será colocado el animal); asimismo, se medirá la talla abdominal del animal y la vía de obtención de sangre será vía vena marginal (No es recomendable el aplicar punción cardíaca, porque el estado del animal puede provocar su muerte). Para la inducción, el animal será colocado dentro de la campana, que contiene el algodón con el CCl_4 , por espacio de un minuto. Posteriormente al tiempo transcurrido, el animal será colocado al ambiente para que se le permita desintoxicarse por espacio de un minuto. Durante todo el proceso de la inducción, esta misma secuencia habrá de ser seguida; solo que diariamente habrá de incrementarse el tiempo de inhalación por un minuto, con el otro necesario para la ventilación. El proceso deberá ser iniciado con un minuto.

Preferentemente, al momento de sacrificar a los animales, sólo habrán de seleccionarse aquellos que han sido tratados.

Resultados.

De acuerdo a lo expresado en el apéndice correspondiente, se elaborarán gráficos y tablas que apoyen lo concerniente a la exposición de los resultados.

Bibliografía.

1. Chopra, P. y colaboradores. Mechanism of carbon tetrachloride - hepatotoxicity. Lab. Invest. 26 (6); 716-726. 1972.
2. Davidson, I. y J.B.Henry. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. Edición. Edit. Salvat Editores. Barcelona, España. 1981. pp. - 825-857.
3. Dianzani, M.U.; F.M. Baccino y M. Comporti. The direct effect - of carbon tetrachloride on subcellular particles. Lab. Invest. 15 (1); 149-156. 1966.

Los resultados y las conclusiones a las que llegaron los pre sentes autores, fueron:

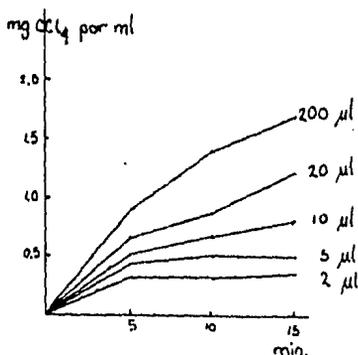


Fig.1. Curso de tiempo de concentraciones que aparecen cuando cantidades diferentes de CCl_4 son permitidas difundir a 37°C . El recipiente contiene la fracción lisosomal obtenida a partir del hígado.

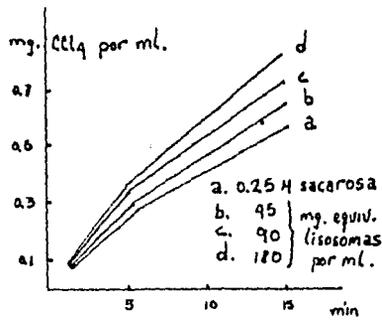


Fig. 2. Efecto de la diferente composición del medio sobre la solubilización de tetracloruro de carbono di fundido.

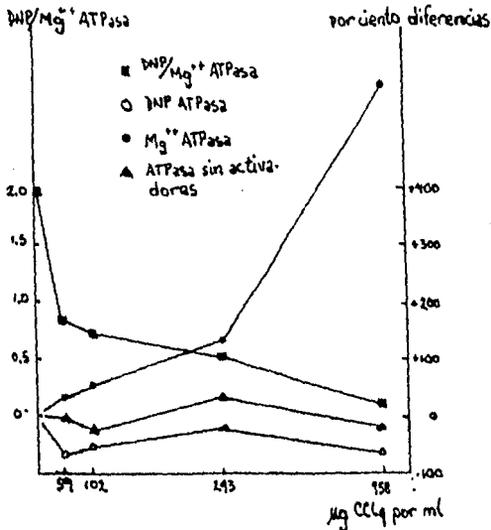


Fig. 3. Cambios en las actividades de la ATPasa mitocondrial ante diferentes concentraciones de CCl₄. Se preincubaron mitocondrias y CCl₄ durante 15 minutos a 25°C.

En la figura 3 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de tetracloruro preincubado sobre la actividad de ATPasa mitocondrial. Es clara la baja de ATPasa activada con DNP; hay alza

de la ATPasa activada con Mg^{++} . Por los resultados obtenidos dentro de este mismo experimento, es visto que los cambios en la actividad de la ATPasa se presentan luego de cinco minutos cuando la concentración de CCl_4 era de 35 microgramos por ml.

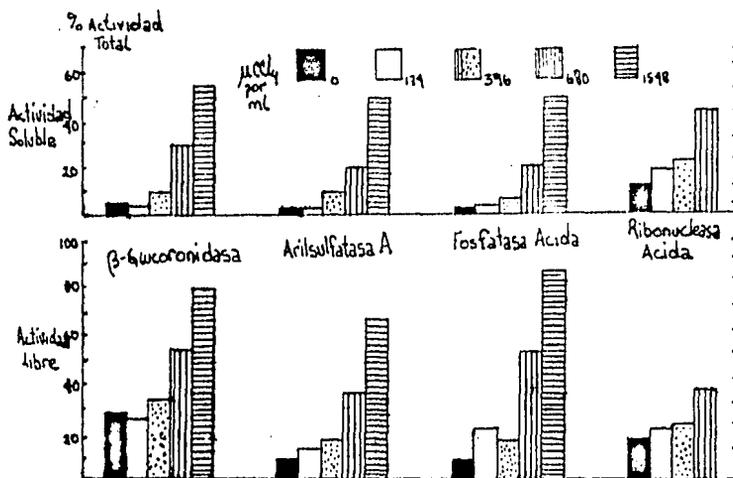


Fig. 6. Efecto de las concentraciones diferentes de CCl_4 sobre algunas actividades enzimáticas lisosomales.

De acuerdo a los resultados de la figura 6, se puede observar que el CCl_4 es hábil para producir una amplia extensión en el daño lisosomal in vitro.

En adición a los estudios anteriores, otros realizados empleando glucosa-6-fosfatasa, EDTA y ATPasa, ha sido posible establecer que los cambios mitocondriales y lisosomales provocados por el solvente, no son mediados por una peroxidación lipídica la cual debería encontrarse elevada en sus membranas.

4. Elliot, H.W.; R. George y R. Okun. Chemicals, drugs and lipid - peroxidation. Ann. Rev. Tox. 16; 125-141. 1976.

5. Feo, F. Alterazioni dello ialoplasma: Accumulo di trigliceridi. Min. Med. 71 ;63-70. 1980.

6. Ferreyra, E.C. y colaboradores. Treatment of carbon tetrachloride induced liver necrosis with chemical compounds. Tox. Appl. Pharm. 42; 513-521. 1977.

7. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 9a. Edición. Edit. -

- Lange Publications. California, U.S.A. 1979. pp.366-368,384-388.
8. Harper, H.A. Manual de Química Fisiológica. 7a. Edición. Edit. El Manual Moderno. México, D.F. 1980. pp.301-304.
9. Houssay, A.B. Fisiología Humana. 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975. pp.543-545.
10. Ishii, H. y colaboradores. Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on carbon tetrachloride-induced necrosis. Chem. Pharm. Bull. 25(8); 2035-2040. 1977.
11. Izutzu, K. T. y E.A. Smuckler. Effects of carbon tetrachloride on rat liver plasmalemmal calcium adenosine triphosphatase. Am. J. Path. 90(1); 145-155. 1978.
12. Netter, F.H. Liver, biliary tract and pancreas. Digestive System. The Ciba Collection of Medical Illustrations. Vol. III. Edit. Ciba. U.S.A. 1961.
13. Osumi, Y.; Y. Amano y K. Shimamoto. Fatty liver caused by the -repetitive administration of relatively small doses of carbon tetrachloride in rats. Jap. J. Pharmacol. 17 ; 288-307.-1967.

Algunos de los resultados mas importantes obtenidos en el presente estudio, son los siguientes:

Efecto del CCl_4 sobre el nivel de fosfolípidos hepáticos.

Semana	Control	CCl_4 (ml/kg)		
		0.025	0.075	0.150
2	61.9	78.8	67.6	67.2
4	72.7	79.5	62.4	71.9
8	67.2	59.9	45.5	52.1

Efecto del CCl_4 sobre el contenido de ácidos grasos totales en hígado y suero.

Semana	Control	CCl_4 (ml/kg)		
		0.025	0.075	0.150
2	2.31	2.34	2.27	2.59
4	2.24	2.16	2.53	2.87
8	2.10	2.72	2.75	3.34

Semana	Control	CCl_4 (ml/kg)		
		0.025	0.075	0.150
2	172	157	162	157
4	148	148	159	230
8	121	125	126	106

- Obsérvese que los cambios en los ácidos grasos séricos se aproximan con aquellos de los de la beta-lipoproteína sérica.

En los resultados obtenidos para los pesos de los órganos, - pudo verse lo siguiente:

- El peso neto de hígado, bazo y adrenales se incrementó por el tratamiento con el solvente. Los pesos de otros órganos parenquimatosos tales como el riñón, no demostraron cambios significantes.

Efecto del CCl_4 sobre el peso del tejido por 100 g. de peso corporal, éste obtenido a las dos semanas postinducción.

Organo	Control	CCl_4 (ml/kg)		
		0.025	0.075	0.150
Higado (g)	5.73	4.42	5.09	4.59
Adrenales (mg)	29.3	30.3	39.9	21.3
Bazo (mg)	269	302	405	315

Efecto del CCl_4 medido a las cuatro semanas.

Organo	Control	CCl_4 (ml/kg)		
		0.025	0.075	0.150
Higado (g)	3.88	4.10	4.66	4.63
Adrenales (mg)	155	120	18.7	20.0
Bazo (mg)	211	405	294	293

Efecto del CCl_4 medido a las ocho semanas.

Organo	Control	CCl_4 (ml/kg)		
		0.025	0.075	0.150
Higado (g)	3.62	3.63	4.71	4.73
Adrenales (mg)	14.6	19.8	18.6	18.6
Bazo (mg)	180	221	251	294

En cuanto a lo obtenido en la histología del hígado, se observó lo siguiente:

- Administración de CCl_4 (0.025 ml/kg). Existe una ligera degeneración grasa en la estructura acinal hacia la octava semana.

- Administración de CCl_4 (0.075 ml/kg). En la cuarta y octava

semanas, el hígado en muchos casos mostró un desacomodamiento de las células acinales lo que se ha asociado con una degeneración grasa.

- Administración de CCl_4 (0.15 ml/kg). A la cuarta semana hay cambios patológicos similares a nivel hepático, ésto en comparación con lo observado en ratas que recibieron 0.075 ml/kg durante cuatro y ocho semanas. Hacia la octava semana hubo una proliferación difusa en los tejidos fibrosos; esto, asociado con una degeneración grasa marcada a nivel de células hepáticas. En éste punto se presentaron casos de ictericia.

Las conclusiones derivadas de los resultados anteriores, fueron:

- El primer paso, de la acción del CCl_4 sobre el hígado, es la constricción de los vasos hepáticos por las catecolaminas liberadas desde las adrenales. Esto implica que se reduce el contenido de catecolamina adrenal y se produce una isquemia hepática.

- No se observó una relación dosis-respuesta. El que los fosfolípidos hepáticos se incrementaran primeramente y que posteriormente declinaran, así como el que los niveles de la beta-lipoproteína y ácidos grasos totales disminuyeran en suero (durante la fase inicial) y que luego se incrementaran progresivamente; debe hallarse en la explicación de que dosis simples y prolongadas producen interferencia en el transporte hepático exterior de lípidos. - Esto último causado por la disminución en la síntesis de la lipoproteína microsomal, y que además la sucesiva interferencia de la utilización lipídica por parte de la mitocondria hepática se encuentra asociada al caso. La elevación de fosfolípidos hepáticos durante la segunda semana, también se haya influenciado por el transporte extrahepático reducido de los lípidos antes o durante la manifestación de la interferencia con los procesos de síntesis. Si la síntesis de los fosfolípidos hepáticos se encuentra detenida, ésto explica su sucesiva reducción.

- Los cambios de ácidos grasos en los lípidos hepáticos de los animales tratados, indicaron que el hígado graso desarrollado, está principalmente compuesto de triglicéridos asociados con los fosfolípidos disminuídos.

-Las anormalidades histológicas presentadas, se correlacionaron con los cambios bioquímicos de los lípidos hepáticos. A amplias dosis de CCl_4 hubo completa destrucción de las células hepáticas.

14. Parry, E.W. The mechanism of necrotic tissue removal in mouse liver following CCl_4 -induced injury. *Exp. Path.* 89; 205-211. 1979.

15. Recknagel, R.O. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life. Sci.* 33(1);401-408. 1983.

16. Reynolds, E.S. y colaboradores. Metabolism of (^{14}C)Carbon tetrachloride to exhaled, excreted and bound metabolites. *Bioch. -- Pharm.* 33(21); 3363-3374. 1984.

17. Villaruel, M.C. y J.A. Castro. Irreversible binding of CCl_4 to microsomal phospholipids. Free radical nature of the reactive specie and alterations in the physico-chemical properties of the target fatty acids. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* 101(1);105-113. 1975.

18. White, A. y colaboradores. Principios de Bioquímica. Edit. -- McGraw-Hill. México, D.F. 1977. pp. 500-502.

III. 2. Regeneración Hepática.

Introducción.

Dado que el hígado es el principal lugar de la homeostasis corporal, es de esperarse que ante una seria afección trate de recuperar lo más rápidamente posible su actividad normal. Durante tal reorganización, así como en el momento del disturbio, no es sólo de la competencia hepática el establecer el equilibrio óptimo; también son involucrados otros procesos y órganos diferentes. Está de mostrado que existen cambios en las velocidades de uno o más procesos del organismo y que principalmente son manifestadas como alteraciones a nivel fisiológico. Esto último ha conducido a que extirpaciones quirúrgicas o lesiones graves in situ (provocadas o accidentales), sean formas de medir y de demostrar los cambios efectuados.¹¹ En el caso del hígado, durante una hepatectomía (parcial o total), está visto que hay una gran variedad de cambios metabólicos^{3,13}.

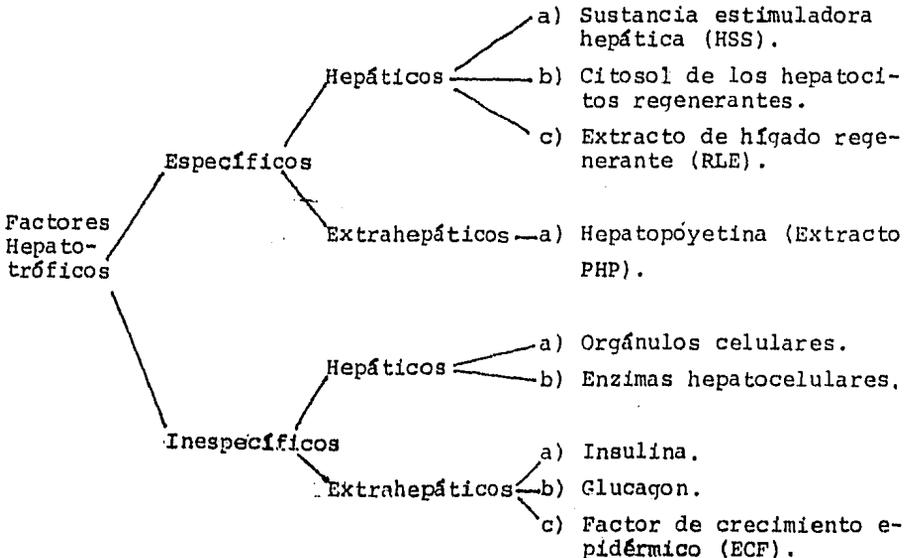
En caso de una resección hepática parcial, se ha mencionado que la mayoría de los cambios asociados a la afección están relacionados con el crecimiento compensatorio, pero sin embargo, algunos de ellos están asociados con la función hemostática del remanente hepático^{11, 14, 15}. Aunque existen variaciones por dicho daño, el tejido hepático durante su proceso regenerativo evita (y entonces enmascara) la pérdida de funcionamiento del mismo⁸.

No es uniforme el criterio respecto a si el hígado se regenera o no, aún cuando es sabido que las células hepáticas constantemente desaparecen y son remplazadas por células nuevas, lo que induce a pensar que las partes perdidas de un cordón hepático sean cambiadas por hepatocitos (que crecen en los huecos que conforman el armazón de la red estructural)⁸, se dice que el rápido crecimiento hepático posterior a una hepatectomía parcial, provoca que el incremento en masa sea por el alargamiento de los lóbulos residuales, más que por el remplazamiento de los lóbulos cortados¹⁴. Cual sea el caso, ha sido establecido que durante hepatectomías parciales -

sucesivas, dada la constante regeneración, lo nuevamente producido excede mucho al peso de aquellas porciones que anteriormente fueron perdidas, además, tal regeneración no sólo se establece en áreas cercanas al lugar de extirpación o de necrosis espontáneas, sino también en porciones lejanas al lugar donde se ha perdido tejido.

El hígado regenerante, ya como término común, ha sido y es muy ampliamente estudiado por que en condiciones normales no está demostrable que el suceso ocurra; pero, que al menor estímulo (una hepatectomía) se desencadena una secuencia de reacciones muy importantes para la proliferación celular, lo que de establecerse correctamente podrá ser aplicado a otro tipo de estudios tales como el del cáncer ¹⁰. Esto último involucraría la posibilidad de establecer los mecanismos en los que intervienen los procesos de síntesis del DNA (Activaciones de RNA mensajero, RNA polisomal, algunas enzimas implicadas, etc) 5,9,10,14.

En la actualidad, con el empleo de técnicas altamente sofisticadas, ya se ha evidenciado los posibles mecanismos que influyen directamente en el crecimiento hepático ⁶, los que han sido agrupados de la manera siguiente:



Estos factores hepatotróficos se presentan acorde al tiempo, el lugar y la condición de la hepatectomía.

Como suceden cambios característicos al proceso, éstos pueden ser ordenados de la forma siguiente:

- A nivel enzimático. Aquí los cambios se ven seriamente alterados, principalmente se involucran a las enzimas que participan en el funcionamiento del hepatocito en si ^{13, 14}.

- A nivel de metabolismo general. Lo correspondiente a proteínas, es lo que más seriamente se ve afectada a diferencia de los otros metabolitos (principalmente insulina) ^{3,4,11,15}. Esto puede estar basado desde un punto de vista de la economía celular, ya que la regeneración hepática es una condición de stress y las fuentes de energía limitadas de la célula están dirigidas hacia la más importante tarea que se tiene a la mano: la multiplicación celular y el crecimiento.

Con el empleo de técnicas bioquímicas precisas, sensibles y en ocasiones bastante sofisticadas (centrifugaciones diferenciales, marcadores isotópicos, actividades enzimáticas específicas, etc), ha sido posible establecer lo relacionado a los cambios metabólicos involucrados ^{7,9,13,14}. Asimismo, con el empleo de otros procesos experimentales (Hepatectomías posteriores al retiro de algún otro órgano) ha podido demostrarse que una gran variedad de órganos también sufren cambios en su metabolismo. ^{7,9,11,19}. Esta última relación se ha visto que está fuertemente influenciada por los tipos de hormonas secretadas al medio (las que una vez aisladas han sido, en su mayoría, desafiadas en cultivos in vitro de hepatocitos) ⁶.

Para el desarrollo experimental, a continuación descrito, se buscará el establecer los cambios principales a nivel general.

Ya ha sido sugerido que para la realización de la hepatectomía, tendrán que ser considerados los puntos siguientes¹:

- 1) Tener conocimiento de la anatomía hepática.
- 2) Lo que habrá de efectuarse es una resección hepática y es-

ta es la terminología. No es aceptado otro tipo de término (lobectomía, etc.).

3) Hay que contar con instrumentos quirúrgicos necesarios al caso .

4) Se necesita de hacer decisiones precisas.

5) Habrá de considerarse el conocimiento de las consecuencias fisiológicas de la cirugía hepática. Es importante entender totalmente las funciones múltiples del hígado y las consecuencias inmediatas de la resección. Hasta que el hígado remanente se regenere y produzca adecuadamente sus funciones, deben de tratarse con anticipación: la hipovolemia, hipoglucemia, hipoproteinemia y la coagulopatía. Antes y después de la operación, el animal debe ser tratado con suplementos (en algunos casos especiales) y con vitaminas. A todos los animales hay que administrarles antibióticos de amplio espectro postoperativamente.

Hipotesis.

Si el hígado, es el órgano con funciones primordiales que mantienen en homeostasis normal al organismo, aquel proceso que llegue a afectarlo; alterará dichas funciones que repercutirán a nivel general y que tratarán de ser equilibradas lo más rápidamente posible.

Metodología.

En esta sección, sólo será mencionado lo concerniente al desarrollo del proyecto en sí. Lo correspondiente a las técnicas involucradas en el desarrollo experimental: se encuentra explicadas en la sección relativa a las técnicas.

Material.

- Reactivos.

Acido Pícrico al 1%.

Solución Salina Fisiológica.

esteril.

Vitamina K-50 (Ampolletas de 0.5 ml).	Solución Ringer (500 ml).
Benzal concentrado (líquido).	Estéril.
Xilocaina al 2 %.	Merthiolate rojo.
Eter etílico.	Neomelubrina inyectable.
Etanol al 70 %.	Penicilina 400, 000 U.

Equipo.

Estuche completo de disección.	Estuche para rasurar.
Autoclave.	Hilos catgut 000 con aguja.
Lámpara de luz infrarroja o foco de 100 w.	curva.
Jeringas estériles (de 1.5 y 10 ml).	Cubre bocas.
Jabón de tocador.	Guantes de cirujano.
Algodón.	Gasa estéril.

Procedimientos.

Selección de animales. Se emplearán 2 conejos blancos por equipo, su peso será de aproximadamente 2 kg. Una vez marcados los animales, uno de ellos será seleccionado como control; el otro, será el animal al que se hepatectomizará.

Etapa preoperatoria.

1. Habiendo seleccionado al animal al que se le efectuará la hepatectomía, 3 días antes del proceso quirúrgico (y de manera continua cada día en ese intervalo), se le administrará una ampolleta de vitamina K-50 (0.5 ml) por vía intramuscular. (Dosis 12 mg/Kg).

2.- Un día antes del proceso quirúrgico, a los 2 animales les será retirado todo alimento, solamente se dejará que beban agua.

3.- El día de la operación, antes de efectuar el proceso quirúrgico, a los 2 animales (control y tratado) habrá de hacerseles una toma de sangre por vía vena marginal*. Se separa al suero y se les congela.

4.- Durante la preparación del lugar donde ha de efectuarse la operación, habrá de cuidarse que el mismo este con la mejor limpieza posible, además, que el área debe hallarse totalmente despejada.

5.- Es necesario revisar que el material que habrá de ser utilizado en la cirugía, se encuentre completo y de preferencia será esterilizado, o estará colocado en un recipiente con un volumen adecuado de benzal al 5 %. (El suficiente para bañar lo más importante de las piezas de cirugía). Se comprobará por otra parte que existan los volúmenes adecuados las soluciones salina fisiológica y Ringer, así como deben tenerse a la mano los implementos necesarios para la cirugía (Hilos de sutura, agujas, etc).

Etapa Operativa**.

1. Para llevar a cabo un adecuado desarrollo de esta etapa y como forma de organización para el equipo de trabajo; se recomienda lo siguiente:

a) Un anestesista. A este integrante le corresponderá todo lo relacionado a la anestesia del animal. Tendrá cuidado de efectuar una adecuada anestesia, así como el comprobar todos los signos implicados en el caso***.

* Es recomendable un volumen aproximado de 5 ml de sangre.

** Todo lo relacionado con los detalles de las técnicas quirúrgicas, habrán de ser consultados en la sección correspondiente a ellas dentro de este manual.

*** Consultar lo referente a anestesia en este manual.

b) Un operador. A este integrante le corresponderá efectuar todo el trabajo que implique la Hepatectomía (exponer el órgano, cortar y suturar). Con ello se evitarán posible dificultades por la presencia de más personas.

c) Dos asistentes. Uno de ellos, será el encargado de proporcionar lo que respecto a material para cirugía se necesita. El otro, estará al cuidado de la adecuada hidratación y limpieza que el órgano y zonas anexas requieran. A este último no debe pasársele por alto la hidratación de los globos oculares, ya que ellos también sufren resequedad por la anestesia.

2.- Rasurar la zona en donde habrá de efectuarse la hepatectomía. Hecho lo anterior, ésta será limpiada con agua y jabón, así como será desinfectada con alcohol etílico al 70 %.

3.- Anestésiar con éter Etílico.

4.- Hepatectomía*. Expuesto el órgano, se levantará a uno de los lóbulos y con un corte rápido, será seccionada una porción de 1 a 1.5 cm.³ de la parte terminal del lóbulo. Inmediatamente la zona será oprimida con gasa estéril, el tiempo será de aproximadamente 5 minutos; si la hemorragia no se detuviera aún oprimiendo más tiempo (aproximadamente 10 minutos), la zona es cauterizada con una navaja de bisturí previamente calentada. ¡ Hay que tener cuidado de no sobrepasar dicha cauterización ! ¡ Evítese el tener el mechero junto al lugar de trabajo, ya que se está trabajando con éter!. El trozo de hígado será colocado en formol al 10 %.

Durante la hepatectomía deberá comprobarse que exista una adecuada humedad de los órganos; sino fuera así, se adicionarán vo lúmenes de 0.5 ml de solución Ringer sobre ellos.

Al efectuar las suturas, tanto de tipo interno como externo, no debe favorecerse el acúmulo de sangre en la zona y los puntos realizados, ésta tendrá que ser secada y limpiada.

* Primero localice el órgano: Al lado derecho del animal y por debajo de una costilla en aproximadamente 1 cm. El corte que efectue no será mayor de 3 cms hacia su peritoneo.

5.- Luego de efectuar la sutura externa, y al cortar los hilos sobrantes, no debe cortárseles al ras, es práctico el dejar un tamaño de aproximadamente 0.5 cms por hilo para el retiro posterior de las suturas.

Etapa Post-Operativa.

1.- Inmediatamente después de haber efectuado la sutura, se aplicarán sobre el área, algunos toques de merthiolate. Serán espolvoreados, cubriendo la zona, con polvos de benzal. Finalizado todo se pondrá una gasa como medida de protección.

2.- El vendaje del animal se efectuará evitando una presión fuerte en él.

3.- Se aplicará por vía intramuscular (en la cara interna de una pierna) 0.5 ml de solución de penicilina G procainica de 400,000 U. También serán aplicados 0.5 ml de una ampolleta de 1 ml de neomelubrina. (0.6 g por Kg de peso). El tratamiento con el antibiótico, deberá ser seguido por espacio de 5 días, a razón de una dosis diaria. La neomelubrina será administrada inmediatamente después de la hepatectomía, así como a las 24 y 48 hrs respectivamente. El analgésico, como medida alterna, puede ser administrado, por vía oral utilizando 2 tabletas previamente disueltas en agua. El analgésico más empleado es la aspirina.

4.- La terapia de sustitución consistirá de 20 ml de solución salina fisiológica estéril por vía intraperitoneal.

5.- El animal será colocado en un lugar donde se tenga la seguridad de que él estará comodo. Si es posible, el área estará acondicionada con una cama de aserrín, una fuente de calor y suplemento de solución azucarada al 20 % en el bebedero (Si el animal no bebiera, habrá de administrársele por vía intraperitoneal 20 ml de solución glucosada a las 12 ó 14 hrs. post-hepatectomía). El animal, luego de la operación, sufre una baja dramática de su temperatura corporal; por ello es recomendable el emplear alguna frazada útil al caso.

6.- Debe tenerse en observación al animal hasta por un periodo de 6 hrs. luego de la operación, él se recuperará aproximadamente de 30 a 50 minutos, e intentará liberarse de su vendaje; tengase cuidado. Durante este proceso de recuperación y de forma constante durante algún intervalo de tiempo, el animal orina bastante; habra qué cuidar que siempre se encuentre en un lugar limpio, esto evitará problemas posteriores. Regístrese el color de su orina en su historia clínica.

7.- Toma de muestras. Se obtendrán los volúmenes ya establecidos (de sangre a las 24, 48, 72 hrs. post hepatectomía. Se separan a los sueros y se les mantendrá en refrigeración (o se les congelará). Asimismo durante estos días de toma de muestra, deberá pesarse diariamente a los dos animales (control y tratado). No sólo obtendrá muestra del animal tratado, también deberán correrse las pruebas en paralelo para el control.

8.- Determinaciones de laboratorio. Es recomendable que cuando se corra alguna prueba, de las que serán mencionadas posteriormente, esta sea una determinación que hagan todos los equipos al momento de preferencia, durante el proceso de muestreo, prepare las curvas de calibración necesarias; al tener todos los sueros - estos serán analizados. Para hacer las cuantificaciones, el equipo de trabajo previamente ha debido organizarse.

Las determinaciones que habrán de efectuarse para este estudio, son:

a) Sangre: Proteínas totales y albúmina; bilirrubina (total y conjugada); Colesterol; Urea; NH_3 ; Acido Úrico y Glucosa.

b) Orina: Uribilinógeno y Aminoácidos.

Resultados*.

Una vez registrados los datos y posteriormente obtenidas las concentraciones, se sugiere que aparte de los gráficos para cada

* Para llevar un adecuado registro de lo obtenido para cada metabólito, veáse lo concerniente a registro de datos del presente manual.

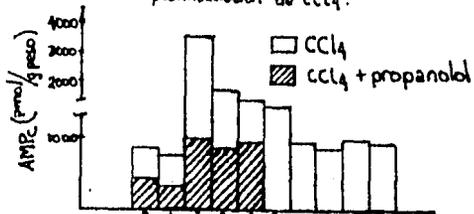
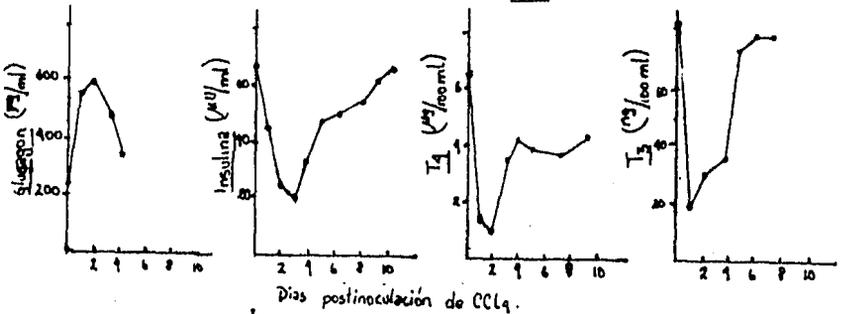
determinación; deberán elaborarse otros como los representados en el apéndice correspondiente de este manual.

Discusión y Conclusiones.

- 1.- Estudie detenidamente los datos obtenidos para cada determinación, trate de establecer posibles relaciones entre ellos.
- 2.- Seleccione aquellos datos representativos e interrelacione lo que en cada caso sucede.
- 3.- Elabore sus conclusiones.

Bibliografía.

1. Balasegaram, M.B. & Suresh K.J. Hepatic resection. Pillars of success built on the foundation of 15 years of experience... Am. J. Surg. 141: 360-365. March 1981.
2. Ganong, W.F. Review of medical physiology. 9th. Edition. Edit. Lange Medical Publications. Cal. U.S.A. 1979. pp. 385.
3. Houssay, B.A. y colaboradores Fisiología humana. 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975. pp 487-670.
4. Lynch, M.J., y colaboradores. Metodos de laboratorio. 2a. Edición. Edit. Interamericana S.A. D.F., México, 1984. pp 197.
5. Mc. Manus, J.P. & J.P. Whitfield. Stimulation of autophosphorylation of liver cell membrane proteins by calcium and partial hepatectomy. J. Cell. Physiol. 106: 33-40, 1981.
6. Morsiani E, y colaboradores. Attualita in tema di trofismo e rigerazione epatica. Min Med. 75 (20): 1179-1183. 12 Maggio 1984.
7. Mourelle, M. & Boanerges R. Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 256 (4): 1656-1660. 1981.



- Se encontró el nivel de glucagón elevado, siendo su nivel máximo a los 2 días. En contrast: los niveles de insulina y T₄ bajaron, alcanzando su valor mas bajo luego de 3 días en el caso de -

insulina, 2 días en el caso de T4 y 1 día para T3. La insulina retornó a sus valores normales a los 10 días, la T4 a los 4 días... Los niveles de glucosa plasmática se incrementaron luego de 10 a 24 hrs. posterior a la administración de CCL4 indicando que los cambios en los niveles de la hormona El enlazamiento de insulina no cambió hasta el día 3, y para los siguientes 7 días este enlazamiento permaneció incrementado aproximadamente 3 veces el valor del control, posteriormente retornó a los valores control por el día 11.

- El bajo enlazamiento para el glucagon, sobre los primeros dos días luego de la intoxicación por el CCL4, se refleja en la respuesta de la adenil ciclasa hacia las hormonas.

- La concentración de AMPc, luego de la intoxicación por CCL4, no cambió durante el primer día, posteriormente se incrementó al 2° día. Se trata de explicar el aumento del AMPc en función de los niveles incrementados de catecolaminas. Para comprobar esto se empleó un agente betaadrenergico (Propanolol), viéndose que este previene el aumento de AMPc.

Los autores con los resultados obtenidos, concluyeron que:

- Se demuestra que la intoxicación por CCL4, sigue un curso de tiempo similar a lo observado en ratas hepatectomizadas; existen bajas en T3 y T4 e insulina, así como elevados niveles de glucagon. Tal vez, los niveles de hormonas pancreáticas se deban a la influencia de los cambios en el aclaramiento del hígado.

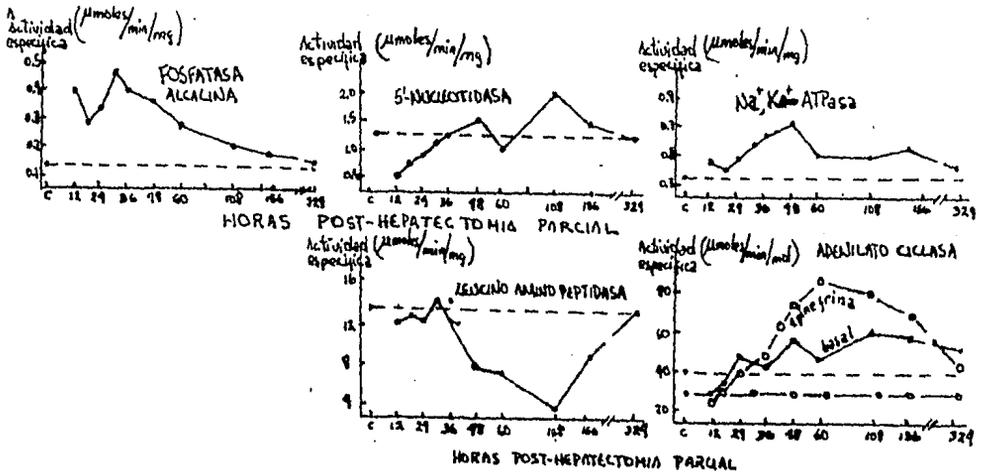
- Los elevados niveles glucagon hepático, lo cual motiva a efectos lipolíticos en conjunción con niveles bajos de insulina, deben de movilizar los almacenes energéticos.

- La adenil ciclasa, de acuerdo a los resultados, es sugerida de que no se altera significativamente por el hepatotóxico.

- Se propone que el incremento en el número de receptores para insulina, y el retorno a los valores control para los receptores del glucagon, luego de una intoxicación aguda por CCL4 requiere de

una síntesis de protefina.

8. Netter, F. H. Digestive Sistem. Part III. Liver, Biliary tract and Pancreas. The Ciba Collection of Medical Illustrations. - Edit Ciba. USA. 1962.
9. Walker, P.P. y colaboradores. Polyamine metabolism in regenerating livers from normal and hypocalcemic rats. J. Cell. -- Physiol. 94: 87-92 1978.
10. Walker, P.R. & J. F. Whirfield. Regulation of the prereplicative changes in syntesis and transport of messenger and hypocalcemic rats. J. Cell. Physiol. 108: 427-437 (1981).
11. White, A.: P. & E. L. Handler. Smith. Principios de Bioquímica. Edit. Mc. Graw-Hill. D.F., México. 1977. pp. 280, 500-506.
12. Witek-Janusek, L. & S. F. Marotta. Status of the pituitary-adrenocortical- liver axis following partial hepatectomy. Prac. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 210-215. 1981.
13. Wondergem, R. & D.R. Harder. Membrane potential measurements during rat liver regeneration. J. Cell. Physiol 102: 193-197 1980.
14. Wright, G.H. Changes in plasma membrane enzyme activities during liver regeneration in the rat. Bioch. Acta. 470: 368-371 1977.



Los resultados obtenidos fueron:

- Se confirmó el que existe un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina, lo cual ya ha sido mencionado anteriormente.

- La actividad de la 5' -nucleotidasa fue significativamente más baja, en comparación con los valores control de membranas aisladas de hígados de rata (a las 12, 18 y 24 hrs, después de la hepatectomía parcial).

- El efecto de la epinafrina, sobre la actividad de la adenilato ciclasa en membranas regenerantes de hígado de rata, fue bloqueado por la adición del antagonista beta-adrenérgico propanolol.

El propanolol solo no afecta la actividad de la adenilato ciclasa.

- Se observó que la actividad de la adenilato ciclasa, en la presencia de glucagon, en membranas plasmáticas aisladas luego de 12 hrs. post-hepatectomía, fue menor que la observada en los controles; además la actividad de esta enzima en las membranas regenerantes, permaneció baja durante 13,5 días.

Con leucino-amino-peptidasa, al principio no hubo cambio, pero luego tuvo un descenso brusco y mantenido posterior a la hepatectomía parcial.

La diferencia de resultados, respecto a otros autores, se establece por la influencia que pudieran haber tenido los factores del sexo, la cepa de ratas, el tipo de alojamiento, el método de cirugía, etc.

Significancia fisiológica de los resultados:

- El dramático incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina, posterior a las 12 hrs de la hepatectomía, sugiere una relación con la regulación de la síntesis de DNA, o la Mitosis. Además, si la fosforilcolina es un sustrato para la enzima, el incremento de la actividad debe contribuir a la secreción de la colina biliar: esta última se encuentra muy incrementada luego de una hepatectomía parcial.

- El incremento de actividad en la ATP-asa, puede estar involucrada en el mantenimiento de la función secretoria biliar del

hígado. Lo afirmado anteriormente está basado por: (a) un efecto inhibitorio de los glucosidos cardíacos sobre la excreción de la bilis, (b) correspondencia de la temperatura del fluir de la bilis y de la actividad de la ATPasa en este estudio; además, el patrón de incremento de producción de bilis por gramo de hígado luego de una hepatectomía parcial.

- La disminución mostrada por la leucinoamino-peptidasa refleja la disminución total en el catabolismo proteico luego de la cirugía; tal vez la disminución de esta enzima contribuya a la restauración de la proteína plasmática membranar.

- Se correlaciona la disminución de la 5' - nucleotidasa, luego de las 12 hrs. de hepatectomía parcial, con las observaciones de una actividad de Ribonucleasa disminuida en un hígado regenerante.

Los cambios en las concentraciones extracelulares de adenosina, formada por la hidrólisis de AMP, deben estar involucrados en la regulación de la actividad de la adenil ciclasa.

15: Zieve, L., y colaboradores. Urea excretion, galactose excretion and aminopyrine disappearance during normal liver regeneration after partial hepatectomy, J. Lab. Clin. Med. 104 (1): 24-34, July 1984.

Los resultados, la discusión y las conclusiones del presente trabajo fueron:

Valores de mediciones de funcionamiento hepático luego de hepatectomía al 70 %.

	Control (n=9)	Opera- ción 5 días (n=9)	POST-HEPATECTOMIA (hrs)			
			3/6 (n=10)	24 (n=11)	46 (n=7)	72 (n=11)
Peso neto Higado (g)	9.21	9.50	3.45	4.55	6.76	6.35
Proteína he- pática total(g)	1183	2061	237	816	1407	1316
DNA Hepático total (µg)	7501	7743	3192	2515	2514	6277
Excreción de Urea (mg/3hr)	120	143	111	122	—	—
GEC (mg/min)	1.58	1.71	1.11	1.05	0.97	1.16
ADR (g en 10mg)	1.82	9.06	4.76	2.38	5.55	3.82
Ácidos biliares sencos (µmol/dl)	9	4	78	154	29	46

GEC: Constante de eliminación de Galactosa,

ADR: Velocidad de desaparición de Aminopirina

N: Número de ratas estudiadas.

Discusión:

- La excreción del urea y la eliminación de galactosa, luego de la hepatectomía, han sido preservadas,

- La desaparición de aminopirina (con desmetilación exclusiva a nivel de los microsomas hepáticos) se sostuvo hasta las 72 hrs,

- La concentración de ac. biliar sérico aumentó hasta 17 veces más que los valores normales, luego de 24 hrs posteriores a la hepatectomía, sin embargo, disminuyó 9 veces el valor normal a las 46 hrs, y cinco veces el valor normal a las 72 hrs.

- Se vió que la velocidad máxima de incremento en la proteína hepática se presenta de las 12 a las 24 hrs luego de la hepatectomía.

- A las 48 hrs, la velocidad neta de la síntesis proteica he-

patocitaria total se ha incrementado 3 veces. Si al animal no se le ha alimentado, los aminoácidos y la proteína son utilizados como una fuente de energía, así mismo como los ladrillos para la construcción. El intercambio de N_2 está incrementado y la síntesis de la urea se establece como forma de evitar la acumulación tóxica de amoníaco. Este último debe ocurrir como preservación de la formación de urea.

- Dada la relativa disminución en la eliminación de galactosa a las 48 hrs, se pudiera relacionar con una disminución pasajera de la actividad de la galactosil-transferasa hepática (lo cual ocurre de las 24 a las 32 hrs post-hepatectomía). Similarmente, el colorante Bromosulfonftaleína (BSP) inyectado fue medido y se observó que hubo una disminución en la cantidad de BSP conjugado. Esta disminución a las 48 hrs, tal vez refleje la baja de actividad de la enzima conjugante observada durante este tiempo.

- Se observó una síntesis de albumina disminuida en su concentración por aproximadamente una 40 %.

- Pudo verse que durante la regeneración, la excreción de bilirrubina (al igual que la de otros colorantes) aparentemente no es una función vital.

- En el caso de aminopirina, durante las primeras hrs, luego de la hepatectomía, la función era relativamente preservada, tal vez porque los microsomas disgregantes estuvieron muy activos durante este periodo.

Conclusión:

Parece que las funciones hepáticas que reflejan el crecimiento celular, o se hayan asociadas a cambio en el flujo sanguíneo hepático, son mantenidos; esto, donde otros que son quizá más especiales (y además diferenciados), están disminuidos durante la regeneración hepática posterior a una hepatectomía parcial. Desde el punto de vista de la economía celular, la regeneración luego de un 70 % de hepatectomía es una condición de stress y las fuentes de energía limitadas de la célula están dirigidas hacia la más importante tarea que se tenga a la mano, esta es la multiplicación celular y el crecimiento.

III. 3. Perfusión Hepática.

Introducción.

Es reciente que el estudio de algunas de las funciones realizadas por órganos haya venido adquiriendo un interés creciente, - principalmente cuando se habla de aquellos que han sido aislados del contacto con otros y esto ha originado que se establezcan las condiciones necesarias para tal fin. Debido a ello, ha tenido que involucrarse el manejo de fluidos con propiedades similares a la sangre, reconstituyentes o sustancias de uso particular para el órgano, así como el empleo de condiciones especiales (pH, temperatura, humedad, presión, tonicidad, etc). El trabajar con un órgano perfundido facilita el que se emplee entero, y ya en la práctica; éste es colocado en un sistema cerrado, en el cual se permite la circulación de un fluido oxigenado, bajo una presión positiva. Dicho proceso ha sido aplicado para hígado, corazón, riñón, páncreas e intestino delgado; lo que representa una gran contribución al papel metabólico que se desarrolla en cada uno de ellos ^{6,8}, pero el que habrá de ser ajustado dadas las condiciones artificiales en las que operó el tejido.

Con la ayuda de otros procesos bioquímicos para el estudio - del metabolismo (citología bioquímica, centrifugaciones diferenciales para partículas subcelulares, cultivos de tejidos, empleo de isótopos radioactivos, etc), así como con el empleo de órganos - perfundidos, se ha logrado fortalecer el conocimiento fisiológico y bioquímico que sucede en ellos.

Al hacer uso de una perfusión hepática, el interés que se genera está basado en demostrar la multifuncionalidad con la que el órgano trabaja. El estudiarlo de manera aislada permite el seguir, simple e ilustrativamente, algunas de sus principales actividades.

Ya ha sido establecido que el hígado in situ puede permanecer con una elevada viabilidad (consequently con su funcionalidad), siempre y cuando se le proporcionen el medio y las sustancias necesarias^{1,4,5,6}, lo cual también se presenta con el órgano fuera del animal² (in vitro).

Inicialmente la perfusión hepática realizada con procesos técnicos complicados y largos, proporcionó resultados pobres la mayoría de ocasiones que se empleó para estudios. Recientemente, ya con la experiencia, ha sido posible adaptar una técnica de perfusión inversa diferente a lo que comúnmente se venía realizando. En éste caso se combinan un sistema cerrado y un flujo inverso del líquido perfundido (vena cava inferior-Hígado-Vena Porta)⁵.

El hígado perfundido, no solamente ha sido estudiado como tal, con la accesibilidad que brinda este sistema para la recuperación de diferentes constituyentes celulares (Hepatocitos, Células de Kúpffer, endoteliales y almacenadores de grasa), cada uno de ellos ha podido ser estudiado aisladamente².

Objetivos.

Facilitar al alumno el desarrollo de una técnica capaz de mostrar el funcionamiento de un órgano, por método in vitro, acorde a las condiciones que se le impongan.

Establecer que el conocimiento del adecuado manejo de un órgano, así como de los medios con los cuales se puede alargar su supervivencia fuera del organismo; constituyen un mecanismo óptimo para estudios de acciones únicamente relacionadas con él.

Hipotesis.

El adecuado manejo, así como las condiciones que se le proporcionen, a un órgano determinado; influirán para que éste funcione en forma similar a un estado normal.

Metodología.

Material.

- Reactivos

Reactivo colorante de Hematoxilina.

- Eter etílico.
- Solución balanceada de Hanks.
- Reactivo colorante de-Eosina.
- Reactivo colorante de Wright.
- Solución Salina Fisiológica.

Equipo.

- Jeringa plástico desechable (10 ml).
- Pegamento de alta resistencia.
- Pinzas para furata.
- Bomba de Oxigenación de pecera
- 2 vasos de precipitado de 250 ml.
- Caja Petri de vidrio de 15 cms.
- Cuadritos de gasa de 5 cm².
- Estuche de disección completo.
- Aguja para Venocclisis pediátrica # 18 con mariposa.
- Cubreobjetos
- Soporte de alambre para rata.
- Pipeta Pasteur.
- Embudo de vidrio tallo corto diámetro igual.
- Tubo de polibronileno 5 cm. long. y 0.5 cm. de diámetro.
- Soporte Universal.
- Bomba peristáltica simple.
- Baño María con termostato.
- Cepillo pequeño con dientes de acero inoxidable.
- Cámara de Newbawer.
- Hilo de seda 000.
- Algodón.
- Microcentrifuga 15000 rpm o centrifuga. clínica.
- Portaobjetos.
- Microscopio compuesto c/100 x (aumento).
- Tubo de polibronileno de 30 cms longitud y 0.3 cm. de diámetro
- Lámpara para microscopio este-reoscópico de 20 m.
- Malla de acero inoxidable de forma en "V" 39 X 95 mm.

Metodo.

El experimento mostrado a continuación, será establecido de -- acuerdo a lo realizado por Romero y Viña en 1983 ⁵. Y se denomina perfusión inversa.

A. Selección del animal: se trabajará con una rata blanca (sin importar el sexo), adulta y con un peso aproximado de 200 g.

B. Preparación del material para la perfusión.

a) Reactivos: Se empleará una solución de Hanks* que previamente al experimento será colocada en el baño María a 37° C. Tal solución constituirá el medio de perfusión.

b) Montaje del equipo. (Fig. 1).

- Sostén de la presión hidrostática del medio de perfusión. En este caso, la jeringa de plástico será horadada en aproximadamente un cuarto de su longitud (empezando de la punta hacia el émbolo), mediante la utilización de un tubo de vidrio con diámetro similar al tubo de polipropileno de 5 cm. de long. Se retira la porción que se ha separado y se une, en el agujero, el tubo a la jeringa. Se debe cuidar que ésta unión sea firme, de lo contrario, al momento de perfundir tendrá fugas. Para evitar tal situación, sugerimos sellar la unión con un pegamento adecuado al caso.

Posterior al tratamiento de la jeringa, en la punta correspondiente a la aguja, se conecta la aguja para venoclisis. Por otra parte, el trozo de tubo unido es conectado al tubo de mayor longitud (éste estará en contacto directo con la bomba peristáltica). Para sujetar la jeringa y el tubo, adapte los soportes con sus pinzas necesarias.

- Prueba para el sistema de perfusión. Para tal caso, el empleo de un vaso de precipitado de 250 ml conteniendo agua destilada, puede ser utilizado. Mediante este simple proceso puede regularse el flujo de solución a perfundir. Es de esta forma como puede lograrse la limpieza de todo el sistema, para ello recomendamos sucesivos lavados con detergente, posteriormente con agua y agua destilada. Como proceso final debe esterilizarse, en autoclave, todo lo concerniente a tubería.

* Esta sal contiene: NaCl 8 g, KCl 0.4 g, CaCl₂ 0.14 g, MgSO₄·7H₂O 0.10 g, MgCl₂·6H₂O 10 g., NaHPO₄·H₂O 0.06 g, KH₂PO₄ 0.06 g, Dextrosa 1.00 g, NaHCO₃ 0.35, rojo fenol 0.02, H₂O destilada 1000 ml; También puede adicionarse al medio: colagenasa tipo IV al 0.05 p/v y se ajusta la solución a pH 7.6 antes de usarse².

Con el adecuado funcionamiento del sistema, se tendrá más seguridad para la regulación del flujo del medio de perfusión. Por esto último, se recomienda-previo a la perfusión del hígado- se haga circular durante un tiempo corto (5') el fluido a trabajar. Para evitar la formación de burbujas y el salpiqueo de la solución, coloque la malla en "V" de manera invertida.

En el momento de que el sistema se encuentre funcionando, debe tenerse cuidado de comprobar continuamente que la temperatura del baño María sobre pase de los 37°C. Así mismo en este momento, puede colocarse a la pipeta Pasteur proveniente de la bomba de --oxigenación y corroborar su adecuado funcionamiento, así como la intensidad de su bombeo.

- Preparación del animal previo a la perfusión. Mediante el empleo de éter se anestesiará a la rata. Posterior a ello, 0.5 ml de una solución al 5 % de heparina, será administrada vía vena safena.

- Técnica quirúrgica. Luego de los dos procesos anteriormente mencionados, coloque al animal con el dorso hacia arriba sobre el soporte de alambre. Cuide de que quede bien sujeto y con las -extremidades extendidas y abiertas. Por debajo del soporte deberá existir un vaso de precipitados con fluido de perfusión (la temperatura deberá estar controlada por empleo de un baño María). Con la ayuda de un embudo colocado por debajo del cuerpo del animal, podrá recolectarse mejor el fluido perfundido.

Para continuar con la perfusión, continúe con los pasos posteriormente descritos:

1. Previo a abrir el abdomen, coloque una lamparita sobre la zona. Exponga los órganos del animal (emplee unas pinzas de sujeción lo que facilitará el que se mantenga abierta toda la cavidad abdominal). Con todo cuidado remueva los órganos y haga un orificio de aproximadamente 0.2 cm de diámetro en la piel que se encuentra por detrás de la abertura abdominal. Posterior a todo ello, remueva cuidadosamente los intestinos y deje que descansen a un -lado. Se observará como la vena Cava se divide hacia cada uno de -

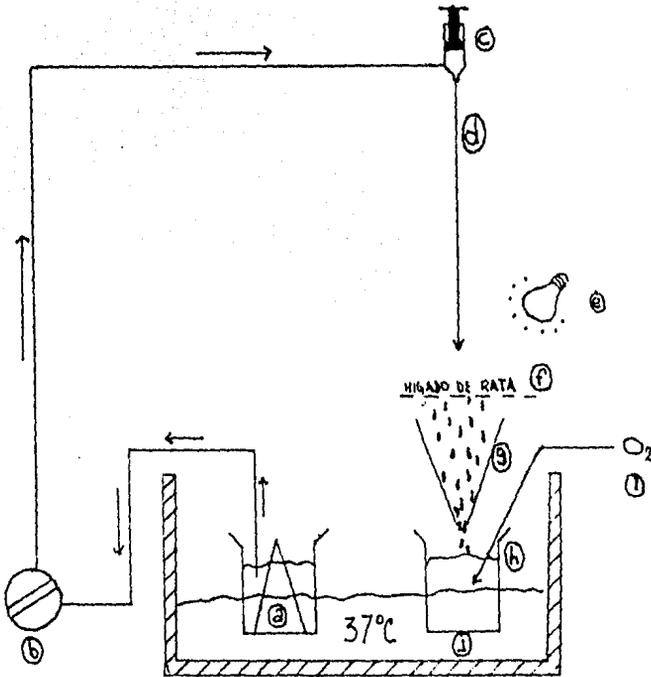


Fig. 1. Aparato de perfusión hepática in vitro^{2,5}.
a. Recipiente para la recolección del perfundido inicial (el cual se debe desechar) y del lavado del sistema. b. Bomba peristáltica. c. Jeringa con adaptación a la bomba peristáltica. d. Aguja para venoclisis. e. Lámpara de microscopio estereoscópico. f. Hígado in situ. g. Embudo de vidrio. h. Recipiente recolector del líquido de perfusión. i. Bomba de oxigenación. j. Baño María (Consultar la explicación en el texto).

los riñones, formando la vena Penal. En éste punto de la unión, de preferencia antes de ella, coloque una ligadura ligeramente apretada* (Haga uso de la aguja curva de cirugía y del hilo seda. Evite el lesionar alguna otra parte).

2. Levantando los lóbulos hepáticos, justo en la porción de unión de ellos, encontrará una vena que se dirige hacia los intestinos. Esta, al llegar a ellos, se dividirá en varios vasos pequeños; coloque otra ligadura alrededor de la porción más gruesa.

3. Abra un poco más el tórax, justo por la división de la cavidad torácica y abdominal e identifique la vena que vá del corazón hacia el hígado. Seleccione la porción más cercana al corazón y coloque una ligadura*, algo floja, alrededor de la vena cava inferior.

4. Con la aguja de venoclisis, canule hacia la vena Cava, introduciéndola por el atrio derecho del corazón. Inmediatamente después de éste punto, corte la vena Porta. Esto es más sencillo si se aprieta la ligadura colocada previamente. Corte con tijeras.

5. Anude la ligadura que se encuentra en la vena Cava abdominal. Con ésto último se establecerá el flujo de vena Cava a vena Porta.

6. Los primeros 50 ml de medio, mezclados con sangre, deberán ser desechados. El resto se colecta, de la cavidad abdominal, en el vaso de precipitado. Se volverá a reoxigenar el fluido y pasará una vez más a la circulación. Compruebe la adecuada recolección del fluido a través de la espalda del animal, sobretodo que fluya libremente por el embudo y que caiga sin producir espuma. Cuando el hígado ya ha sido limpiado de sangre, comienza a perder color (Es necesario el que la lámpara se encuentre encendida, y sobre él mismo, con lo cual se evitará pérdida de calor).

* Al dejar tales ligaduras, haga un nudo corredizo sencillo, dejando una porción suficiente de terminales de hilo para posterior manejo.

7. Mantenga el flujo de la perfusión a una velocidad aproximada de 40 ml. por minuto² (regúlela por el empleo de la bomba peristáltica).

8. Debe de recircularse un volumen constante de 50 ml. durante aproximadamente 10 minutos. En esta etapa de perfusión, el hígado se expande por lo menos en dos veces su tamaño normal.

9. Para la recolección de las células obtenidas, dependiendo del tipo de fluido de perfusión utilizado, se procederá de la siguiente forma:

a) Si solamente se ha empleado solución balanceada sin colagenasa, detenga la bomba peristáltica y recolecte el fluido. Procéselo como se indica en el siguiente inciso.

b) En caso de que el fluido contuviera colagenasa², detenga la bomba peristáltica y separe el hígado cortando la vena Cava y la cava inferior antes de las ligaduras (I). Colóquelo en la caja de Petri. (al que previamente debió de haber adicionado 80 ml. de una suspensión de Hanks fría). Despelleje el órgano con lo que la mayoría de las células hepáticas serán liberadas con agitación moderada y la eficacia puede ser incrementada (se raspa mecánicamente al hígado con un cepillo). Tanto a la armazón del tejido conectivo, como a la suspensión que contiene grandes restos de tejido, son colocados sobre un filtro triple (II). La suspensión resultante es la suspensión celular compuesta de células parenquimatosas (hepatocitos) y no parenquimatosas (células endoteliales, de Kupffer, de almacenamiento de grasa, fibroblastos, etc.).

10. De las suspensiones obtenidas, cualquiera que haya sido el tratamiento de la obtención de las células, el proceso que a continuación se menciona, tiene que realizarse cuidadosamente y de forma eficiente.

Se hará empleo de centrifugaciones diferenciales para determinar los diferentes tipos de células. Asimismo, con conteos diferenciales se establecerán los tipos de células, su número y su viabilidad (mediante la exclusión del azul de Tripano)*.

Las centrifugaciones diferenciales son relativamente sencillas

y se efectuarán como sigue:

a) Centrifuge la suspensión celular total a 50 xg por dos minutos (III). El sobrenadante (S1) manténgalo a la mano, resuspenda cuidadosamente la pastilla en 50 ml de solución de Hanks fría. Para minimizar la destrucción celular, el paquete debe ser resuspendido en un pequeño volumen de solución, posteriormente será -- llevado al volumen final. Se repetirá el proceso cuatro ocasiones. Junte los sobrenadantes de la segunda y tercera centrifugada con S1, ésto corresponderá a las células no parenquimatosas. La última pastilla conteniendo hepatocitos purificados, será resuspendida en 50 ml de solución, y serán contadas las células. El sobrenadante (S4) deberá ser desechado (IV).

b) Los sobrenadantes S1, S2 y S3, posterior a su mezcla, serán centrifugados a 50 xg por dos minutos, durante dos ocasiones; se obtendrán un botón residual de hepatocitos (V). El sobrenadante resultante es recentrifugado dos veces a 500 xg por tres minutos cada vez, con ello se separará a las células de los restos de las mismas (VI). Para cada ocasión, el paquete de células no parenquimatosas será resuspendido en 20 ml de solución. Si existen hepatocitos, con una centrifugación a 50 xg se les desechará -- (VII).

Con dos centrifugaciones de 500 xg se recuperarán células de Kupffer y endoteliales principalmente. Habrá de cuantificarse a las células, así como su grado de supervivencia.

11. Posteriormente puede continuarse con el cultivo in vitro de las células recuperadas. Para ello habrá de utilizarse algún tipo de medio específico con lo que se mantendrá la supervivencia de las células. Dentro de ésta parte, una gran diversidad de estudios pueden efectuarse^{1,2,4,5,6} (Ensayos de actividad de la adenil ciclasa, ingestión de Hierro por células de Kupffer, gluconeogénesis, algunas otras pruebas pertenecientes a metabolismo, etc).

* La solución se prepara con 2 g. de azul de tripano en 100 ml de agua destilada. Se aplican 2 gotas a la suspensión y se observa al microscopio a 40x (contabilizar por Neubauer).

Bibliografía.

1. Berry, E. N. y colaboradores. Role of the liver in the degradation of very low density lipoproteins: a study of lipolysis by heparin releasable liver lipase and uptake during isolated rat liver perfusion. *Europ. J. Clin. Invest.* 11: 151-159. -- 1981.
2. Doolittle, R. L. & G. W. Richter. Isolation and culture of - Kupffer cells and hepatocytes from single rat livers. *Lab. Invest.* 45 (6): 558-566. 1981.
3. Galigher, A.E. & E. N. Kosloff. Essentials of practical microtechnique. 2nd. edition. Edit. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A. 1971. pp. 131- 132.
4. Hems, R. y colaboradores. Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 101: 284-290. 1966.
5. Romero, P. J. & J. Pila. A simple procedure for the preparation of isolated liver cells. *Bioch. Educ.* 11 (4): 135-136. 1983.
6. Striffler, J.S. & D.L. Curry. Rat liver-pancreas preparation: perfusion technique and metabolic functions. *Am. J. Physiol.* 237 (4): E340-E348. 1979.
7. Wasley, G.D. & J.W. May. Animal cell culture methods. Ed. -- Black well Scientific Publications. Oxford, Great Britain. 1970. pp. 181-187.
8. White, A. y colaboradores. Principios de Bioquímica. Ed. Mc Graw-Hill. México, D.F. 1970. pp.281-290.

III. 4. Inducción al Hipotiroidismo.

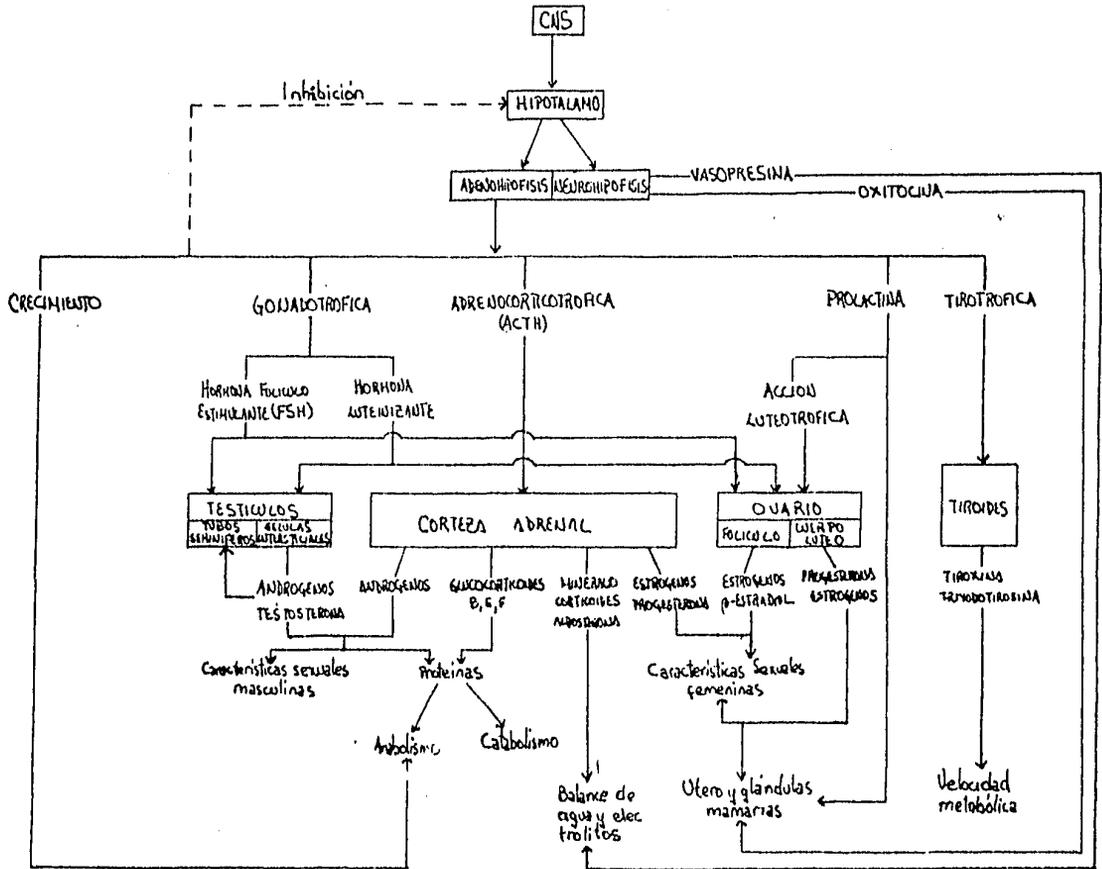
Introducción.¹⁹

Para establecer certeramente la funcionalidad del Sistema Endócrino, ha tenido que recurrirse a procesos experimentales considerados como clásicos en tales tipos de estudios. Es así como se ha definido un cierto número de hechos tendientes a la caracterización de los mecanismos de intercomunicación por parte de los diferentes órganos corporales, su papel en tal comunicación y la importancia que tal representa para el funcionamiento orgánico en general. La clasificación de estos procesos se le ha conformado de la forma siguiente: (a) Extirpaciones quirúrgicas de tejidos y glándulas en cuestión. Con lo que se obtiene como resultante un síndrome específico o un estado deficiente y notorio para el caso; (b) Reimplantación de la glándula en cuestión. Esto ha demostrado prevenir el que se presente un síndrome debido a la carencia de tal órgano, asimismo es involucrado aquí lo concerniente a la administración de extractos crudos de cierta glándula; (c) El aislamiento y la purificación de los productos de secreción. Con esto se ha logrado definir el tipo de glándulas endócrina, así como la función que ejerce.

Una vez que se ha definido el tipo de glándula endócrina, como es de esperarse, las secreciones de ellas están en función de las células que la constituyen y la característica de la actividad ejercida por el órgano, está basada en el tipo de sustancias que son secretadas. De hecho, tales sustancias presentan ciertas peculiaridades que las hacen específicas (Actúan en pequeñas cantidades; previo de su efecto aparente requieren de un periodo latente, y su retiro de la circulación general es muy rápida dado que son metabolizadas por tejidos).

Tres aspectos importantes para el organismo viviente cubren las acciones desarrolladas por las hormonas.

a. Actúan a nivel del crecimiento, diferenciación y maduración del organismo (morfogénesis).



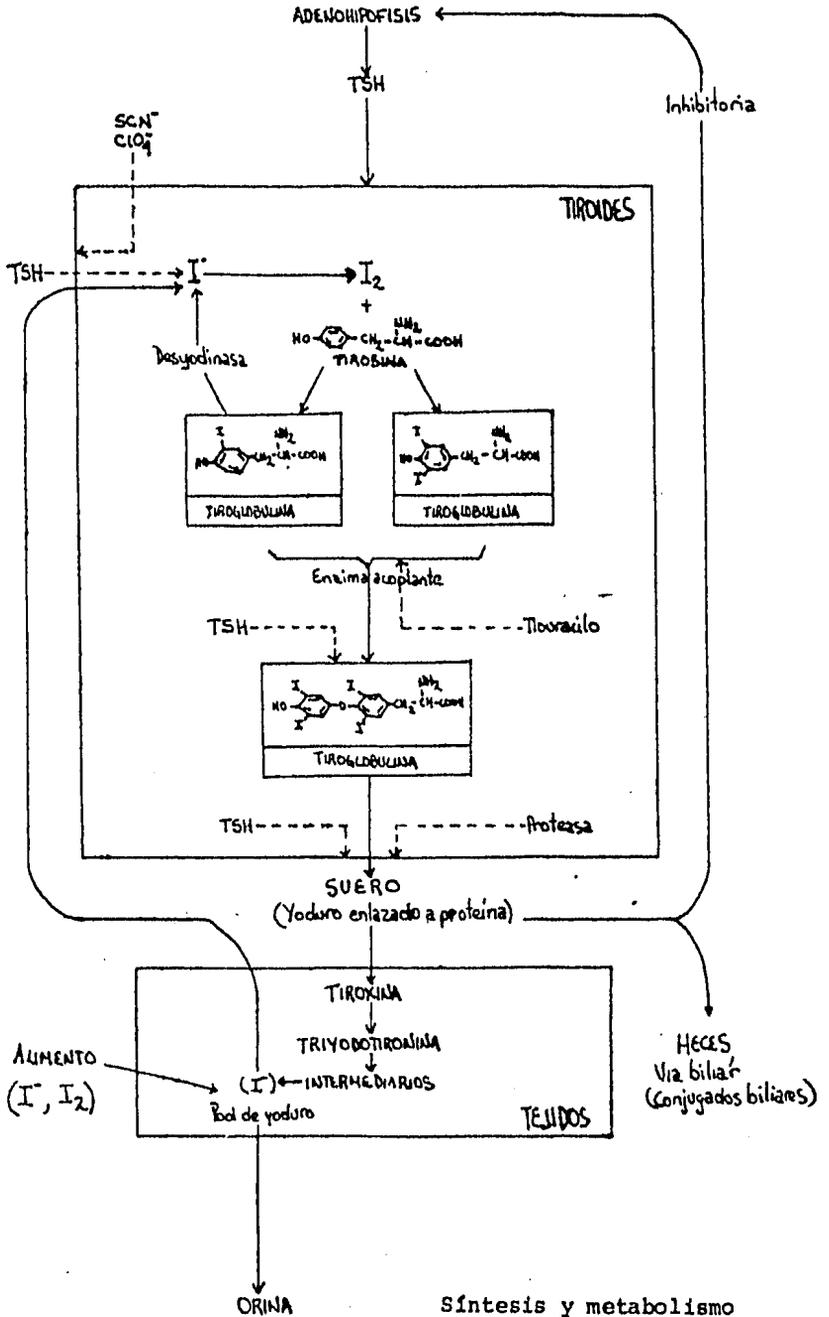
Algunas interrelaciones hormonales¹⁰

b. Mantienen la homeóstasis interna del organismo. Asimismo, como ellas se encuentran cambiando constantemente, requieren de un mecanismo regulador propio (Retroalimentación, servo-mecanismo o -feedback).

c. Con ellas se agrupan las acciones de integración de eventos fisiológicos del animal.

El estudio de las hormonas requiere mayores sofisticaciones en sus técnicas, debido a las características de ellas. Preliminarmente para establecer su formación y su metabolismo se realizan extracciones (electroforesis, cromatografía, etc), bioensayos --- (cuantificándolas, midiendo sus actividades específicas en tejidos, empleando indicadores biológicos) y finalmente se les realiza un análisis químico para determinar la homogeneidad del extracto y los métodos óptimos para obtenerlo.

La tiroides ^{5,6,7,8}, aún cuando no es una glándula esencial para la vida, su carencia origina trastornos bastantes severos. Su función se encuentra influenciada por la hipófisis (por parte de la TSH)⁶ indirectamente, por mecanismos de tipo neural que operan a través del hipotálamo (actividad del TRH ante casos de frío o calor por ejemplo). Sus productos de secreción, representados por las hormonas triyodotironina y tiroxina, varían en la forma en que se encuentran dependiendo de la actividad que ejerzan. Esto es, si no se encuentran enlazadas en torrente sanguíneo a alguna proteína ellas son fisiológicamente activas, de lo contrario sólo se encuentran circulando. Bastante son las acciones que ejercen tales hormonas (siendo que la mayoría se atribuye a la T4 por encontrarse en mayor concentración que la T3, aún cuando esta tiene una actividad mucho mayor que la otra), de las cuales podemos encontrar: (a) Su más necesaria acción es la captación, utilización y distribución del O₂ orgánico, (b) Influyen en los cambios a nivel de catabolia y anabolia proteicas: (c) Actúan en las modificaciones de las grasas tisulares y hepáticas; y (d) Afectan al peso corporal. Estas acciones son a nivel corporal, pero también se ha demostrado que ejercen cierta influencia en las actividades de otros órganos. Se ha observado que al aumentar la liberación de T4, hay un -

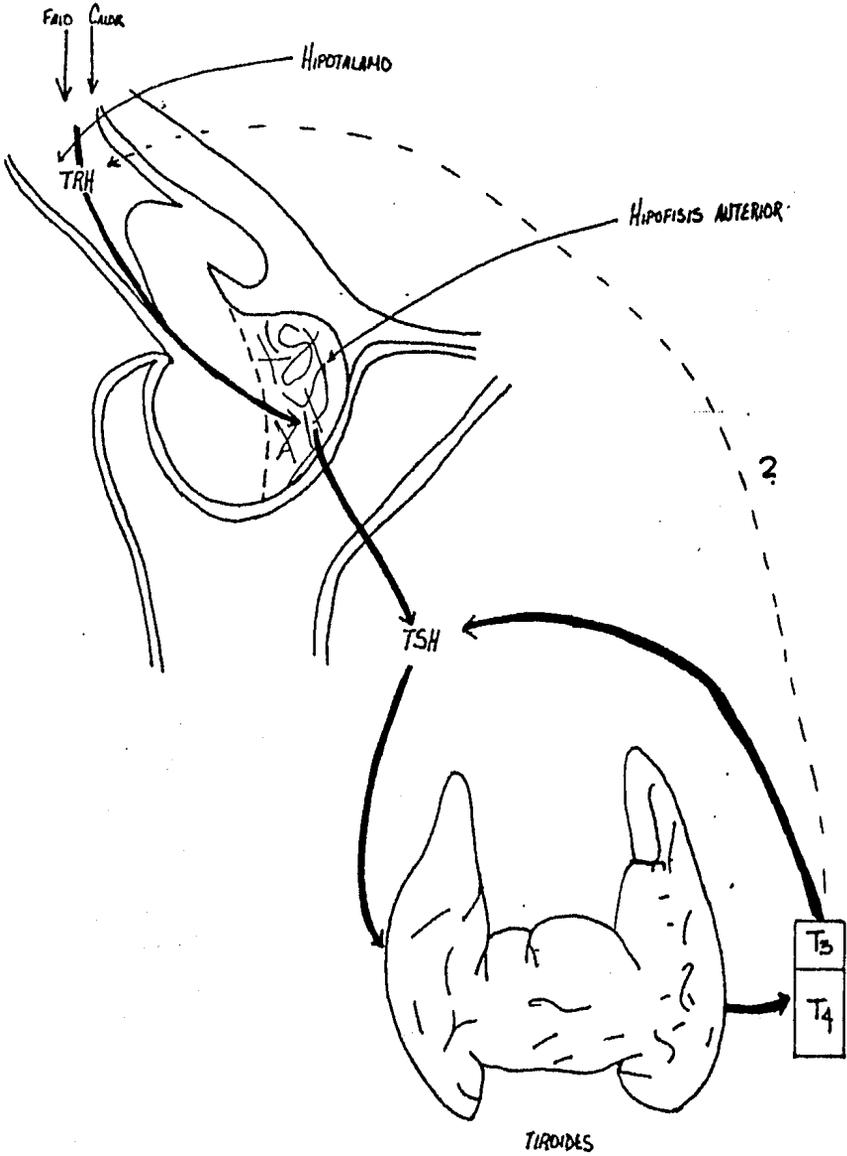


Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas^{3,7}.

aumento de la secreción de casi todas las demás glándulas endócrinas del organismo y además de la necesidad tisular de las hormonas. (P. ej. La administración de T4 acelera la secreción de glucocorticoides por la corteza suprarrenal). No es de dudarse que también se intente el establecer las posibles relaciones que la tiroides tenga con el Sistema Nervioso, por lo que se han efectuado estudios con características especiales, pero aún no se ha podido establecer que exista una relación catecolaminas-tiroides que pueda mostrar aquellos⁵.

Con estudios de hipofunción tiroidea - bien sea experimental o clínica - puede observarse como los niveles de las hormonas involucradas son insuficientes para satisfacer los requerimientos - orgánicos generales, lo que se refleja en una lentitud acentuada de los procesos corporales. Esto es explicado por una velocidad - metabólica basal y por una temperatura bajas de su nivel normal; las manifestaciones clínicas por lo consiguiente son generales^{1, 4, 8}. Dependiendo del grado de hipotiroidismo que se presente, aparte de las manifestaciones generales, existen aspectos fisiopatológicos bastante marcados^{1, 16} los que de manera común están dados por: (a) Anemia. Dada por una reducción en la velocidad de producción celular eritrocitaria; (b) Disminución de niveles de Eritropoyetina. Debido al descenso de los requerimientos de Oxígeno tisular; (c) Alteración en la integridad y función de los tejidos - con un recambio proteico elevado. Lo cual se relaciona porque la síntesis de proteínas se relaciona con los niveles de hormonas tiroideas; (d) Hay reducción en la peristalsis intestinal con el consiguiente estreñimiento; y (e) Cambios endocrinos. Manifestados a nivel de hipotálamo (TRH), corteza adrenal (Producción de ADH inapropiado causa de hiponatremia), Hipófisis (Disminución en hormonas tales como: TSH, LH y ACTH) y se ha asociado al hipotiroidismo las bajas de hormona del crecimiento, glucagon, cortisol y -- otros. Esto último predispone a hipoglucemia, se limita la gluconeogénesis al igual que la gluconeogénesis.

Otras acciones que se desatan en el hipotiroidismo, han sido demostradas por procesos experimentales empleando animales de la-



Mecanismo de Retroalimentación Negativa ^{1, 5, 8}.

boratorio y técnicas aptas a los casos (Tiroidectomías, agentes de bloqueo de enzimas o receptores, competidores metabólicos, métodos in vitro, empleo de radiosótopos, etc) y se ha podido comprobar cambios como: alteraciones de los procesos de transporte a nivel de corteza cerebral⁹, reabsorción de fluidos por el túbulo contorneado proximal², generación extratiroidea de T3 a partir de T4¹⁷ y la modulación del número de receptores Beta- adrenérgicos en varios órganos (hígado, corazón, etc)¹².

En procesos experimentales el empleo de agentes antitiroideos es usual, ya que presentan características que los hacen aptos para ello¹³: (Impiden la liberación de las hormonas, retardan la síntesis de ellas con interferencia de las reacciones de yodación, inhiben la utilización de las hormonas). Para los procesos prácticos del presente diseño experimental, se emplea un agente que interfiere con las reacciones de yodación^{3, 11, 13, 15}. La aparición del hipotiroidismo al emplear tales sustancias es retardado (hasta que la hormona transformada haya sido gastada), así como hay un incremento de TSH lo que agranda la tiroides (bocio) provocando hiperplasia vascular¹⁴. Poco es conocido acerca del mecanismo de acción de tales fármacos, pero en el caso del metimazol y otros se ha visto que actúan a nivel de la enzima peroxidasa bloqueándola, así como reducen el acoplamiento de las yodo tirosinas^{3, 15, 18, ...}. Su absorción es rápida, e inmediatamente son distribuidos y metabolizados, (por lo que se administran repetidas veces). Su metabolismo es bajo, dado que se ha encontrado con pocos derivados o intacto en orina y suero^{3, 15}.

Al establecer un diagnóstico de hipotiroidismo deben contarse con algunos conceptos importantes, en los que no sólo las hormonas tiroideas pueden afectar, sino que otras alteraciones hormonales pueden influir. Así mismo tienen que realizarse pruebas específicas para intentar establecer el tipo y la característica del hipotiroidismo^{1, 4} (Consumo de I¹³¹ tiroideo, administración de TRH, administración de TSH, determinación de metabolitos generales, otros).

Objetivos.

- Establecer la importancia del Sistema Endócrino como regulador fisiológico general. Dicho concepto será generado, mediante el conocimiento implícito en uno de los componentes de tal sistema: la tiroides.

- Se comprenderá que la regulación metabólica del organismo está totalmente influenciado por la función tiroidea, además de que una alteración a nivel de éste órgano (o aquellos afines a el) genera cambios corporales bastante marcados.

- Se entenderá que un proceso de tal magnitud, al regular; él, propiamente dicho, debe también ser controlado.

- Al presentarse una fisiopatología a determinado nivel, los cambios que se manifiesten y que sean cuatificados y/o seguidos, ayudarán a formar criterios sobre el grado de daño provocado por la lesión. Además, podrá establecerse toda la interrelación que - guarde con el organismo total. Todo esto, sentará bases en el adecuado orden de selección de determinaciones de laboratorio por - realizar.

Hipotesis.

Si la tiroides, como constituyente del Sistema Endocrino, es afectada en su funcionamiento normal; los cambios corporales físicos e internos, serán marcadamente manifiestos.

Metodología.

1. Selección de Animales.

- Se trabajará con conejos blancos de 2 a 4 kgs. de peso. Su edad variará de 2 a 3 meses. Cada animal será estudiado por equipo. Debe comprobarse que los animales se encuentren clínicamente sanos. El sexo será, de preferencia, el mismo para todos los casos.

2. Manejo de los Animales.

- Se les colocará una identificación individual mediante co-

lorante o tatuajes.

- Cada animal será colocado, de preferencia, en jaulas individuales. Cada jaula tendrá una identificación de su contenido. (Consúltese lo referente al registro de animales de experimentación).

- Al menos uno de los animales será tratado como control, los demás serán los conejos inducidos. Es recomendable el trabajar con un duplicado de las mismas características, en caso de contarse - con él.

3. Inducción.

- El proceso durará 2 semanas, este iniciará contado desde el primer día de la inducción.

- La inducción se hará diariamente, administrando 2 tabletas (de 5 mg cada una de Metimazol o Tapazol) por vía oral*. Se dará ca da tableta con un intervalo de 6 horas, por cada una.

4. Seguimiento de la inducción.

4. 1. Determinaciones Físicas.

Diariamente a todos los animales, deberá tomarseles el peso, la temperatura rectal, el ancho del cuello y además se observará su comportamiento. Estas determinaciones, al momento de recuperar sus datos, serán graficados con el fin de ir observando los cambios que se presentan al momento.

- Este calendario será aplicado tanto para los conejos control, como para los inducidos.

- Junto con este calendario, se menejará a la par: la graficación de peso, temperatura rectal y medición del cuello como se indica en la sección de resultados.

* Con la ayuda de un mortero y agua de la llave, disuelva la tableta y administre el homogenizado mediante el empleo de una jeringa de plástico.

4.2. Determinaciones séricas*.

Se cuantificarán: glucosa, colesterol, lípidos séricos, proteínas totales y albúmina. (Las técnicas se encuentran detalladas en la sección correspondiente).

Material.

Reactivos.

- Etanol al 70 %.
- Merthiolate blanco comercial.
- Acido Pícrico al 1 %.
- Reactivo para determinación de Lípidos**.
- Reactivos para determinación de glucosa**.
- Reactivos para determinación de colesterol**.
- Reactivos para determinación de proteínas totales**

Equipo.

- Mortero con pistilo.
- Agujas estériles calibre 22.
- Balanza para animales de capacidad máxima de 5 Kg.
- Balanza de dos platillos.
- Pipetas Pasteur.
- Refrigerador con congelador.
- Tripié.
- Mechero.
- Baño María.
- Termómetro.
- Tubos ensaye de 10 x 1 mm para centrífuga.
- Jeringa de plástico calibre 22.
- Jeringas de 10 ml.
- Termómetro clínico rectal (° C).
- Cinta métrica para costura.
- Centrífuga clínica.
- Frasco viales de 2 ó 5 ml.
- Algodón.
- Telas de asbesto.
- Vasos de Precipitado de 100 y 250 ml.
- Palillos de madera de 10 cms de longitud.

* Recomendamos el efectuar todas ellas al final de la inducción, es decir, se asignará una sesión sólo para determinaciones del suero. Para tal caso, los sueros serán almacenados en congelación - hasta su uso.

**Consulte la sección indicada de los reactivos involucrados para cada determinación por realizar.

Resultados.

Los datos obtenidos, para facilitar su análisis, serán manejados de la forma siguiente*:

a) Una carátula donde se especifiquen: especie animal, raza, sexo, No. de equipo, proyecto, etc.

b) En otra hoja, por separado, se trazará un cuadro con las características anteriormente mencionadas:

c) Los resultados correspondientes a las determinaciones de peso, temperatura rectal y medición de cuello, dado que serán obtenidos de manera inmediata; serán registrados en el cuadro, y a su vez, graficados*.

d) Los resultados correspondientes a las determinaciones séricas por realizar, de manera similar al inciso anterior, y posteriores a la obtención de las concentraciones** de los metabolitos implicados; serán graficados*.

e) El contenido de las hojas milimétricas anteriores, constituye lo obtenido por equipo; para efectuar la comparación de lo obtenido por el grupo, todos deberán agrupar los resultados de los conejos inducidos y de los controles y procederán a obtener los valores medios. Estos últimos serán graficados, como se especificó en los dos incisos anteriores.

Análisis de Resultados.

Proceda a efectuarlos mediante la comparación de los datos obtenidos por equipo y por grupo. Establezca los cambios notorios y comunes a todos, así como el día post-inducción.

Conclusiones.

Discuta las causas de las posibles variaciones entre unos resultados y otros, teóricamente fundaméntelos, ahonde en que otro tipo de factores o sucesos pueda ejercer influencia en el caso.

* Consúltese la sección referente a elaboración de Gráficas y tablas

** Consúltese lo referente a curvas de calibración, su registro, interpretación, etc.

Bibliografía.

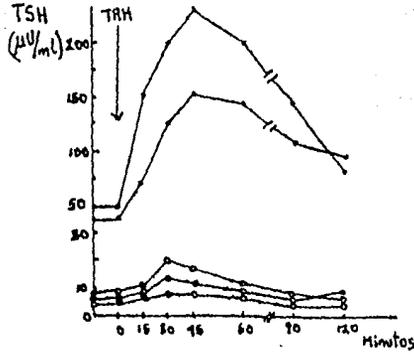
1. Blonde, L & F.A. Riddick, Hipotiroidismo Diagnóstico y Tratamiento. Tribuna Médica. Agosto 2^a, 17-22. 1980.
2. Capasso, G; J. T. Lin & R. Kinne. Lack of effect of low doses of triiodothyronine on Na⁺ - K⁺ - ATPase activity in single nephrons isolated from thyroidectomised rats. Fed. Proc. 43 (3): 633. 1984. Abstract. 2037.

Para demostrar si la reabsorción de fluidos por el túbulo con torneado, se debe a una actividad enzimática (de Na⁺ - K⁺ - ATPase) incrementada por la presencia de T3; las actividades de las enzimas fueron medidas empleando túbulos simples mediante un ensayo microcínético. Los resultados expresados como pmol de ADP generado/min por longitud de túbulo (en mm) fue:

	Control (n)	Tx (n)	Tx + T3 (n)
Túbulos proximal inicial	156.1 ± 16.8 (7)	68.8 ± 8.98 (6)	55.6 ± 6.9 (5)
Túbulos proximal final	50.3 ± 4. (9)	16.6 ± 4.1 (8)	17.0 ± 3.7 (5)

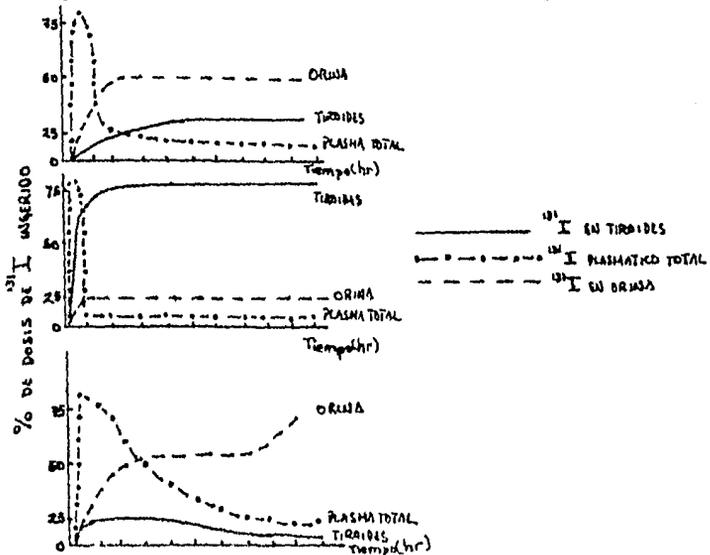
Los datos muestran que la enzima disminuye por una tiroidectomía crónica, pero la administración de bajas dosis de T3 (10 g/Kg/peso) incrementa la reabsorción de fluido. Si el estudio fuera in vivo, mostraría que bajas dosis de T3 no afectan la actividad de la enzima por un mecanismo diferente; esto, afecta directamente la estimulación del transporte tubular.

3. Cutting, Windsor C. Handbook of Pharmacology. The actions and uses of drugs. 4a. Edición, Editorial Appleton Century Crofts. USA. 1969. pp. 413-415, 147-418.
4. Danowski, T.S. Outline of endocrine-gland syndromes. 3th. Edición. Editorial The Williams & Wilkins Company. Baltimore, -- U.S.A. 1976.



Respuesta de TSH a TRH en 3 sujetos normales (círculos abiertos), 2 pacientes hipotiroideos (círculos sólidos), y un paciente hipertiroidico con TSH sérico sin detectar (línea punteada baja). El TSH sérico basal se obtuvo 15 minutos antes e inmediatamente antes de la administración de TRH. (New.Engl.J.Med. 290:886, 1974).

5. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology, 9th. Edición. Editorial Lange Medical Publications. U.S.A. 1979. pp. 242-256.



Asimilación de yodo radiactivo en sujeto eutiroides normal, hipertiroideo e hipotiroideo. Porcentajes de I^{131} administrado en tiroides, plasma y orina son colocados contra tiempo - después de una dosis oral de I^{131} . En el sujeto hipertiroideo, el I^{131} plasmático baja rápidamente, entonces aumenta en resultado de la liberación de T_4 marcada con I^{131} y la T_3 de la tiroides.

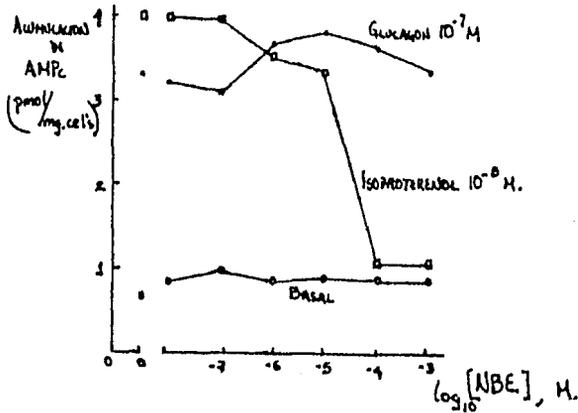
6. Guyton, A. C. Tratado de Fisiología Médica. 4a. Edición Editorial Interamericana. México, D.F. 1971. pp. 952-964.
7. Harper, H.A.; J. W. Rodwell & P.A. Mayes. Manual de Química - Fisiológica. 7a. Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. México, D.F. 1980. pp. 561-568.
8. Houssay y colaboradores. Fisiología Humana. 4a. Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975.
9. Iqbal, Z.; H. Koenig & J.J. Trout. Triiodothyronine stimulates calcium influx & membrane transport process in nerve cells & terminals of hypothyroid mouse cortex. Fed. Proc. 43 (3): -- 735. Abst: 2635. 1984.
10. Levinson, Mc. Fate. Clinical Laboratory Diagnosis. 7a. Edición. Editorial Lea & Febiger. Phylad., U.S.A. 1969. pp. 65.
11. Liberti, P. & J. B. Stanbury. The pharmacology of substances affecting the thyroid gland. Ann. Rev. Pharmacol 11: 113-142. 1971.
12. Malbon, C.G.; M. P. Graziano & G.L. Johnson. Fat cell beta-adrenergic receptor in the hypothyroid rat. J. Biol. Chem. 259 (5): 3254-3260. Marzo 10. 1984.

La metodología seguida por los autores fue:

Ratas hembras fueron hechas hipotiroideas por dieta deficiente en yodo + 6-N-Propil-2 Tiouracilo. Otras se emplearon como controles.

Se obtuvieron células grasa blanca y hepatocitos para las pruebas.

En lo correspondiente a resultados podemos ver:



La inhibición irreversible de la estimulación betaadrenérgica de acumulación por AMPc de hepatocitos de rata hipotiroidea por NBE (N-2-Hidroxi-3-(1-Naftoxil) propil N¹-bromoacetil-etilendiamina). Los hepatocitos de rata tiroidea fueron empleados en estos estudios debido a que la estimulación betaadrenérgica de la acumulación de AMPc., es más grande en hepatocitos de ratas tiroideas que las eutiroideas. Los hepatocitos de ratas fueron incubados en un buffer de bicarbonato Krebs-Ringer, conteniendo 22 mM de Glucosa y la concentración indicada de NBE por 30' a 37° C. Las células fueron lavadas 5 veces con buffer fresco, resuspendidas y mantenidas por 30' a 37° C. Las hormonas fueron agregadas como se indican, la incubación se interrumpió un minuto más tarde.

La discusión que el caso originó fue:

- Este estudio muestra las interacciones entre receptores beta-adrenérgicos y residuos de la Adenilciclasa en membranas celu-

lares grasas de rata.

- Parece que las hormonas tiroideas influyen sobre la acción catecolamina beta-adenérgica en varios loci distintos. El hipotiroidismo modula el número de receptores beta-adrenérgicos en músculo esquelético, corazón, hígado, glándula submaxilar y reticulocitos de rata, así como en eritrocitos de pavo.

13. Mc. Clung, M. y Greer, A.M. Treatment of Hypertiroidism. Ann. Rev. Med. 31: 385-404. 1980.
14. Olbrich, Th. y D. Reinwein. Bocio Benigno. Tribuna Médica. Diciembre, pp. 7-11. 1982.
15. Ross-Mc. Dougall, I. Treatment of hyper and hypothyroidism. J. Clin. Pharmacol. 21: 365-384. 1981.
16. Ruiz- Velazco y Aranzolo, G.E. Hipotiroidismo en el adulto. Medicina de Hospital. 1 (5): 29-31. 1982.
17. Silva, J.E. y colaboradores. Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal T₃ generation between euthyroid and hypothyroid rats. J. Clin. Invest. 73 (4): 898-907. Abril 1984.
18. White, A.; Handler P. y Smith. Principios de Bioquímica. Edit. Mc Graw-Hill. México, D.F. 1977. pp. 927-930.
19. Zarrow, M.X.; J.M. Yochim y J.L. Mc Carthy. Experimental Endocrinology. A sourcebook of basic techniques. Edit. Academic Press. New York, USA. 1967. pp. 1-15.

III. 5. Inducción al Estado Hemolítico.

Introducción.

Las funciones por las cuales el sistema circulatorio se considera como uno de los más importantes del organismo, pueden ser enumeradas como sigue:

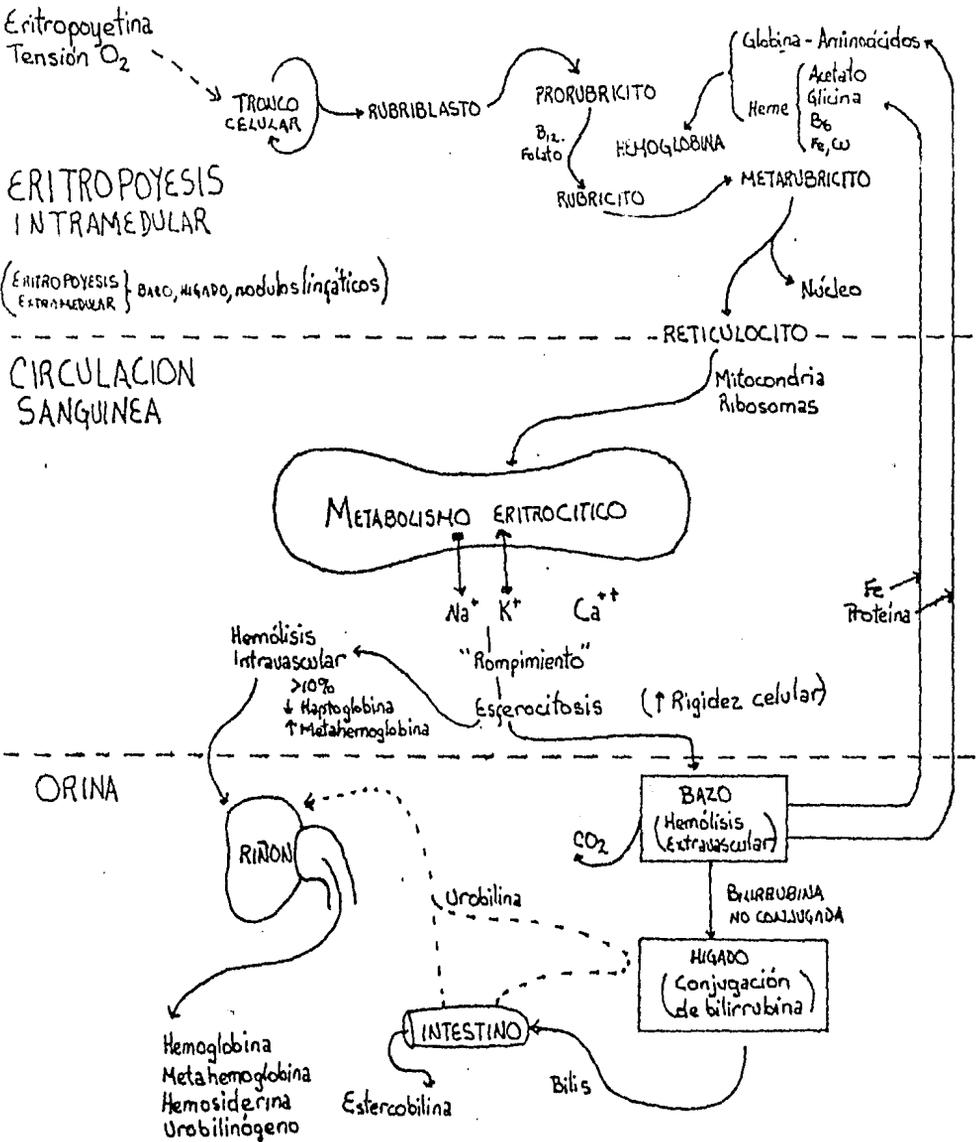
- Suplementa con sustancias absorbidas del tracto gastrointestinal (Sistema de transporte intraorgánico).
- Su función extracta es la de oxigenar los tejidos, así como de realizar el recambio de bióxido de Carbono (el cual se elimina por vía pulmonar).
- Regula la temperatura corporal.
- Distribuye las hormonas y otros agentes que controlan la función celular.

Para efectuar tales funciones, el sistema circulatorio está constituido de un fluido con características especiales para cumplir tales requerimientos (viscosidad, densidad, temperatura, pH, etc.), la sangre - nombre proporcionado a tal fluido - se encuentra influenciada por las características propias del individuo -- (edad, sexo, actividad, etc.).¹⁴

Constituyentes de la sangre 6, 10, 14

1. Eritrocitos o glóbulos rojos.
2. Leucocitos o glóbulos blancos.
3. Plaquetas
4. Plasma* (con un contenido inmenso en iones, moléculas orgánicas e inorgánicas en paso por el organismo, como transporte de otras sustancias).

* En caso de permitir coagular la sangre, el fluido remanente es lo que se conoce como suero, la diferencia del plasma, presenta deficiencia en fibrinógeno, factores de la coagulación y un elevado contenido de serotonina por ruptura plaquetaria 6,9.



Los eritrocitos y sus precursores localiza dos en vasos sanguíneos, médula ósea o lu gares extravasculares¹⁷.

En el presente modelo experimental, el constituyente sanguíneo a considerar será el eritrocito, no sin destacar que los otros también son importantes en base a su funcionamiento específico.

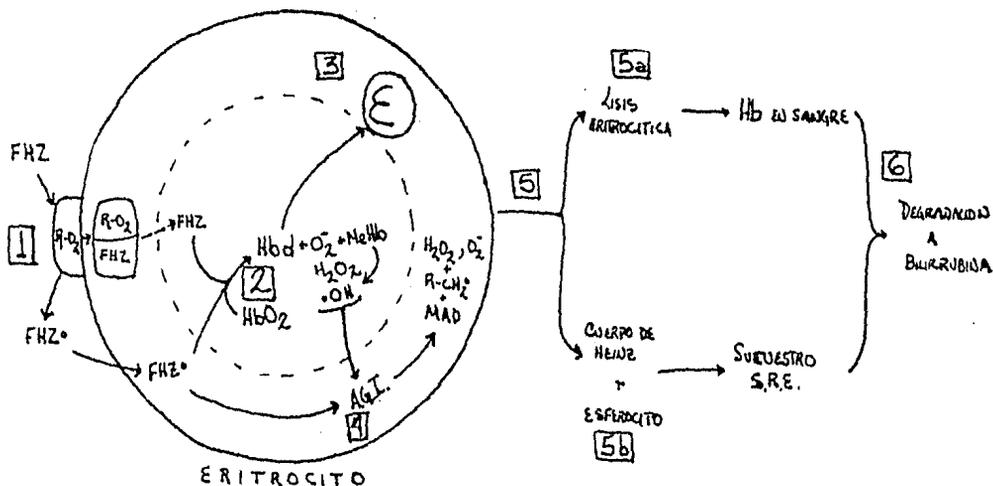
El eritrocito para cumplir con las funciones principales atribuidas a la sangre (oxigenación, viscosidad, etc), tiene que presentar características que lo hagan apto para ello: (a) Son anucleados, bicóncavos y pequeños con lo que tienen mayor superficie para el intercambio respiratorio ^{6,19}; (b) Con las propiedades de su membrana (estroma), su acceso a órganos y tejidos es más eficiente ^{8,25} (dado que adopta la forma del vaso en el cual se encuentra); (c) principalmente se constituye de agua, de un elevado contenido proteico, lipoproteínas, colesterol libre y con un ión principal: el Potasio; y (d) Presenta un complejo enzimático bastante eficaz en el mantenimiento de las continuas reacciones de óxido-reducción y otras, que mantienen en constante supervivencia al eritrocito. Como anteriormente se expuso, todas las actividades que se desarrollan en la célula roja son necesarias para la vida de la misma y como la maquinaria metabólica no puede permanecer activa durante mucho tiempo (manifiesto por un gasto energético no renovable - muy marcado), el eritrocito se destruye lentamente ⁸.

Como previamente se había mencionado, el glóbulo rojo efectúa una función vital para el organismo total; el intercambio gaseoso a nivel intracorporal. Esto es posible por estar contenida en su citoplasma una proteína compleja (Formada por cuatro subunidades, - cada una con una entidad hemo conjugada a un polipéptido) denominada Hemoglobina. Necesariamente para que tal entidad proteica funcione adecuadamente, requiere de la presencia de diversos componentes que le faciliten la tarea (y que en su mayor parte lo constituyen las enzimas respectivas), y que evidentemente el recambio es continuo; lo que produce varias conformaciones moleculares que se van alternando ^{6,8,9,24}.

Dado que los eritrocitos continuamente se están siendo producidos o degradados, es necesario que exista un sistema regulador de tal caso, y esto podría explicarse porque de no ser así se tendrían serias consecuencias. Ha sido demostrado que la Eritropoyesis ---

(generación de eritrocitos) se encuentra bajo un control de retroalimentación ⁶. La eritropoyetina; una glucoproteína circulante, es sintetizada y activada a nivel renal mediante una relación Oxígeno/Demanda, o sea, por la presión del Oxígeno reinante en el lugar. El sistema sensor ha sido demostrado que se forma de un sistema Prostaglandina-AMPC y el Oxígeno implicado ¹⁸. Para la elucidación experimental de tal secuencia, han intervenido procesos que demuestran claramente lo que ocurre: es así que el inducir con tóxicos a estados anémicos ⁴, la aplicación de sangría ¹⁹, las exposiciones a bajas presiones de Oxígeno ¹⁰, así como nefrectomías o sistemas renales mal desarrollados ⁴ indican que la presencia de la hormona es bastante necesaria; aún más, se ha podido establecer que ella es producida durante la etapa neonata a nivel hepático ¹⁹.

Mecanismo de acción de la Fenilhidrazina (FHZ) ²⁴.



FHZ = Fenilhidrazina

R-O₂ = Receptor para O₂

HbO₂ = Hemoglobina desnaturalizada

E = Espectrina (Proteína de membrana)

A.G.I. = Ácidos grasos insaturados (principalmente fosfolípidos).

SRE = Sistema retículo endotelial.

MDA = Malonaldehído.

1. Existen dos hipótesis: a) Que la FHZ se pegue a algún receptor afín al Oxígeno y sea transportada al interior del eritrocito: b) Es probable que localize lugares en las membranas y se autooxide provocando la formación de sustancias oxidantes que actúan sobre ácidos grasos insaturados^{13,18,24}.

2. Debe existir una reacción entre la HbO_2 y la FHZ que produce Hb. desnaturalizada, Metahemoglobina y algunas sustancias oxidantes^{18, 24}.

3. Por una parte, la Hb. desnaturalizada se une a la Espectrina mediante enlaces sulfhidrilo cruzados formando los cuerpos de Heinz^{11, 13,24}. Asimismo hay inhibición de la Ca^{++} ATPasa con la acumulación de Calcio intraeritrocíticamente. La MetaHb formada, lentamente se autooxida produciendo sustancias oxidantes^{3,5}, debido a mal funcionamiento de algunas enzimas importantes^{5,9,25}.

4. Por otro lado, las sustancias oxidantes dañan la estructura membranar^{7,13}. Inhiben algunos procesos enzimáticos^{3,9}. La FHZ-oxidada reacciona con los fosfolípidos^{13,18,24}. Produciendo sustancias oxidantes así como malonaldehído^{12,18}.

5. Los efectos son producidos de dos formas:

a. Por la acumulación de Calcio intracelular, así como la desnaturalización de otras proteínas membranales, se pierden las propiedades de membranas y hay lisis con la liberación de Hemoglobina²³.

b. Tanto la formación de los cuerpos de Heinz, como la rigidez del eritrocito^{20,23}, obligan a que el SRE los capture y retire de la circulación^{2, 12, 15, 17,20}. Este efecto es más vistoso en bazo durante el paso a través de los cordones esplénicos^{17,19}.

6. Durante la degradación de la hemoglobina que ha reaccionado con FHZ, se ha observado que la formación de bilirrubina es más pronunciada a nivel de bazo¹⁶.

Cuando los eritrocitos viejos, o lesionados son removidos del torrente sanguíneo, sus principales componentes son degradados, transformados o desechados dependiendo de las necesidades del organismo o del constituyente en sí. Los que vuelven a ser utilizados son los aminoácidos que componen la porción proteica y el átomo de hierro del Hem. Lo que corresponda a la porfirina libre de Hierro - se degradará a nivel del sistema retículoendotelial hepático, bazo y médula ósea. La acción de tal degradación parece realizarse a nivel de fracción microsomal por un complejo enzimático denominado Hemoxigenasa. La producción de tales enzimas es la biliverdina, que en humanos, la mayoría es convertida a bilirrubina^{6,8,10}.

El metabolismo ulterior de la bilirrubina sucede principalmente en hígado, donde sucede lo siguiente: (a) Es captada, (b) conjugada (formación del diglucuronido de bilirrubina y (c) se secretará en la bilis. Esta bilirrubina conjugada, dentro del intestino grueso, se recambiará a urobilinógeno por la acción de las enzimas bacterianas y específicas de la zona. Una parte del urobilinógeno es desechado en heces, la otra parte será resorbida (llega a el hígado) y se excretará constituyendo el ciclo enterohepático. La excreción de tal urobilinógeno, proveniente de hígado, se realiza en orina^{6,8,10,17,25}.

Dado que el presente diseño experimental se basa en los efectos producidos por un tóxico eritrocítico, podemos considerar la generalidad de las acciones en tales células. Principalmente se habla de que el ataque va dirigido contra el contenido de Hemoglobina (provocando su desnaturalización y formación de cuerpos de Heinz), así como contra la membrana eritrocítica (lo que ocasiona que pierda sus características de elasticidad, etc). Estos últimos - Los cuerpos de Heinz y las células rígidas - son marcadores que obligan a que ellos sean retirados de la circulación por el Sistema Retículo Endotelial (SRE)^{7,9,21}. Asimismo, la Hemoglobina se autooxida a Metahemoglobina y forma sustancias oxidantes muy tóxicas al eritrocito (Superóxido: O_2 , peróxido de Hidrógeno, y algunos radicales libres), sumado a esto hay que anexar los cambios producidos en el compuesto tóxico^{3,5}.

Los estudios tendientes a establecer el mecanismo con el que actúa la fenilhidrazina para provocar sus efectos, han sido variados y a la fecha sólo con el empleo de eritrocitos de humanos y animales de laboratorio^{17,19,23}, ha podido conformarse algo más específico. Asimismo, se han preparado extractos purificados de eritrocitos para tal fin^{7,21} y con el empleo de sustancias puras (fenilhidrazina, derivados supuestamente producidos, Hemoglobina) han sido estudiados para establecer lo que ocurre in vitro^{3,5,18,24} y que posiblemente sea lo que sucede in vivo.

Objetivos.

- Mediante la inducción a un estado patológico en uno de los componentes principales de la sangre, se podrá establecer la importancia que esta tiene a nivel del organismo total. El suceso podrá ser seguido mediante los cambios que resulten, en base a un control, y que serán manifestados como variaciones en algunos componentes de la sangre, así como en algunas constantes físicas (peso, tamaño, color, etc.).

- Se demostrará que la eritropoyesis, como parte esencial de la fisiología corporal, como tal se presenta. Y el hecho podrá ser medido directamente acorde a los cambios que sufren algunos parámetros hematológicos.

- Se establecerán los cambios eritrocitos resultantes, así como la secuencia con la cual actúan, se degradan y reutilizan.

Hipotesis.

Una alteración provocada a nivel de torrente sanguíneo, inducirá a cambios-tanto locales, como generales-, lo que mostrará como es que el organismo intenta remediar la situación.

Metodología.

Reactivos.

- Clorhidrato de Fenilhidrazina al 0.2 % en solución salina fisiológica.
- E.D.T.A. (sal disódica).
- Reactivo de Turck
- Colorante de azul cresilo brillante o nuevo azul de metileno.
- Solución Salina Fisiológica.
- Reactivos para la detección de Hemoglobina.
- Reactivos para la detección de urobilinógeno.
- Cristal violeta al 1% en NaCl 0.73% filtrado.

Equipo.

- Tubos capilares.
- Centrífuga (microhematocrito)
- Hematocitómetro (cámara de Neubauer, pipetas Shali, de Thomas).
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Portaobjetos.
- Microscopio compuesto.
- Balanza analítica.
- Centrífuga clínica.

Métodos.

A. Selección de animales. Se emplearán ratas blancas, de ambos sexos, adultas y con un peso promedio de 250 gramos. La cantidad de animales (control e inducidos) será de acuerdo al número de equipos de trabajo. Como mínimo habrá de trabajarse con un animal control y con 2 tratados diariamente.

B. Inducción de la Anemia Hemolítica Aguda. Esta será inducida por una simple administración intraperitoneal de cloruro de fenil-hidrazina. La dosis será de 16 mg/100 g de peso corporal. La fenilhidrazina será preparada como una solución al 0.2% en solución salina fisiológica. A las ratas correspondientes al grupo control, se les administrará por la misma vía, solamente la solución salina fisiológica.

C. Determinaciones por realizar. Estas serán efectuadas durante 5 días postinyección consecutivos. Las determinaciones para todos los animales, controles e inducidos, serán:

a) Peso del bazo. Posterior al sacrificio del animal, se expondrán las vísceras y el bazo será obtenido. Este último será lavado con solución salina fisiológica, y será colocado en un vidrio de reloj (previamente pesado) para la determinación del peso del órgano.

b) Sangre completa:

- Frotis. Se practicarán, acorde a lo estipulado en la sección de preparación de tales placas, para la evaluación de cuerpos de Heinz, reticulocitos y glóbulos rojos.

- Hematocrito en tubo capilar.

- Determinación de Hemoglobina.

- Determinación de urobilinógeno en orina.

- Conteo de células: Eritrocitos.

Para efectuar todas las evaluaciones anteriormente mencionadas, se procederá de la siguiente forma:

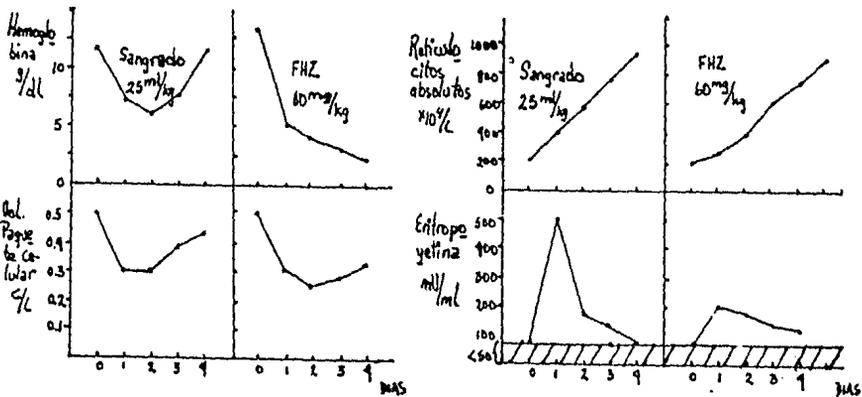
b.1) Se obtendrá, previa anestesia del animal con éter, sangre por punción cardíaca o de la cola. La sangre recuperada debe mezclarse con E.D.T.A. o bien debe desfibrinársele.

b.2) Se sobreanestesiara al animal, posterior a ello, se procederá a recuperar el bazo para su posterior evaluación.

b.3) La recolección de la orina, puede ser inducida mediante la administración intraperitoneal de 10 ml de solución salina fisiológica. Este proceso deberá aplicarse previo a la anestesia del animal.

Bibliografía.

1. Beutler, Ernest. Drug induced hemolytic anemia. *Pharm. Rev.* 21 (1): 73-98. 1969.
2. Chen, L.T. Intrasplenic microcirculation in rats with acute hemolytic anemia. *Blood.* 56 (4): 737-740 Oct. 1980.
3. Cohen, C. & P. Hochstein. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochem.* 3 (7): 895-900. 1964.
4. Erslev, A.J.: J. Caro & E. Kansu. Renal and extrarenal erythropoietin production in anemic rats. *Brit J. Hemat.* 45: 65-72. 1980.



Valores medios de concentración de Oxi-Hb, PCV, conteo de reticulocitos absolutos y título de Eritropoietina, en ratas con un simple sangrado (25 ml/kg) a una simple administración de FHZ (60 mg/kg).

Con las comparaciones realizadas entre grupo control, grupo sangrado y grupo inducido con fenilhidrazina, se observó que en el grupo sangrado hubo un título de eritropoietina inicialmente más alto que el nivel obtenido por medio de la inducción con FHZ.

Las ratas tratadas con FHZ, 2 veces por semana, mostraron también una amplia pero definida anemia.

El bazo de las ratas tratadas con FHZ siempre triplica su peso, luego de una simple inyección con FHZ; y fue encontrado de ser aproximadamente 6 veces su tamaño normal, en animales a los cuales se les dio FHZ 2 veces por semana durante 6 semanas.

La discusión del presente estudio fue:

Bajo condiciones normales, en el hombre y las ratas, la producción de eritrocitos es mantenida por una concentración de eritropoetina en el plasma de aproximadamente 10 mU/ml. Es demostrable que el secuestro y destrucción por parte de las células reticuloendoteliales, de los eritrocitos dañados, provoca una hiperplasia e hiperactividad del sistema reticuloendotelial. En el estudio presente los bazos fueron extremadamente prominentes en las ratas tratadas con FHZ, y las células hepáticas de Kupffer se incrementaron en número.

La Fenilhidrazina causa, además, hemólisis intravascular con la liberación de Hemoglobina libre, en sangre circulante.

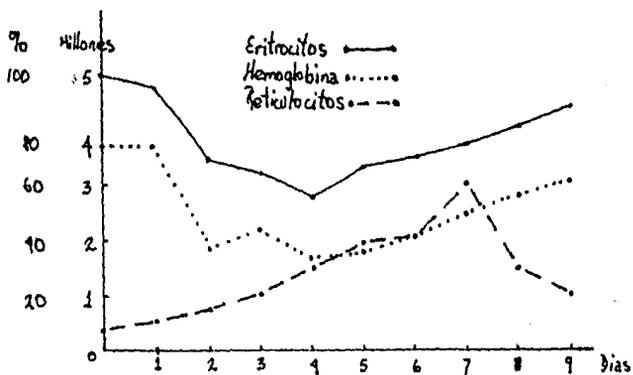
5. Ftukudo, M.H.; M. Ramachandran & G.V.N. Iyer. Methemoglobina formation and glutathione disappearance in cord blood red cells exposed to acetylphenylhydrazine. Clin. Chim. Acta. 138: 135-139. 1984.
6. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 9th. Edition. Edit. Lange Medical Publications. California, U.S.A. 1979. pp.396, 402-407.
7. Goldstein, B. D.; M. G. Rozen & R.L. Kunis. Role of red cell membrane lipid peroxidation in hemolysis due to phenylhydrazine. Biochem. Pharmacol. 29: 1355-1359. 1980.
8. Harper, H.A. y colaboradores. Manual de Química Fisiológica. 7a. Edición. Edit. El Manual Moderno S.A. México, D.F. 1980. pp 237, 266.
9. Hollan, S.R.; M. Hasitz & J. H. Sruer. Red cell membrana alterations with pathological implication. Federation of European Biochemical Societies. Ninth Meeting, Budapest. Biomembranes. Structure & Function. vol. 35, Edit. Nort-Holland/American Elsevier. Budapest, Hungría. 1974.

10. Houssay, Bernardo A. y colaboradores. Fisiología Humana, 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1969. pp 16-421.
11. Itano, H.A.; K. Hirota & K. Hokizaea. Mechanism of induction of haemolytic anemia by FHZ. Nature. 256; 665-667. Aug. 21, 1975.
12. Jain, S.K. & D. Subrhamanyan. On the mechanism of FHZ - induced hemolytic anemia. Biochem. Biophys. Res. Comm. 82 (4), 1320-1324. Jun. 29, 1978.
13. Jain, S.K.; P. Hochstein. Membrane alterations in FHZ-induced reticulocytes. Arch. Biochem. Biophys. 201 (2), 683-687. May. 1980.
14. Kimber, D.C. y C. E. Gray, Manual de Anatomía y Fisiología. Edit. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1966. pp 289-303.
15. Long, P.H. Experimental anemia produced by phenylhydrazine derivates. J. Clin. Investig. 14 (4): 329-342. 1926.

Se emplearon conejos como animales de experimentación, se les administró Cloruro de Fenilhidrazina (30 mg). Vía Intraperitoneal. Sacrificio diario de los animales.

Estudios realizados: Conteos leucocitarios, de eritrocitos, determinaciones de Hemoglobina, conteo de reticulocitos, y conteos diferenciales. Se midió la fragilidad de los eritrocitos con soluciones de NaCl y clorhidrato de fenilhidrazina. Se determinó la función hepática y el contenido de Meta-Hemoglobina y de bilirrubina. Sumado a los anteriores, se efectuaron estudios en cortes de médula ósea, bazo y nódulos linfoides, hígado, pulmón y riñón.

Ante la evaluación diaria de los parámetros anteriormente mencionados se obtuvo lo siguiente:



No hubo variación en la determinación del funcionamiento hepático, tanto para los controles, como para los animales inducidos.

La detección de bilirrubina no se pudo establecer, dado que no se encontró en plasma. Sin embargo, el urobilinógeno se encontró incrementado a los 8-9 días postinducción, ésto ocurrió a la par de la aparición de la anemia.

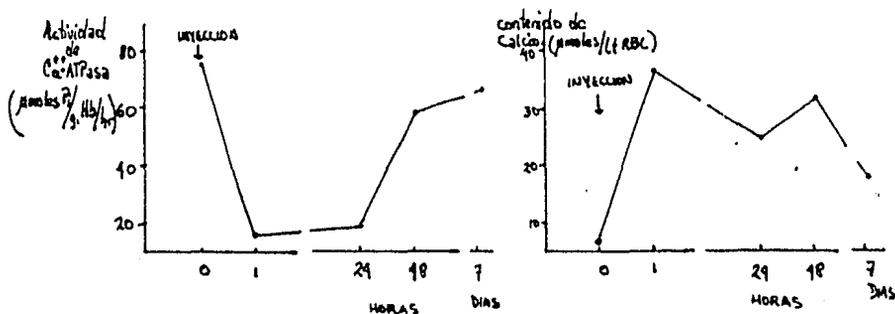
En los estudios a la necropsia se encontró que en médula ósea femoral hubo hiperplasia de los elementos eritrocíticos conforme se generaba la anemia. Hubo incremento de eritroblastos y normoblastos. Los megaloblastos se generaron hasta el 6o. - 7o. días en médulas muy hiperplásicas. Estos últimos cuerpos son la forma más temprana de los eritrocitos.

También se encontró incremento en el peso del bazo.

16. Maines, M.D. & J.C. Veltman. Phenylhydrazine-mediated induction of haem oxygenase activity in rat liver and kidney and development of hyperbilirubinaemia. *Biochem. J.* 217; 409-417. 1984.
17. Melby, Edward C. Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. III. Edit. CRC Press. U.S.A. 1974. pp 384-101.

18. Misra, M.P. & I. Fridovich. The oxidation of phenylhydrazine: Superoxide and Mechanism. *Biochem.* 15 (3): 681-687. - 1976.
19. Peschle, C. Erythropoiesis. *Am. Rev. Med.* 31, 303-314. - 1980.
20. Rice-Evans, C.; P. Hochstein. Alteration in erythrocyte membrane fluidity by PNH-induced peroxidation of lípida. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100 (4), 1537-1542. Jun. 30, 1981.
21. Rifkind, R.A. & D. Danon. Heinz body anemia: An ultraestructural study. I. Heinz body formation. *Blood.* 25 (6); 885-896. Jun. 1965.
22. Rifkind, R.A. & D. Danon. Heinz body anemia: An ultraestructural study. II. Red cell sequestration and destruction. *Blood.* 26 (4): 433-448. Oct. 1965.
23. Shalev, O; M.N. Laida; R.P. Hebel; H.S. Jacob & J.W. Eaton. Abnormal erythrocyte calcium homeostasis in oxidant-induced hemolytic disease. *Blood* 58 (6): 1232-1235. 1981.

Algunos resultados obtenidos en el presente estudio son:



Efecto in vivo de la fenilhidrazina en eritrocitos de ratón sobre su actividad de Ca⁺⁺ATPasa, y el contenido de Calcio como una función de tiempo luego a la administración.

La discusión que establecen los autoras es:

Se ha demostrado que la administración de la fenilhidrazina provoca la oxidación de la Hemoglobina intracelular y la formación de los cuerpos de Heinz. Es evidente el secuestro esplenico de éstos cuerpos, además de su posterior destrucción. Asimismo se ha demostrado que la Ca^{++} ATPasa es inhibida por una fuerte cantidad de grupos sulfhidrilo. La acumulación del ion provocará deformabilidad anormal de la célula roja, además de su acelerada destrucción. El daño ocasionado a la enzima, por presencia de la fenilhidrazina, se demuestra que es irreversible.

24. Vilsen, B. & H. Nielse. Reaction of Phenylhydrazine with oxidized Hemoglobin. *Biochem. Pharmacol.* 33 (17): 2739-2748. -- 1984.
25. White, A. Principios de Bioquímica. Edit. Mc Graw Hill. México, D.F. 1974. pp. 548-578, 753.

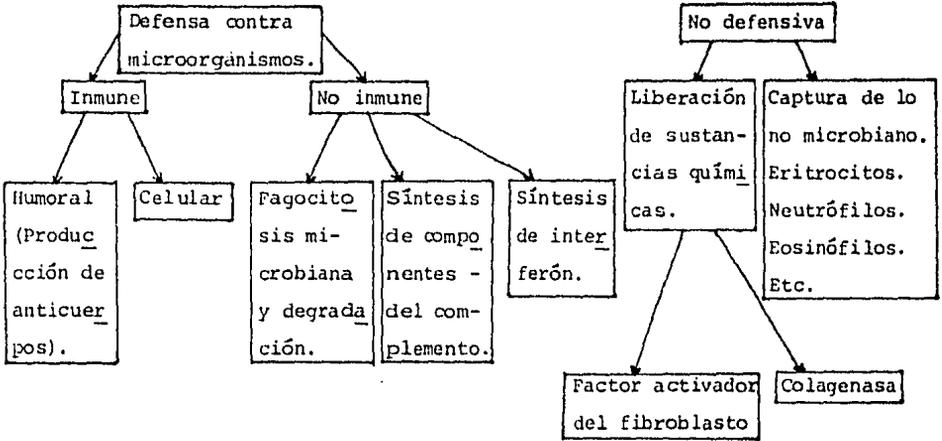
III. 6. Obtención de Macrófagos Alveolares.

Introducción.

Aparte de conducir el aire a los pulmones, el sistema de pasajes respiratorios cumple con procesos definidos de purificación del mismo aire inspirado. Funciones tales como calentar o enfriar el aire con algunos de ellas, pero las más importantes son las que se establecen en el mecanismo de "Limpieza" y, que comprende; a) - la utilidad de secreciones bronquiales con sustancias capaces de - ayudar a resistir infecciones y a mantener la integridad de la mucosa, b) la capacidad de los vellos nasales en la detención de partículas (mayor a 10μ de diámetro); c) al igual que los vellos, la capacidad de emplear por parte del organismo, las características físicas corporales (curvatura hacia los pulmones por los conductos gaseosos y enfrentamientos a tonsilos y adenoides por parte de las partículas extrañas), d) En las paredes de los bronquios, dado - que los pasajes son más pequeños, las partículas de un tamaño aproximado de 2 a 10μ quedan retenidas. Y, que posteriormente debido al mecanismo ciliar, son removidas las partículas, e) Finalmente, las partículas menores a 2μ de diámetro que generalmente alcanzan los alveolos, son ingeridas por Macrófagos y acarreadas a los nódulos linfoides.⁶

Los Macrófagos alveolares juegan importante papel en los 2 - mecanismos anteriores mencionados (El aclaramiento mecánico de partículas y la habilidad de montar una respuesta inmune)¹¹ y, que de alguna manera sus funciones e interacciones complejas con otros - componentes de los pulmones, queda determinada como se ilustra en la siguiente figura².

Funciones del Macrófago Pulmonar.



Funciones de los Macrófagos alveolares. Los Macrófagos alveolares llevan a cabo funciones defensivas y no defensivas en los pulmones. Las funciones defensivas de los pulmones pueden ser divididas en aquellas que son enlazadas y aquellas que no lo son al sistema inmune. Estas células son verdaderas fábricas bioquímicas².

Los Macrófagos son grandes células fagocíticas y están exactamente descritas por su nombre, el cual implica gran (macro-) trágón (phago-). Son más grandes que los neutrófilos, y presentan una apariencia menos distinta y tienden a establecerse en la parte interior del tejido hasta que sus actividades fagocíticas causen que su citoplasma se haga más prominente. Ellos pueden ingerir una gran variedad de materiales particulados o celulares, a los cuales usualmente degradan por digestión lisozómica. Estas células no se destruyen a sí mismas como lo hacen los neutrófilos; sus enzimas actúan ya sea dentro de vacuolas citoplasmáticas o dentro del tejido luego de una liberación atraumática a través de la membrana celular.

Los Macrófagos son altamente móviles, respondiendo a varias sustancias químicas que influyen en su rango y dirección de movimientos¹⁷.

Dada la gran importancia que éstas células muestran, aquellos procesos que impliquen purificación, caracterización y cuantificación de las mismas, han sido ampliamente desarrollados desde mucho tiempo atrás. Los modelos de estudio han sido muy variados, encontrándose desde el hombre, y animales grandes (monos, etc), hasta pequeños animales de laboratorio (hamster, rata, conejo); siendo a estos últimos a los que se les ha dedicado mayor atención, y con ellos se han perfeccionado muchas técnicas.

De las formas de aislar Macrófagos, las técnicas difieren en muchos pasos, pero en todos se obtienen de manera satisfactoria. - Pueden emplearse desde digestiones de pulmón (en HCl y Tripsina) y posteriores pasos de limpieza y purificación⁹, hasta simples lavados pulmonares con diferentes soluciones (solución salina fisiológica, buffer de fosfatos, medio de cultivo RPMI 1640 c/lidocaína 12 mM., suero fetal de ternero, etc)^{7,9,13}; y aún más, se han establecido diferentes procesos de purificación: adherencia a placas^{5,7}, gradientes continuos-discontinuos de Ficoll^{8,9} y filtración⁴.

Objetivos.

- El alumno comprenderá que todas las funciones fisiológicas de un órgano dado, se hayan en igual orden de importancia dependiendo del fin al que ellas sean dirigidas. Además de que la necesidad de cada una de esas funciones, se origina en el hecho de que el órgano establece una interrelación con todos los demás que conforman el organismo, para que éste último sea capaz de desarrollarse sin problemas en el medio que lo rodea.

- Se establecerá que a la par con la fisiología del intercambio respiratorio, llevado a cabo por el pulmón, el proceso de purificación del aire que contiene el oxígeno, es igualmente eficaz a lo largo de la acción de respirar. Y además, que una anomalía en dicho aspecto de purificación, incurrirá en una serie de situaciones fuera de lo normal que afecte al organismo en su totalidad.

Hipotesis.

En el proceso de purificación del aire que ingresa a los pulmones, debe existir un mecanismo biológico capaz de no sólo retener, sino de destruir, transformar o inactivar a cualquier partícula ajena que se encuentra en dicho medio.

Metodología.

Material.

Equipo.

- Rata blanca de 200 a 300 g de peso.
- Estuche de disección.
- Cánulas de polipropileno para intubar, a) una de 0.1 cm de diámetro; b) Accesorio para drenado pediátrico de líquidos en venas.
- Pipetas Pasteur de talla corta.
- Pipetas de Thomas.
- Cubreobjetos.
- Centrifuga clínica.
- Autoclave.
- Pipetas serológicas graduadas de 1 ml y 5 ml.
- Tubos de centrifugación Eppendorf.
- 4 Cajas de Petri de Plástico de cms de diámetro.
- 3 Matraces Erlenmeyer de 25 ml.
- Jeringa desechable (estéril).
- Incubador o estufa para cultivos.
- Baño María.
- Centrifuga Eppendorf de 15,000 RPM.
- Vortex.
- Cámara de Newbauer.
- Portaobjetos.
- Balanza analítica.
- 2 Frascos ampula con capacidad de 80 a 100 ml.
- Refrigerador.
- 10 tubos de ensaye de cm de largo y cm de diámetro

Reactivos.

- Anestál (Pentobarbital sódico).
- Clorhidrato de Lidocaina (polvo 5g).
- Ficoll 400 (5 g.).
- Cloruro de Sodio Q.P.
- Sulfato de Bario.
- Azul de Tripiano (polvo).

- Colorante de Wright (polvo).
- Et-OH. absoluto.
- Colorante de Giemsa (para diluir) al 1%.
- Suero humano normal fresco (1 ml).
- Barniz transparente para uñas.
- Tinta china.
- Metanol absoluto.
- Na H₂ PO₄ anhidro.
- Levadura comestible de pan.
- Resina Sintética en tolueno al 40 %.

Métodos.

Preparación de Soluciones.

Solución Salina Fisiológica (SSF).

Na Cl Q.P. 0.85 g.
H₂O Destilada 100.00 ml.
Disuelva completamente .

Solución de Lidocaina 12 mM.

Clobhidrato de Lidocaina ... 32.49 mg (P.M. 270.81).
H₂O Destilada 20.0 ml
Disuelva completamente.

Solución de Sulfato de Bario coloidal (1 %).

El Ba SO₄, tamaño partícula 0.1 a 0.3 m., es preparado por diálisis para 2 días en H₂O destilada.
Sulfato de Bario (dializado) 1.00 g.
S.S.F. 100.0 ml.

Solución de Ficoll 400. (densidad = 1.047).

Ficoll 400 3.9333 g
H₂O Destilada 50.00 ml.
Es importante el que la solución tenga la densidad recomen
dada. Si no es así, deberá ser ajustado.

Solución de Azul de Tripano.

Azul de Tripano 2.0 g.

H₂O Destilada 100.0 ml.
Centrifugar 10' a 1500 RPM. Recolecte sobrenadante, deseche sedimento. Un volumen de 0.5 ml del sobrenadante se adiciona a . 1 ml de la suspensión a ser contada. En conteo celular se realiza inmediatamente luego del mezclado.

Tinción de Wright.

(Consultar tema correspondiente a técnicas).

Opsonización de Levaduras⁵

1. Pesar 10 g de levadura comestible de pan y disgregarla en 250 ml de S.S.F.
2. Dejar sedimentar las partículas gruesas o centrifugar a 1 000 RPM 5 minutos.
3. Recolectar el sobrenadante rico en levaduras finas y centrifugar a 2500 RPM 10' minutos.
4. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con 50 ml de SSF., centrifugar a 2500 RPM. 10'.
5. Repetir el paso anterior 2 veces más.
6. Resuspender el sedimento en 50 ml de SSF.
7. Envasar la suspensión en un frasco ampula de 80-100 ml y esterilizar a 15 lb de presión durante 15 minutos.
8. Tapar y sellar la suspensión de levadura, en condiciones de esterilidad para su conservación al refrigerador.
9. Depositar una alícuota de 0.25 ml de la suspensión de levadura en un tubo de ensayo.
10. Centrifugar a 1200 RPM, 3 minutos.
11. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 0.25 ml de suero humano normal fresco.
12. Incubar 30 minutos a 37°C.
13. Centrifugar 1200 RPM, 3 minutos.
14. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón en 5 - ml de SSF.
15. Centrifugar a 1200 RPM, por minuto.

16. Repetir los pasos 14 y 15, 4 veces más
17. Resuspender finalmente en 1 ml de SSF y contar la suspensión de levadura.

Obtención, purificación, identificación y pruebas para macrófagos alveolares^{7, 11, 17}.

1. Se administrará una sobredosis de Pentobarbital Sódico, por vía intra-peritoneal (Dosis 60 mg/Kg peso).
2. Se coloca al animal boca arriba y se fija la cabeza. El área anterior a la laringe se enjuaga con alcohol, se remueve la piel, así como la cobertura y tejidos, que están sobre la tráquea. (Habrá de tenerse cuidado de no dañar los vasos sanguíneos adyacentes).
3. Expuesta la tráquea, con la punta de la navaja -- del bisturí, se hace una pequeña incisión del diámetro de la cánula en una de las divisiones cartilago - cartilago (Habrá de evitarse la fragmentación de la tráquea).
4. La tráquea será canulada empleando un tubo de catéter intravenoso de corta longitud (diámetro interno: 1 mm) equipado con los accesorios para inyección intravenosa pediátrica; la cánula se introducirá firmemente, hasta sentir un tope a ella.
5. El fluido de lavado comprende Solución Salina Fisiológica (la cual fue usada como diluyente del clorhidrato de Lidocaína para que ésta última sea 12 mM), el fluido de lavado con Lidocaína, se precalienta a 37° C - antes de su empleo. Cinco ml del fluido son cuidadosamente depositados dentro del pulmón por medio de una jeringa; 3 minutos después, el fluido es lentamente sa cado. (3-4 ml), y 2 subsecuentes lavados de 3-4 ml habrán de ser colocados una vez más.
6. Si se ha encontrado dificultad para recobrar el fluido instalado, se debe tener cuidado de no aplicar un exceso de presión negativa con la jeringa, lo que dañaría los pulmones. Para evitar esto, la tráquea deberá ser

extendida suavemente mientras se drena una poca de solución de lavado, lo que por lo general elimina cualquier bloqueo. Otra alternativa, es introducir un mililitro más de fluido, en el pulmón, lo que es igualmente efectivo.

7. Los fluidos de lavado son enfriados. Esto se puede hacer mediante la recolección del fluido en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. sumergido en baño de hielo (con el fin de evitar la adherencia de los Macrófagos al vidrio).
8. Una vez colectado el volumen total del fluido de lavado. Este es colocado en tubos de centrifuga Eppendorf, - y se aplica una centrifugación de 15, 000 RPM. durante 1 minuto a temperatura ambiente; el sobrenadante obtenido es desechado (con empleo de una pipeta Pasteur), - y el paquete celular será resuspendido en Solución Salina Fisiológica.
9. La viabilidad se comprueba mediante la exclusión de azul de Tripano (ver preparación de soluciones del modelo - presente).

Purificación de Macrófagos alveolares.

Puede llevarse a efecto mediante dos procesos: (a) Empleo de una gradiente de densidad continuo y (b) por un simple proceso de adherencia.

(a) Purificación por gradiente de densidad continuo y discontinuo^{8,9,15}.

a. 1. Resuspendido el paquete celular (Posterior a los procesos de obtención), a éste le son agregados 2 ml. de $BaSO_4$ coloidal al 1% los que al ser ingeridos por los macrófagos, facilita la separación de ellos), y se coloca en una estufa con temperatura de 37° C durante 10 minutos.

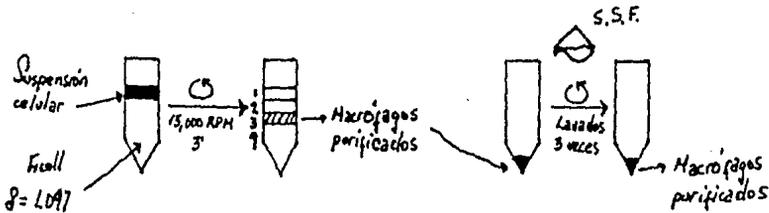
a. 2. Pasado el intervalo de tiempo mencionado anteriormente, los tubos son centrifugados una vez más a 15 000 RPM., durante 1 minuto, y el sobrenadante es desechado.

a 3. Se agrega 1 ml de SSF, se resuspende el paquete con empleo de un vortex, y se repite el proceso de centrifugado. Efectuado lo anterior; se enfría la suspensión celular a 4° C, y se repite la operación de centrifugado 3 veces más.

a 4. Se resuspende el paquete celular en un volumen de aproximadamente 0.2 ml de SSF. y parte de esta suspensión (con ayuda de una pipeta Pasteur) es capeada sobre 1 ml de Ficoll (Densidad = 1.047) en el tubo eppendorff**

a 5. La mezcla es centrifugada a 15000 RPM durante 3 minutos.

a.6. Con la ayuda de una pipeta serológica de 1 ml graduada, se procede a fraccionar el contenido del tubo de 0.25 en 0.25 ml. (de arriba hacia abajo)***. Con ello se establecen 4 bandas. La 3er. banda corresponde a la fracción donde se hallan purificados los macrófagos alveolares.



** Al capear la suspensión celular sobre el Ficoll, la pipeta Pasteur debe estar pegada a la pared del tubo y sobre el menisco del gradiente. Coloque la suspensión Celular muy cuidadosamente, de tal manera que se genera otra capa (no mayor al 1% del volumen total del tubo) sobre el Ficoll. Coloque los tubos en la centrifuga muy suavemente.

***Recuperar las fracciones en tubos de ensayo, prepare un frotis y tíñalos. Establezca la banda de purificación óptima.

(b) Purificación por proceso de adherencia^{5,7}

Este proceso puede ser utilizado como purificación, o ser la continuación del llevado a cabo por el gradiente continuo-discontinuo de Ficoll.

b.1. Puede ajustarse la suspensión celular a una concentración de 10×10^6 macrófagos/ml.

b.2. Depositar 0.1 ml de suspensión celular en 2 cajas Petri de 5 cms de diámetro (de plástico), conteniendo sendos cubreobjetos, y adicionar también 2 ml de SSF. Homogeneizar.

b.3. Incubar 1.5 hrs a 37°C en atmósfera parcial de CO₂.

b.4. Oscilar las placas de Petri, para remover las células no adherentes, y aspirar la SSF sobrenadante usando un Pipeta Pasteur. Repetir 5 veces cada paso.

b.5. Eliminar las células no adherentes agregando 2 ml de SSF o solución salina al 0.85%, pH 6.8 - 7.0, oscilando las placas durante 1 minuto y aspirando el líquido del lavado con la pipeta - Pasteur.

b.6. Secar al aire dejando los cubreobjetos en posición casi vertical, con la superficie conteniendo las células hacia adelante.

b.7. Fijar las preparaciones con Metanol absoluto durante 3 minutos (lo cual puede omitirse).

b.8. Dejar secar las preparaciones y posteriormente teñirlas con colorante de Giemsa o Wright durante 10 minutos, o con colorantes de Leishman, teñiendo las preparaciones durante 5 minutos; - lavar después con buffer y dejarlo actuar durante 3 minutos.

b.9. Lavar las preparaciones con agua corriente, dejarlas secar al aire y montarlas sobre portaobjetos (con resina)*** para su observación al microscopio.

*** La forma de montaje, se realiza de la siguiente manera:

Pruebas para Macrófagos alveolares.

Prueba de Fagocitosis (con Levaduras).

De la técnica anteriormente seguida para purificación de Macrófagos seguir hasta el paso 5.

6. Adicionar 2 ml de una suspensión de levadura opsonizadas ajustadas a una concentración de 2.5×10^6 levaduras/ml

7. Incubar durante 30 minutos a 37° C.

8., Repetir los pasos 4 y 5. Con esto se eliminan las levaduras no fagocitadas.

9. Retirar los cubreobjetos con una pinza de extremos finos - y sumergirlos en solución salina contenida en 3 frascos seriados, agitando los cubreobjetos ligeramente en cada frasco.

10. Continuar con pasos 6, 7, 8, 9 del anterior.

1. Sobre el frotis, dependiendo del subreobjetos a emplear, se coloca una línea gruesa de resina. Lo mismo se hace a la porción media del cubreobjetos.

2. Se coloca el cubreobjetos con resina, sobre la línea hecha en el frotis, haciendo que coincidan las dos, y se deja esparcir a la resina a lo largo y ancho del cubre y portaobjetos. Puede ayudarse lo anterior, haciendo una ligera presión (muy cuidadosa) con el dedo, sobre un papel filtro, hasta que quede toda el área completamente llena. Se deja secar unos dos minutos.

3. Posteriormente, con barniz, se sellan los bordes del cubreobjetos. Una capa es colocada sobre la porción final de la placa, en la que se haya el frotis, y se anota con tinta china: No. placa, tipo de frotis, fecha y quien la realizó.

Bibliografía.

1. S.A. "Quantitative study of virus propagation". *Virology*, 2: 533, 1956.
2. Cohen, A.B. Lung Metabolism: Cell. Lung cell biology. Fed. Proc. 36 (1): 2636-2636. Nov. 1979.
3. Cohen, A.B. Lung Metabolism: Potential adverse effects of lung macrophages and neutrophilum. Fed. Proc. 38 (12): 2644-2647 No. 1979.
4. Davies P. y colaboradores. A Method for the collection of alveolar macrophages for microscopy. *Am Rev. Resp. Dis.* 116 (6): 1113-1115. Dic. 1977.
5. Depto. de Inmunología ENCB - IPN Manual de prácticas de Inmunología básica y clínica. IPN. ENCB. 1980. Paq. 95-96.
6. Ganong. W.F. Review of Medical Physiology. 9th. Edition Ed. Lange Medical Publications. California. USA. 1969. Pag. 508.
7. Holt, P.G. Alveolar Macrophages. I. A simple Technique for the preparation of high numbers of viable alveolar macrophages from small laboratory animals *J. Imm. Meth.* 27, 189-198 1979.
8. Kikkawa, Y. and K. Yoneda. The type II epithelial cell of the Lung I. Method of isolation. *Lab. Invest.* 32: 295-302. 1975.
9. King, R.J. Utilization of alveolar epithelial type II cell for the study of pulmonary surfactant. Fed. Proc. 36 (12), - 2637-2643. 1979.
10. Lehrer, R.I., y colaboradores. Fungicidal activity of rabbit alveolar and peritoneal macrophages against C. albicans - *Infect. Immun.* 28, 1001. 1980.
11. Moølenbeek, C. Obtaining alveolar macrophages from small laboratory rodents *Lab. Anim.* 16: 56-58. 1982.
12. Myles A. ; D. Golstein and L. Triner. Technique of endotracheal intubation in rats. *Lab. Anim. Sci.* 32 (1): 78. 1982.
13. Myrvik, Q.N. y colaboradores. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procure them in high state of purity. *J. Immunol.* 86; 128-132. 1961.

14. Nguyen B.Y. Differences in phagocytosis and killing by alveolar macrophages from humans, rabbits, rats and hamsters. *Infect. Immun.* 36 (2): 504-509. Mayo 1982.
15. Patterson - Delafield, y colaboradores. Preparation of rabbit alveolar macrophages in high purity and yield. *J. Immunol. Methods.* 38 (3-4): 291-294. 1980.
16. Stossel, T. P. Isolation and properties of phagocytic vessels II. Alveolar Macrophages. *J. Clin. Invest.* 51: 605. 1972.
17. Widman, F. K. *Pathobiology. How Happens.* Ed. Little Brown and Company Inc., U.S.A. 1978. Pag. 23.
18. Zeligs, B.J.; L.S.Nerurkar & J.A.Bellanti. Maturation of the rabbit Alveolar Macrophage during Animal Development III. - Phagocytic and Bactericidal Functions. *Pediat. Res.* 11: -- 1208 - 1211. 1977.

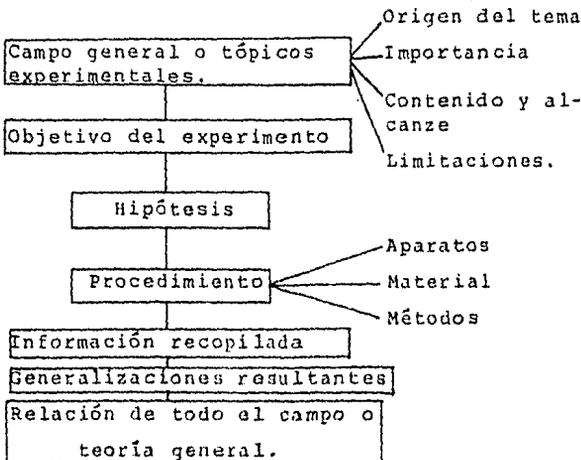
Capítulo IV. Apéndice 1. Recopilación de datos.

Para elaborar una adecuada investigación, experimental o bibliográfica, debe de estructurarse un orden adecuado. Por lo anterior podemos dividir dicho orden en cuatro importantes sucesos¹.

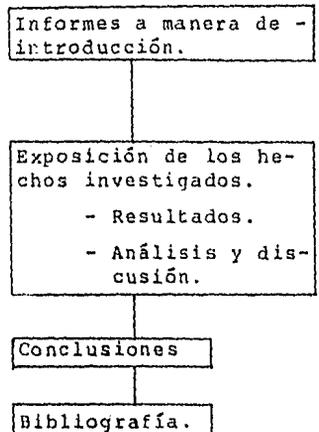
A. plan de trabajo o diseño de la investigación. Se basa en varios puntos: (a) Determinar los fines de trabajo; (b) Señalar las diferentes partes del problema, a través de plantear con claridad las ideas que se tienen acerca de él; (c) Seleccionar el procedimiento adecuado para realizar la investigación y (d) Prever el tiempo y el orden de desarrollo de las diferentes etapas del estudio - (con lo que se ahorrará tiempo, se evitarán esfuerzos nulos y mal orientados, puede valorárseles previamente al trabajar con él y podrá presentarse a la aprobación del responsable).

Este diseño preliminar puede ser establecido si se guía uno por lo siguiente: (a) Revisión de la literatura. Con ésto solo debe entenderse lo que el tema trata, no es un análisis exhaustivo de ella; (b) Tratamiento del problema. Ya se puede uno orientar hacia un tema específico, con ello se limita ya al trabajo; (c) Ordenamiento del tema. Con ello es posible seguir un orden en el trabajo que ha de realizarse, lo cual facilita la búsqueda correcta de la información. Por ejemplo.

Para informes científicos o médicos



Para reportes, informes y tesinas.



(d) Señalamiento de las fuentes preliminares a investigar y (e) Elaboración del cronograma de actividades. Con el podrá ser expresada la relación de la actividad de la investigación, estableciendo el tiempo en que podrá ser ejecutada.

B. Recopilación del material. En este punto debe ser destacado que la fuente de recabación de datos lo conforman la biblioteca y la hemeroteca. Cada una presenta características bien definidas- (Consultar la fuente original) que facilitan su manejo. En la biblioteca podrá contarse con todo aquél material que refuerze un tema específico (libros, enciclopedias, diccionarios, bibliografías - de bibliografías de un tema especial, etc.); lo que a diferencia de la hemeroteca, es que en ésta última, la información básicamente - está mas actualizada pero diferida en material muy especializado- (por lo que hay que tener un orden en la selección de un material dado, así como en su clasificación y estudio). Es recomendable el hacer uso de tarjetas o fichas bibliográficas y de trabajo en los - dos tipos de consulta.

C. Ordenación y análisis de datos. (a) Ordenación. Conjuntamente con el diseño, se compara si se han cubierto todos los aspectos a tratar. En caso de algo diferente, el esquema (o la información) deberá ser cambiada; (b) Análisis. Con ello puede encontrarse deficiencia en el material recopilado, lo cual implicaría que - hay que rebuscarlo; (c) Vaciado de datos. Inicia por la redacción - preliminar (todo lo que se ocurra en el momento, debe de ser anotado), posteriormente se anexarán las notas de pie de página, las referencias bibliográficas, las fuentes, etc. En este último punto - pueden hacerse uso de asteriscos o numeración progresiva. La bibliografía puede ser colocada completa al final del trabajo, mientras - sólo se puede escribir el autor y las características de la revista o libro (Autores, título del artículo, título de la revista, volumen, número y páginas, año).

D. Exposición de los datos. Posterior a lo que involucra el vaciado de datos (que de contarse con las reseñas de las fichas de trabajo se facilitará mas dicho vaciado)⁵, puede empezarse a darle forma al trabajo final. El trabajo se conforma principalmente de 3 partes: Introducción, cuerpo y final. Siempre deberá iniciarse por la parte central o cuerpo (Ampliar, sintetizar y relacionar). Pos-

teriormente habrán de escribirse las conclusiones y elaborar los apéndices, gráficos, cuadros, tablas, bibliografía general e índices alfabéticos. Por último, habrá de redactarse lo concerniente al contenido, prólogo, introducción y -si no se ha hecho- colocar el título definitivo del tema; esto es debido a que es hasta el final del estudio, en que se está en la posibilidad de conocer y comprender el tema.

Recabación de la información.

Al emprender una búsqueda de la información, ya sea bibliográfica o hemerográfica, debe tenerse en cuenta que existen métodos que hacen de tal búsqueda menos dificultosa, más rápida y con la mejor canalización hacia el tema buscado. Para ello, es importante el tener presentes los siguientes sistemas de recopilación de la información.

Recabación de la información^{2,3}.

I. Abstracts (resumen, síntesis o sumario).

Estos son definidos como "El resumen de una publicación o artículo acompañado por una adecuada descripción bibliográfica, la cual permite a la publicación o artículo el ser analizado".

Los resúmenes han sido diseñados de la forma siguiente:

- (1) El título del artículo (en el lenguaje original y/o inglés).
- (2) Nombres y direcciones del lugar donde laboran los autores.
- (3) La referencia bibliográfica. a) El nombre de la publicación abreviada en forma estándar; b) el número del volumen (opcionalmente el número emitido); c) el número de páginas incluidas en el estudio y d) el año.
- (4) El cuerpo del resumen.
- (5) Opcionalmente el nombre de quien resume, el número de -- ilustraciones, el número de referencias en caso de abstracts de artículos revisados.

Existen cuatro tipos de resúmenes (abstracts): a) De título expandido (sólo se da una idea del contenido); b) Resumen (Abstract) -

indicativo; c) Resumen o sinopsis y d) Resumen informativo (donde se establecen los principales argumentos y se dan los datos principales del artículo original).

Los siguientes son algunos ejemplos de abstracts comúnmente empleados:

Biological Abstracts.

- Este es el tipo de revista mas utilizado en la recabación de la información.

- Su edición es quincenal.

- Es muy útil para ciencias biológicas en campos no clínicos.

- Cada abstract está enumerado consecutivamente desde el inicio de cada volumen.

- Cada edición contiene un listado de libros y revistas nuevos.

- Para facilitar la búsqueda, los índices de materia por palabras claves y por autor, son presentados y acumulados mensualmente.

Bioresearch Index.

- Es un índice que para presentar un artículo lo hace mediante palabras clave. Estas están relacionadas al tema que se busca.

- Aquí se incluye el material no resumido en el Biological Abstracts.

- Se destacan documentos de conferencias, de revistas registradas y semipopulares, bibliografías, reportes anuales de organizaciones, reportes gubernamentales selectos, etc.

Chemical Abstracts.

- Su edición es semanal.

- Cada edición está dividida en secciones. Las correspondientes del número 2 al 20 están relacionadas con la bioquímica.

- Al igual que en Biological Abstracts, existe el índice de autor y el índice por materias mediante palabras clave("Subject - Key Word").

- Las secciones de bioquímica, dentro del Chemical Abstracts, cuentan con sus propios índices y por lo consiguiente son mas informativos y mejor comprendidos.

- De preferencia habrá de ser leída la introducción en los índices Annual o Cumulative Indexes.

Bulletin Signaletique.

- Es una revista editada en los idiomas francés e inglés.
- También se encuentra clasificada por secciones, de las que de interés para el área bioquímica son: La sección 12 (de bioquímica y biofísica), la 13 (Farmacología y toxicología), 15 (patología).
- El título del artículo se encuentra en su lenguaje original.
- Su principal desventaja, es lo limitado en el contenido de los abstracts.

Excerpta Medica.

- Su edición es mensual.
- El idioma en que está presentado es el inglés.
- Los índices de autor, no solamente están publicados mensualmente, sino que también lo están anualmente para cada sección.
- Aquí puede ser encontrado un índice por tema, éste índice se publica anualmente para cada sección.
- Los abstracts de cada sección están numerados consecutivamente desde el inicio de cada volumen.
- Los abstracts descritos aquí tienen un carácter mas informativo y son de mejor calidad.

Index Medicus.

- Su publicación está en el idioma inglés.
- Aún cuando las publicaciones se encuentran mensualmente, posteriormente pueden ser consultadas anualmente en sus Cumulated Index anual. Uno de los volúmenes (editados dos al mismo tiempo) es el índice de autores, el otro lo es para los distintos temas. El nombre de este volumen anual es Cumulated Index Medicus.
- Los títulos están dados con citas bibliográficas y se encuentran colocadas bajo un número de títulos de materias.
- Para cada título de un artículo dado, le son puestos tantos títulos le sean apropiados.

Science Citation Index (SCI).

A este tipo de recuperación de la información se le ha definido como "Compilación de referencias citadas, bajo cada una de las cuales hay una lista de documentos en las que han sido mencionadas anteriormente"

- Aquí las referencias están citadas y clasificadas en secuencia alfabética, por lo que está colocado el nombre del primer autor. En caso de existir varias del mismo, éstas están citadas cronológicamente.

- Hay un enlistado alfabético en donde están mencionados aquellos autores que han citado una referencia específica, así como detalles bibliográficos de los artículos de aquellos autores.

- Respecto a una publicación mencionada mediante el index en su totalidad, es posible encontrar que artículos la han referido.

- Una vez obtenidas las referencias deseadas, sino fuera posible conseguir el artículo original, éste será localizado por los índices de autores en Biological Abstracts, Chemical Abstracts, etc.

- Cuando uno tiene la palabra clave sobre una técnica particular o un método dado, es posible el seguir la pista de los perfeccionamientos recientes a tal suceso; esto último representa otra de las utilidades del mencionado SCI.

Current Contents.

- Este es un tipo de información activa y rápida.

- Trabaja mediante la fotoduplicación de los índices de las revistas (las cuales en su mayor parte se encuentran en estado de prueba de página).

- Cuando sea consultado este tipo de servicio, dentro del área, es recomendable el revisar las ediciones correspondientes a "Life Sciences".

Catálogo de Publicaciones CONACYT.

- Es de gran utilidad, dado que en él son mencionadas todas aquellas publicaciones que se encuentran dentro de la República Mexicana.

- Aquí está destacado en que lugares del país habrán de ser

consultadas las referencias necesitadas.

- Por otro lado, se informa desde que fecha se encuentra dentro del país una publicación en especial. Asimismo, está enfatizado que volumen y/o número de la revista serán hallados.

- Su empleo es indispensable posterior a la consulta de los índices, abstracts o revisiones; con ello es posible establecer la bibliografía con la que se cuenta de momento. Esto último implica que no todas las publicaciones contenidas en los sistemas de información mencionados, se encuentran en el país.

Catálogo de Publicaciones UNAM.

- Su función es similar a la efectuada por el catálogo del CONACYT, la diferencia está establecida en que solo son mencionadas aquellas publicaciones que se encuentran dentro de la UNAM en sus diferentes centros (Institutos, Facultades, Escuelas, etc.).

II. Revisiones.

- En su mayor parte los constituyen los títulos como: Annual Review..., Advances in ..., Progress in ...

- Su edición generalmente es anual, aunque en ocasiones, son publicadas de manera irregular.

- Dentro del área, los mas recomendables son: Biological Reviews y Quarterly Review of Biology, Physiological Reviews, Annual Review of Biochemistry, Annual Review of Physiology...

III. Fuentes de datos. (Datos, técnicas e información de fondo).

- De acuerdo a las necesidades de la investigación, tenemos:

(a) Fuentes de datos para sustancias puras, tales como; Handbook of Chemistry and Physics (R.C. Weast, Chemical Rubber, Cleveland, Ohio); Lange's Handbook of Chemistry (McGraw-Hill). (b) Para sistemas biológicos: Data for Biochemical Research (R.M.C. Dawson y col. Oxford UP); Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry (Longman Green); Kirk & Othmer's, Enciclopedia of Chemical Technology (Interscience). (c) Índice y compendio de drogas o sustancias activas en fisiología: Merck Index of Chemical and Drugs (Merck, Rahway, N.J.). (d) Enciclo

pedias y diccionarios de Biología: Encyclopaedia Britannica (Encyclopaedia Britanica. Inc., Chicago); Encyclopaedia Americana (Americana Corporation, New York); Chamber's Encyclopaedia (George News. LTD, - London). (e) Para bioquímica y Biofísica: Analytical Biochemistry (Para métodos bioquímicos y técnicos); secciones experimentales de muchas revistas de bioquímica; Methods of Biochemical Analysis (D. Glick. Interscience); Methods in Enzymology (S.P. Colowick & N.O. Kaplan, AP.).

Sugerencias para investigar la literatura³.

1. Para establecer un buen entendimiento respecto a un tema dado, y que se necesite profundizar un poco, es mejor leer primero los tratamientos mas generales (p.ej. Las enciclopedias).

2. Se puede adquirir un grado de conocimiento mas detallado, mas completo y amplio en un texto del área. Por lo consiguiente, es deseable en este punto revisar el fichero de la biblioteca o aquellos libros de bibliografías (los cuales dan referencias de algunos textos referentes al tema).

3. Debe ser revisado algún artículo en alguna revista, la cual se especialize en la publicación de revisión anual. Estos pueden proveer orientación y referencias claves.

4. Habrán de ser consultadas aquellas revistas apropiadas, - obtenidas de abstracts o índices, trabajando a fondo; hasta lograr una cobertura adecuada.

5. Deberán ser leídos artículos originales y actualizados. De preferencia aquellos que no han sido resumidos.

- Siempre que sea revisado un artículo, es necesario el tener presente que éste contendrá referencias de trabajos anteriores al tema; y así, puede hacerse una investigación de fondo, escogiendo - las referencias mas adecuadas.

- Cada ocasión que sea consultado un artículo, la forma de - conservar la información (o de tomar notas, además de hacer los índices), es mediante el adecuado manejo de las fichas bibliográficas.

Bibliotecas y Hemerotecas. Bajo éste título se trata de dar a conocer, o reafirmar, aquellos lugares dentro del área metropolitana de la Ciudad de México, en donde puede ser obtenida la información

deseada.

- Biblioteca Nacional. Cuenta con el mayor acervo de libros en el país. De cada libro publicado en México, se envían ahí dos ejemplares. Este lugar se encuentra localizado en la Ciudad Universitaria.

- Hemeroteca Nacional. Es la mas completa que existe en México, en lo que a publicaciones se refiere. Depende de la UNAM y se encuentra dentro de la Ciudad Universitaria.

- Centro de Información Científica y Humanística de la UNAM. En este lugar pueden ser consultados los índices y abstracts adecuados a los temas que se pretenden estudiar. La ubicación está en la Ciudad Universitaria.

- Centro de Documentación del CONACYT. Su ubicación es en la Ciudad Universitaria.

- Bibliotecas y Hemerotecas de: ENEP Iztacala, Facultad de Química, Instituto de Química, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, CINVESTAV del IPN, etc.

Bibliografía.

1. Baena, P.G. Instrumentos de Investigación. Manual para elaborar trabajos de investigación y tesis profesionales. Edit. Editores Mexicanos Unidos S.A. México, D.F. 1983.
2. Bottle, T.R. & H.U. Wyatt. The use of Biological Literature. 2nd. Edition. Edit. Butter Worths & Co. London, England. 1971.
3. Brigh, W.E. An introduction to scientific research. Edit. Mc Graw-Hill Book Company. Inc. U.S.A. 1952.
4. Garza, M.A. Manual de técnicas de investigación para estudiantes de ciencias sociales. 3a. Edición. Edit. El Colegio de México. México, D.F. 1981.
5. González, R.S. Manual de Redacción e investigación documental. 2a. Edición. Edit. Trillas. México, D.F. 1983.

Capítulo IV. Apéndice 2. Manejo y marcaje de animales de laboratorio.

Introducción.

Por razones de ética moral, etc.; no pueden realizarse estudios en el ser humano con experimentos que alteren los estados normales, por ello es justificable y necesario el empleo de animales de experimentación. Para ello existen varios tipos de especies animales involucrados (ratones, ratas, conejos, cuyes, puercos, etc.), pero todos y cada uno de ellos son empleados en función del estudio que se desee efectuar. Particularmente cada animal presenta características definidas (De anatomía, metabolismo, hábitos de reproducción, status genético, etc.) lo que ha determinado patrones de selectividad de cada uno de ellos. Esto es, si el caso fuera seleccionar animales para investigación (Monos, puercos, perros, ratas, etc.) éstos serían diferentes de los empleados para la rutina biológica (pruebas de diagnóstico, para sustancias terapéuticas, etc.) en donde en su mayor parte emplean conejos, ratas y ratones.

Aun cuando con los anteriores conceptos se intente justificar el empleo de los animales de experimentación, a nivel mundial, los conceptos son muy diferentes (sobre todo en lo que a la protección de ellos se refiere). Tal es el caso, que en algunos países es necesario el tener un permiso del gobierno para efectuar estudios con animales. En otros, mediante información, se invita a evitar tal actividad usando como medidas alternativas técnicas de cultivo de tejidos, simulaciones por computadora, algunos estudios directos en el hombre, o en su defecto; minimizar al máximo el número de animales empleados en los experimentos (a los cuales hay que darles el mayor trato humano posible)³.

Manejo de animales de laboratorio. La rata.

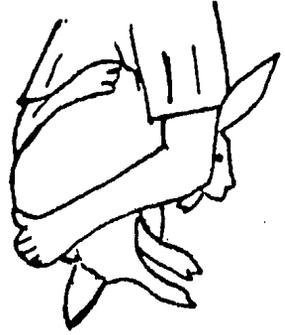
Existen varias formas del manejo de estos animales²:

a) Captura en la jaula. Con una mano se toma la cola del animal y con la otra se sujeta la piel del cuello, con esto el animal

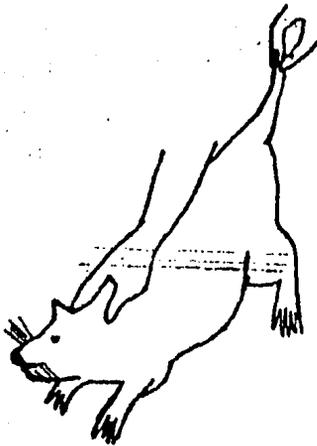
MANEJO DE ANIMALES



Conejo



Conejo



Rata

no puede atacar y queda inmovilizado⁵.

b) Manejo. Lo mejor es tomar a los animales, por su dorso, con la palma de las manos y con los dedos índice y pulgar rodear el cuello (Las patas delanteras deberán plegarse cruzándolas sobre la barbilla). Como el animal no puede mover la barbilla no muerde y si el proceso es realizado correctamente, no se causará asfixia en él. Hay que evitar el apretar el cuerpo, de lo contrario el animal tendrá serias dificultades respiratorias.^{2,5} Para prevenir los posibles arañazos es recomendable el empleo de guantes.

Si lo que habrá de realizarse es el transporte del animal de un lugar a otro, puede inmovilizársele "abrazándole" con los dedos anular, meñique y pulgar de una sola mano (Con los dedos índice y medio aprisione el cuello). La cola habrá de ser sujeta con la otra mano. (Evitar el tomar la cola por una punta, ya que lo que se provocará es que esta se le desprenda). Por lo tanto habrá de tomarla en la base de la misma).

Con esta última manera de sujetar al animal, es más sencillo el inocular sustancias por las vías intraperitoneal e intramuscular.

Habrà de evitar el que siempre se traslade al animal sujeto por la cola (lo que es diferente en el caso del ratón), ya que por más pronto o lento que se haga, ella trepará sobre su cola preparada a morder².

Cuando lo que se requiere trabajar necesite del manejo de la cola de la rata, existe un método llamado de restricción² y éste es muy comúnmente empleado cuando lo que se requiere es administrarle inyecciones en las venas o para la obtención de sangre. La rata, sin anestesiar, es colocada sobre una toalla o franela. Se dobla la tela sobre el cuerpo del animal, dejando la cola fuera de ella, y se enrolla al animal. Deberá asegurarse que la tela no se desenvuelva, y sobre todo que las patas traseras estén firmemente sujetas. Con tal operación las ratas pueden ser manejadas por horas sin peligro para ellas.

c) Anestesia. Es común que al trabajar con ratas, o ratones, haya la necesidad de anestesiarnos. Esto último ayuda a la administración de fármacos, obtención de sangre vía punción cardíaca, etc.

La anestesia será establecida en función del tiempo de manejo del animal, y puede ser obtenida de la forma siguiente:

- Manejo por corto tiempo. Se logra mediante la anestesia con éter o cloroformo. El empleo del éter es preferible en todos los tipos operativos de duración corta y en éste punto se puede hacer uso de una mascarilla. En caso de no contar con tal implemento, deberá emplearse un recipiente de vidrio al que previamente se le ha adicionado un trozo de algodón empapado del solvente. Dado que éste último proceso es derrochador de éter y consume -- tiempo, la mascarilla facilita tal caso; su simple diseño consiste en un alambre delgado con la forma de la trompa del animal y con un trozo de gasa fijado al extremo de la mascarilla con papel adhesivo. Colocada la mascarilla en la cabeza del animal se alcanzará el estado anestésico en 2 ó 3 minutos. En caso de que el animal se empiece a recuperar, sólo es cuestión de adicionarle unas cuantas gotas de éter a las gasas. Su principal contraindicación es el establecimiento de una infección respiratoria. Como esta infección proviene de la excesiva formación de moco, éste puede ser disminuido por la administración de 1/4 de gramo de sulfato de atropina por cada 100 gramos de peso corporal por la vía intramuscular.

- En caso de requerirse anestesiarnos por largo tiempo, esto puede lograrse mediante la administración de pentobarbital sódico o Nembutal sódico (4 a 6 mg/100 ml, por cada kg. de peso corporal).

Manejo de animales de laboratorio. El conejo⁵.

Este es un animal muy nervioso y requiere de un manejo con cuidados especiales.

Muy importante es que no se les sujete por las orejas, ya

que se les lastima muy seriamente.

En el caso de las hembras lactantes, cuando lo requerido es el manejar sus gazapos y para evitar que no los aborrezcan sus madres, es necesario el acariciar a estas últimas previamente a la toma de las crías. Estos animales recién nacidos son posteriormente impregnados con el olor de las conejas. Pueden emplearse para el caso soluciones aromáticas con lo que se impregnará a ambos.

Existen dos formas correctas de manejar los conejos:

1. Con la mano izquierda se suspenden de la piel floja, de la región del dorso arriba de las espaldillas, y con la mano derecha se les sujetan las patas. De ésta forma se les puede examinar, manejar, etc., sin que se les lastime.

2. Con la mano derecha se sujeta la piel floja de la región dorsal, comprendida entre los dos miembros anteriores y el cuello. Posteriormente, con el brazo y la mano izquierda, se inmoviliza al animal. Es muy útil éste proceso cuando se cambia de jaulas a los animales, o, se llevan a otro sitio dentro de la misma zona.

En caso de requerir palpar, castrar y sangrar conejos; deberán tomarse, con una mano, sus dos extremidades anteriores y, con la otra, se sujetarán las posteriores. Las extremidades anteriores deberán estar colocadas por detrás de las orejas del animal. Hecho lo anterior se localiza la región sobre la que vaya a realizarse la punción.

Marcaje de animales^{1,2}.

La identificación de los animales de experimentación, empleando marcajes, reviste una gran importancia en los estudios a realizarse. Todos los marcajes deben ser identificables y de fácil aplicación sobre el animal y éstos deben permanecer a todo lo largo del experimento. Las marcas de identificación pueden ser: permanentes o temporales. En caso de los marcajes temporales habrá que revisarse regularmente la presencia de los mismos, éstos

tipos de identificaciones son útiles en experimentos de corto tiempo, pero para estudios de términos largos (o para formación de camadas) habrán de utilizarse los marcajes permanentes.

Marcas temporales. El método mas simple es el de marcar a la caja donde se coloca a los animales. Una tarjeta con la información experimental se coloca al exterior de esta. El caso es adecuado cuando se tienen alojados de manera individual a todos los animales. El peligro latente en tal caso, es que puede perderse la tarjeta o de que sea mal colocada durante la transferencia de los animales a cajas limpias. Por ello, es recomendable que junto con el marcaje de las cajas, se identifique adecuadamente a todos los animales. Para estos últimos, las marcas en su cuerpo pueden hacerse con tinta india, colorantes (verde malaquita, cristal violeta, safranina y ácido picrico), tatuajes en las orejas, bandeado de nuca y piernas, o corte de pelo en determinadas regiones. La tinta y los colorantes son rápidamente aplicables y pueden permanecer por varios días o semanas. Similarmente, un mechón cortado de cabello, puede proveer una buena marca durante una semana o dos, dependiendo de la velocidad del crecimiento del cabello. Los tatuajes con número en las orejas son convenientes, pero no pueden ser considerados permanentes dado que los números en algunos casos se vuelven ininteligibles (por rascado, mordedura, etc). De aplicarse éstos últimos, deberá comprobarse constantemente que se encuentren, con lo que se evitará la pérdida de los mismos. El tatuaje deberá ser aplicado de preferencia en la base de la oreja cercano a la cabeza del animal.

Marcas permanentes. Los marcajes naturales, en algunas especies de animales, proveen una identificación permanente. Existen otras formas de identificar a los animales tales como: (a) Marcaje a fuego. Se aplica un hierro calentado eléctricamente sobre la piel del animal. Las curas de las áreas quemadas proveen una cicatriz entendible. Su manejo es mas común en animales grandes tales como chivos o borregos. (b) Punción de la oreja. Es una forma fácil y rápida para la identificación de animales de laboratorio (Ratón, rata, cuye y hamster). Generalmente es un corte

en forma de pequeña cuña en "v" en el borde de la oreja. Si se realizaran varios cortes, el lugar puncionado tendrá que ser sumergido en desinfectante con lo que se minimizará la propagación de agentes infecciosos. Cuando se realiza el corte, es común emplear un instrumento afín al caso; se coloca entre las superficies del mismo, los lugares de la oreja a ser separados, y mediante un firme apretón se realiza el corte y se retira la pequeña sección de la oreja. Deberá evitarse el que el animal se mueva, con lo que éste tendrá que ser anestesiado o sujeto firmemente con inmovilización de su cabeza. En el empleo de ésta forma de identificación, ya han sido establecidos algunos sistemas de numeración, con lo que pueden conseguirse números desde el 1 hasta el 99. En caso de requerirse de otros números mayores, otros procesos serían empleados para ello, por ejemplo: - el corte de dedos. (c) Corte de dedos. Generalmente se realiza cuando el animal es un recién nacido, lo que a diferencia de las punciones, es que ellas son aplicadas al destete. Cuando se hace amputación del dedo del pie, deberá ser iniciado de izquierda a derecha; el número de camada quedará marcado en la oreja derecha, el número individual estará indicado en la oreja izquierda. (d) Tatuaje. Aunque anteriormente fué mencionado que el proceso no puede ser considerado como permanente, en algunos casos éste puede ser aplicado como si lo fuera. Su aplicación puede estar ubicada en cualquier parte del animal, generalmente ésta se realiza donde el crecimiento -- del pelo o la pigmentación de la piel no oscurezcan la marca. Para los conejos, el tatuaje es mas fácilmente efectuado en las orejas; la cabeza tendrá que ser inmovilizada firmemente. Si posteriormente, luego de aplicar el proceso, se coloca tinta china o india sobre la zona (dado que se hacen pequeñas punciones por agujas del aparato) - el tatuaje puede ser realmente útil, y esto porque la piel sanará - sobre los hoyos llenados con tinta.

Bibliografía.

1. Garvey, S.J.; N.E. Cremer y D.H. Sussdorf. Methods in Immunology. 2nd. Edition. Edit. W.A. Benjamin Inc. U.S.A. 1977.
2. Griffith, J.Q. y E.J. Farris. The rat in laboratory investigation. 2nd. Edition. Edit. Hafner Publishing Company. New York,

U.S.A 1971.

3. Flecknell, A. The relief of pain in laboratory animals. *Lab. Anim.* 18; 147-160. 1984.
4. Lane, P.W. *Animals for Research*. Edit. Academic Press. London, England. 1963.
5. Oteiza, F.J. *Manejo de animales*. Textos Universitarios. UNAM. México, D.F. 1971.

IV. Apéndice 3. Toma de Muestras.

Introducción.

Para efectuar determinaciones que nos ubiquen en lo que sucede en un sistema fisiológico dado, es necesario el obtener alguno de los diversos fluidos corporales que circulan, o que se encuentran en los animales sometidos a experimentación. Por lo que es útil el conocer las diferentes técnicas a utilizar dependiendo del caso (Tipo de especie animal y de fluido a estudiar). Dentro de los fines perseguidos en el presente manual, sólo lo referido a plasma, suero o sangre completa, será tratado. Asimismo la aplicación, tanto a rata como conejo, serán las que se encuentren involucradas en las explicaciones posteriores.

Rata. Punción Cardíaca^{1,2,3,4}.

Material y equipo.

1. Rata de aproximadamente 200 gramos de peso.
2. Eter etílico para anestesia.
3. Tubo de centrifuga estéril de 13 x 100 mm, con tapa de papel aluminio.
4. Jeringa estéril de 1 ml. (De tuberculina o insulina).
5. Aguja estéril, calibre 24-26 de una pulgada de longitud.
6. Recipiente cerrado. Por ejemplo, un desecador o un vaso de precipitados de 300 a 350 ml. Asimismo, para mantener la anestesia, se requiere de un vaso de precipitado de 50 ml.
7. Si no es posible contar con un sujetador de animales, puede ser suficiente la ayuda de un asistente.

Proceso.

Nota: Debido a la fragilidad estructural característica del músculo cardíaco de la rata, el realizar punciones sucesivas sin ruptura, requiere de alguna experiencia. En caso de no contar con tal situación, el sangrado del plexo retro-orbital (posteriormente descrito), es lo recomendable.

1. Se agregará una pequeña cantidad de éter a un trozo de algodón. Luego, éste último será colocado en el fondo del recipiente.

Efectuado lo anterior, el animal es introducido dentro del recipiente y se colocará la tapa. Pasados algunos minutos el animal habrá perdido la conciencia.

2. Inconsciente, el animal, será sacado y colocado en posición supina sobre el sujetador. En caso de contar con el auxilio del asistente, éste extenderá al animal y lo mantendrá fijo. En este punto tendrá que ser controlada la anestesia aplicando el envase (o la mascarilla, dependiendo del caso) sobre la nariz del animal. Habrá de evitar el que se aplique una sobredosis, para ello hay que considerar los signos físicos correspondientes a la anestesia quirúrgica (Pérdida del reflejo palpebral, relajación muscular, etc.).

3. Con el dedo índice y el pulgar de la mano izquierda (el pulgar sobre el lado derecho de la rata), el operador localizará el corazón en el punto de máxima palpitación (cercano a la 4a, 5a y 6a costillas).

4. Habiendo localizado el corazón, la zona a puncionar será limpiada con alcohol al 70%.

5. Tomando la jeringa con el pulgar y los dedos índice y medio de la mano derecha, la jeringa será empujada lentamente dentro de la cavidad torácica (esto, en la zona del mayor punto de palpitación), en un ángulo de aproximadamente 45° a lo largo del eje del cuerpo de la rata.

Al sentir el corazón en la punta de la aguja, la jeringa deberá ser empujada, una vez más. Hay que evitar el puncionar demasiado para no traspasar el corazón (Lo que puede ser controlado, si luego a la punción, la jeringa se mueve acorde a las palpitaciones al dejarla libre). Si lo que se hubiera penetrado es el ventrículo derecho, la sangre fluirá algo lenta; pero si el que se ha tocado es el ventrículo izquierdo, la sangre subirá rápidamente a la jeringa. De acuerdo a la velocidad con que esté subiendo la sangre a la jeringa, esto limitará la recuperación de la misma, por lo que hay que tener cuidado de ir sacando el émbolo lo más precavidamente posible. Si lo que se puncionara fuera una aurícula, la sangre fluirá bien, sino sucede así, la aguja tiene que ser retirada y reintroducida un poco más retirado al punto que se puncionó por vez primera. En caso de que la salida de sangre sea a borbotones, esto indica que sólo ha sido puncionada una vena más grande, o que se ha traspasado al -

corazón.

5. Ha sido visto que el empleo del método, bien efectuado, proporciona aproximadamente 5 ml. de sangre en 20 segundos. Cantidades de sangre sobre el 4% del peso corporal, han sido obtenidos sin efectos serios sobre el animal. Asimismo, la obtención de 5 ml de sangre, en ratas maduras, y semanalmente por 3 meses; no provoca daño alguno o aparente; o en su caso algún efecto adverso, para el animal.

Punción de la cola^{1,2,3,4}.

Este es uno de los métodos mas comúnmente utilizados. La técnica es satisfactoria cuando sólo son requeridos pequeños volúmenes de sangre (p.ej. 1.5 ml).

Generalmente se punciona alguna de las venas de la cola, no im portando el lado. Para aplicar éste proceso, no es necesario el anestesiarse al animal.

Al efectuar la punción, lo primero que habrá de hacerse, es limpiar perfectamente la cola. Con ello se facilitará la visualización de las venas.

Las etapas a seguir, son:

1. Colocar al animal en un recipiente, previamente calentado, a una temperatura soportable a la mano del operador. O bien, la cola puede ser sumergida en agua a 45°C durante un minuto. Si la vasodilatación se prefiere realizar aplicando algún solvente, habrá que friccionar vigorosamente la zona a puncionar con una mezcla de alcohol al 70% y xilol. En caso de emplear por separado las soluciones; luego de haber untado el xilol, éste deberá ser removido con una gasa mojada en alcohol (porque de lo contrario, es posible que se presenten reacciones inflamatorias y posteriores infecciones en la zona).

2. Contando con una adecuada vasodilatación. La vena puede ser cortada (Distancia de 1 mm. o 2, en corte longitudinal), y la sangre será recolectada por goteo libre o con el empleo de una aguja del calibre adecuado. Si lo que se ha empleado es una jeringa con aguja de tuberculina, ésta última tendrá de calibre 22 a 24 y una longitud de media pulgada. Si la recolección se aplica con la

ayuda de la jeringa, la succión habrá de ser lo mas lenta posible ya que de lo contrario se aplicaría una presión negativa en la vena, lo que motivaría una éstasis sanguínea con nula recolección posterior.

Cuando no se desea mas, la recolección de sangre, se ejercerá una presión sobre el punto de sangrado con una gasa durante el espacio de un minuto. Si es posible, la zona habrá de ser sellada con una pieza de colodión o parafilm. Las punciones podrán ser repetidas varias veces si se observaran las condiciones adecuadas al caso.

Punción del Seno venoso-retroorbital^{1,4}.

En este proceso, el seno venoso, que se encuentra entre el globo ocular y el fondo de la cavidad orbitaria (con existencia en todos los mamíferos), habrá de ser puncionado. Y esto se realiza con el auxilio de una pipeta capilar introducida sobre el lado del ojo (Preferentemente con una inserción en la terminal de la cavidad orbital ubicada en la esquina interna baja del ojo derecho). La previa anestesia del animal facilitará el proceso.

En caso de emplear la insensibilización superficial del ojo, es recomendable el emplear cocaína al 10% o xilocaína al 2%. Ya en la punción, se toma la rata con la mano izquierda, colocando el índice y el pulgar alrededor del cuello, en tanto el grueso de la mano se coloca sobre el dorso del animal. Con la mano derecha se introduce, aplicando una ligera presión y un movimiento de rotación, la punta capilar de una pipeta, en el ángulo nasal del ojo a través de la cápsula de Ténon. Colocada, aproximadamente de 4 a 5 mm, de la punta en dirección a la laringe, y si la punta ha sido previamente sumergida en heparina, se facilitará la recolección de sangre. Puncionado el seno venoso y debido a que algunos vasos sanguíneos pequeños son frágiles y se rompen, la sangre mana de la cavidad orbital subiéndolo espontáneamente dentro de la pipeta. Retirando la presión ejercida sobre el cuello, la mayor parte de la extravasación sanguínea también cesa. Algunos segundos después, al pasar por el mismo agujero de punción en la cápsula de Ténon, la misma operación permite el recuperar una cantidad igual de sangre.

Este proceso puede llevarse a cabo, en rata, durante pruebas seriadas que tengan una larga duración.

Las pipetas capilares pueden ser preparadas estirando las viejas pipetas Pasteur y se buscará de que el adelgazamiento sea lo más fino posible.

Corte de cola y dedos^{1,4}.

Es posible el obtener grandes cantidades de sangre mediante el corte de la extremidad de la cola. Se pueden obtener hasta 3 ml. En caso de requerirse pequeñas cantidades, con el animal anestesiado o inmovilizado, se pueden obtener muestras arriba de 0.2 a 0.3 ml por un corte en la vena de cola o en un dedo. La sangre deberá ser aspirada directamente del lugar.

Por el grado de daño provocado a los animales, es recomendable el empleo preferencial de la punción del seno venoso retroorbital⁴.

Existen otras técnicas de sangrado que son precisas y sencillas, su inconveniente es que requieren para su manejo, de un grado de habilidad superior a los anteriormente mencionados. Algunos que requieren de incisión sobre la piel son por ejemplo: (a) Incisión ventrolateral de la nuca. La punción se realiza en vena yugular y el animal debe estar anestesiado^{2,3}; y (b) Incisión sobre el área caudo lateral de la pata trasera. Aquí, la incisión se realiza para exponer la vena safena o a la femoropoliteal. Posterior a la toma de la muestra, la incisión es suturada^{2,3,4}. A diferencia de éstas técnicas, recientemente, ha sido desarrollada otra técnica en la que no se utiliza anestésico, ni ningún tipo de incisión; básicamente se punciona la vena Cava translumbrar (al nivel de la primera vértebra lumbar). Según los autores, la técnica puede ser efectuada en repetidas ocasiones a intervalos semanales (con obtención de volúmenes de 2 ml) con un tiempo muy corto de proceso (de 15 a 20 segundos). Asimismo, se dice que la mortalidad por punción es muy baja y la técnica es atraumática⁵.

En caso de requerir los máximos posibles volúmenes de sangre, o, que el animal vaya a ser posteriormente sacrificado, se recomienda el empleo de los métodos siguientes:

(1) Punción en la vena Aorta. El animal debe encontrarse anestesiado. Es posible el recuperar hasta de 3 a 5 ml de sangre. Deberá exponerse la porción ventral del abdomen y del tórax.

(2) Punción de la vena yugular. Con el animal anestesiado, se expondrán las venas yugulares. Una de ellas será ligada, la otra será cortada transversalmente. Colectar la sangre de la vena cubierta con aceite de oliva. Podrán obtenerse volúmenes de 4 a 7 ml.

(3) Decapitación. El animal es anestesiado. Se separa a la cabeza con el empleo de unas tijeras grandes. El cuerpo del animal será colocado posteriormente en un embudo o en el recipiente de colecta.

Conejo. Punción cardíaca.^{1,3,4}.

Material.

1. Conejo de aproximadamente 2 kg. de peso.
2. Alcohol etílico al 70%.
3. Tubo de centrifuga de 44 x 142 mm.
4. Jeringa estéril de 20 ml.
5. Aguja estéril con diámetro de 18, 19 y 20. La longitud variará entre 1.5 a 2 pulgadas.
6. Torundas de algodón.
7. Sujetador para conejo (Pueden contarse con la ayuda de uno o dos asistentes).

Proceso.

1. Sujeción del conejo. Si se emplea la ayuda de dos asistentes, el animal es extendido boca arriba (con las extremidades delanteras cruzadas por atrás de su cabeza y con las traseras extendidas y cruzadas). Habrá de ser comprobado que el animal esté firmemente sujeto. En caso de no tomar en cuenta lo último mencionado, y si el animal se moviera bruscamente al momento que la aguja se encuentra dentro de su corazón, es posible que se provoque la ruptura del mismo. El empleo de anestésico es opcional, y esto porque deben

de considerarse los posibles efectos del anestésico (acarreado en sangre) sobre los componentes sanguíneos estudiados¹. Aún, antes de estos, otros recomiendan al anestésico como obligatorio^{3,4}; si este fuera el hecho habría que elegir entre el éter o los barbitúricos (Vía intravenosa, volumen de 0.4 a 0.6 ml. y a una concentración del 10%). Si el empleado fuera éter, tendrá que comprobarse continuamente los signos de anestesia; la inducción con el solvente es rápida y puede alcanzarse rápidamente la sobredosis (aún cuando en algunos casos, los conejos más pequeños tardan en ser anestesiados). Además en este tipo de anestesia, el animal debe estar firmemente sujeto debido que intenta liberarse.

2. Se puede rasurar al conejo a nivel del tórax y en aproximadamente 5 centímetros por debajo del esternón (Esto es recomendable en caso de efectuar tomas repetidas). No necesariamente tendrá que aplicarse tal medida al animal, puede solamente ser limpiada - el área con alcohol etílico al 70%.

3. Es necesario comprobar que la aguja se encuentre bien fija a la jeringa. Asimismo, habrá de ser probado el funcionamiento de la jeringa y la aguja por aspiración y expulsión de aire. De no poderse aplicar esto último, es conveniente retirar la aguja, revisarla a contra luz, y desecharla si está roma o ligeramente doblada en su punta.

4. Habiendo establecido la zona donde el latido es más fuerte, localizada por los dedos pulgares e índice de la mano izquierda; y para mayor precisión identificando la protuberancia xifoidea y la última costilla esternal a la izquierda de la línea media del animal, colocar la jeringa en paralelo a la línea media (con una inclinación hacia abajo en un ángulo aproximado de 30°) e insertar la punta de la aguja con el bisel hacia arriba. Esta punción puede también ser efectuada sobre el tercer y cuarto espacio intercostal a medio centímetro del esternón.

5. Con la jeringa y aguja colocados en tal posición, empujar lentamente la aguja hasta que se ha sentido la pulsación cardíaca (lo que puede comprobarse si al dejar la jeringa libre, se observa un notorio balanceo de esta). Asimismo, si el émbolo ha sido separado levemente, se notará como la sangre penetra a borbotones en el barril). Con un empuje rápido en la dirección del pulso, se ---

penetra al corazón. Lentamente se saca el émbolo de la jeringa. En caso de no obtener sangre, la aguja será retirada y reintroducida en una zona próxima a la punción anterior. Cuando la sangre comience a fluir dentro del sistema, la jeringa debe estar sujeta en la misma posición. Se colectará el volumen de sangre deseado. No es recomendable el efectuar más de dos repeticiones, a menos que el animal vaya a ser sacrificado.

6. Luego de completado el sangrado, la aguja será sacada rápidamente. Se pasará la sangre a un tubo, previo el retiro de la aguja y se procede a efectuar el tratamiento posterior deseado para la muestra sanguínea.

7. Inmediatamente, tanto la aguja y jeringa, deberán ser lavadas con agua fría, con lo que se prevendrá su inutilización.

Puede recuperarse volúmenes de hasta 10 a 20 ml cada vez repitiendo la punción cuatro veces, esto aplicado durante intervalos semanales⁴.

Punción e incisión de la vena marginal y arteria central de la oreja^{1,3,4}.

Material y equipo.

Solamente serán descritas aquellas sustancias o equipos que no se hubieren mencionado previamente para otro tipo de punciones.

1. Lámpara de calor con foco de 15 w. Alternativamente, puede ser empleado el xilol o inclusive el aplicar un frotamiento delicado sobre la zona.

2. Clip para papel.

3. Navaja de rasurar.

4. Jeringa de 10 ml con aguja de calibre 20.

Proceso.

1. Sujetar al conejo. No se requiere anestesia pero sí una buena sujeción.

2. Rasurar la piel sobre la vena marginal interna de la oreja a elegir. Puede emplearse la otra oreja, pero es aconsejable -

que se le reserve para inyecciones intravenosas.

3. Es necesario que para efectuar un sangrado sucesivo la vena se encuentre dilatada. Esto se logrará aplicando calor con el foco sobre la superficie interna de la oreja, o bien, con el frotamiento vigoroso de una gasa mojada con xilol. Preferiblemente deberán emplearse el calor al xilol, debido a que este último daña al tejido epitelial. Si no fuera posible contar con la lámpara, para evitar posibles daños al tejido, posterior a la aplicación del xilol, la zona será limpiada con alcohol al 70 %.

4. Durante la punción en la vena de la oreja, para conseguir buenos resultados en la recuperación de sangre, habrá de comprimirse los vasos en la base de la oreja con la ayuda de los dedos índice y pulgar. Se coloca la aguja con el bisel hacia arriba y se aplica la venipuntura a lo largo de la misma. Habrá que cuidarse que el animal esté bien sujeto, porque de lo contrario, se zafará. (Cuando realice varias punciones, éstas deben ser aplicadas de la punta de la oreja hacia la base de la misma). En el momento que la sangre fluye hacia el barril, la aspiración ejercida deberá ser lenta y con ello se prevendrá el colapsamiento de la vena sobre la apertura de la aguja. En algunas ocasiones, una delicada rotación de la jeringa ayuda a prevenir que la vena se colapse.

Los pasos anteriores también son aplicables en caso de punccionar la arteria central de la oreja.

Es posible la recolección de 10 ml empleando las agujas adecuadas y además mojándolas previamente con aceite de oliva por dentro. Para la obtención (en caso de querer recuperación del suero) de al menos 5 ml, en venas auriculares sin la oclusión de vasos, pueden obtenerse por lo menos 3 veces cada semana⁴.

5. En caso de realizar un corte para la obtención de sangre, primeramente habrá de dilatarse a los vasos sanguíneos, posteriormente los vasos a tratar serán ocluidos empleando los dedos pulgar e índice. Se aplicará una incisión longitudinal de 2 a 3 mm en la vena mediante un corte rápido (no deberá hacerse un corte transversal, porque se provocaría la ruptura de la vena). La sangre fluirá libremente a través de la capa de grasa (colocada previamente) y las gotas serán recolectadas en un tubo de centrífuga. Los volúme-

nes recuperados varían de 40 ó 50 ml. dependiendo de la experiencia del operador. En caso de que el flujo cesara, puede reiniciarse - este aplicando un ligero golpe en la vena, cercano a la cabeza. La obtención de un volumen deseado esta en base a la tranquilidad - del animal.

6. Para los dos casos (punción e incisión de la oreja), tan pronto, como la cantidad deseada haya sido obtenida, coloque una pequeña pieza de algodón sobre el área (ésto se facilita con los dedos pulgar e índice y posteriormente puede ser aplicado un clip en caso de que no pare el sangrado). Posteriormente, se remueve la presión de 15 a 30 minutos más tarde, y no deberá pasarse el tiempo de presión más de 2 ó 3 horas (si se empleara el clip) debido a que podría provocar una isquemia local con la subsecuente necrosis del tejido.

Otros sistemas de fácil aplicación, para la obtención de - sangre de manera más rápida y eficiente; ya han sido adaptados dependiendo de la cantidad de trabajo por efectuar. Un ejemplo de ello lo es de utilizar una trampa de vacío, aplicada sobre una incisión en vena marginal. Y con ello es posible la obtención de hasta 50 ml. en pocos minutos.

Tipos de Inoculación.

Introducción.

Es importante el tener un conocimiento acerca del tipo de administración de fluidos para cada animal, dependiendo del estudio al que este se encuentre sometido. En los puntos tratados a continuación, sólo se han involucrado aquellos animales más utilizados en el laboratorio de Bioquímica de Sistemas. Asimismo, cada vía utilizada será especificada cuando esta sea aplicable tanto a la rata como al conejo, así como las explicaciones que cada caso requiera.

Administración de fluidos por el tracto digestivo. Rata³.

Existen dos formas:

a) Instalación en la boca y/o cavidad bucal. La administra- -

ción de fluido por este medio es atraumática y requiere de poco - esfuerzo.

b) Instalación vía tubo estomacal. Para el caso, puede ser elegido el emplear un tubo esofágico hecho de una cánula de diámetro apropiado o, mediante el empleo de una aguja calibre 15-16 previamente despuntada y doblada acorde al tubo esofágico. Se sujeta firmemente a la rata de tal forma que quede con el tórax pegado a la mesa, y por el espacio interdental se hace pasar el tubo de caso. Cuando se sienta un aflojamiento notorio, el fluido puede ser descargado.

Administración de fluidos por la vía parenteral¹.

Variados son los cuidados que se necesitan considerar cuando se hace uso de tal vía de administración. En primer lugar todo lo que se vaya a inyectar, debe encontrarse estéril y, este, es el mismo caso para los implementos por utilizar. Las áreas de la piel a tratar, deberán ser limpiadas previamente con etanol al 70%.

Durante el llenado de la jeringa habrá que evitar el que se introduzcan burbujas de aire, dado que una vez administradas en el animal, es posible el provocar un embolismo aéreo. Por lo anterior, posterior al llenado de la jeringa, colocado verticalmente el barril con el bisel hacia arriba; se desalojará cualquier aire atrapado mediante el movimiento ejercido sobre el émbolo. Deberá cuidarse se que el aire permanezca en el orificio de la aguja (con lo que se evitará la descarga del fluido al aire), luego con la jeringa inmóvil en la misma posición, se colocará un pedazo de gasa o algodón en la punta, y se eliminaran a las burbujas de aire.

En caso de que la vía de inyección requiera de una aguja de calibre pequeño, el llenado de la jeringa es más sencillo de realizar si se emplea una aguja de calibre más grande (por ejemplo: calibre 20) de longitud apropiado para el recipiente que contiene el material a ser inyectado.

1. Jeringa estéril. El tamaño de ésta dependerá de la cantidad de material a ser inyectado y de la precisión volumétrica que se desee inyectar. El tamaño de la aguja será establecida en fun-

ción del animal y dependiendo de la vía de administración. Es necesario comprobar el buen estado de las agujas.

2. Alcohol etílico al 70%.

3. Torundas de algodón o trozos de gasa.

Vía Intravenosa.

La administración de fluidos por medio de esta vía, para el caso de las ratas, generalmente se efectuará de la misma manera que se indica para la obtención de sangre. El caso también es aplicado en la administración de fluidos en conejo, en las venas marginales de las orejas. Para las ratas, no todos los lugares mencionados para la obtención de sangre son idóneos para la administración de fluidos; solamente dos son las vías mas comunmente empleadas³: (a) Venas de la cola. En donde el empleo de una aguja, calibre 26 de 5/8 de pulgada, facilita el proceso y (b) Inyección vía la vena Peneal^{1,2,4}. El cual no solo es un proceso aplicable a ratas, sino que también lo es para cuyes. Por esta vía pueden administrarse de 1.3 a 1.5 ml en volumen de una solución para una rata de aproximadamente 500 g de peso, volúmenes menores van en función del peso del animal. El calibre de la aguja será seleccionado de preferencia con número 30. En este tipo de administración es conveniente que el animal se encuentre anestesiado, lo que no es obligatorio para los conejos.

Existen otras vías de inyección en venas no muy comúnmente empleadas, y esto se debe a que la mayoría de ellas requiere de la exposición de las venas mediante incisiones. El caso es aplicado para los tipos de animales ya mencionados.

Es recomendable que al estar administrando la solución, sea comprobado que la aguja se encuentra dentro de la vena y esto será visualizado fácilmente porque de no ser así, el líquido generará una ampolla o palidez de la zona. La administración de los fluidos deberá realizarse de la forma mas lenta posible y en dirección del flujo sanguíneo.

Vía Subcutánea e Intracutánea^{1,3}.

El tipo de vía aquí mencionado, es muy útil para la administración de sustancias oleosas y, aún es mas importante cuando lo que se requiere es que la absorción del material inyectado sea lenta y gradual. Es una vía útil para estudios de diagnóstico en donde la respuesta superficial al lugar de la inyección, es el parámetro a medir.

Es una vía aplicable a todos los animales de laboratorio (rata, ratón, cuye, conejo, etc) ¹.

Material y equipo.

1. Aguja y jeringa estériles. El calibre de la aguja está determinado por el tipo de animal y el rango es de 1/2 a 5/8 de pulgada de longitud. El calibre 22 es el recomendado en conejos; el 24 para cuyes, ratas y ratón. Estos calibres y longitudes en agujas son aplicables en caso de la vía subcutánea, porque para la intracutánea, la variación es calibre 24 para conejos; el 26 para cuyes, ratas y ratones.

2. Tijeras.

3. Equipo de rasurar o depilar.

Proceso.

1. Quitar el pelo del área. Si es preciso se rasurará a la zona o se le depilará.

2. Sostener al animal dependiendo de la zona a inyectar, desinfectarla y aplicar la sustancia de acuerdo a la ruta de administración seleccionada:

Inyección subcutánea. Con el pulgar y el índice de la mano izquierda, se toma una parte de piel. Con la mano derecha, se inserta, tanto como sea posible, la aguja debajo de la piel sin traspasarla. De preferencia, debe de efectuarse en paralelo al músculo que se encuentre por debajo. Se inyecta al material y posteriormente la aguja será sacada inmediatamente.

Inyección intracutánea. Extender la piel entre el pulgar y el índice de la mano izquierda. Con la derecha tomar la jeringa en un ángulo aproximado a los 30° de la superficie de la piel -

(el bisel deberá encontrarse hacia arriba). Insertar la punta de la aguja justamente sobre la capa de la piel externa. Posteriormente bajar la jeringa a una posición casi paralela a la superficie de la piel, e insertar la aguja en aproximadamente 1 mm posterior al bisel. El contenido habrá que ser inyectado lentamente. Finalmente, sacar la aguja rápidamente. Si el material ha sido depositado dentro de la piel, existirá la formación de una pequeña burbuja.

Un lugar utilizado comúnmente para la administración subcutánea de fluidos, lo es la inyección en las plantas de los pies¹. Se emplea para conejo, cuye, rata y ratón. El lugar de la inoculación está al nivel de las plantas traseras de sus patas. Se aplica primeramente una desinfección de la zona a inocular, y se introduce la aguja teniendo el cuidado de no lesionar los metatarsales. En el conejo, la penetración de la aguja se sitúa en el centro de la pata; en ratones, ratas y cuyes la inserción de la aguja debe de efectuarse entre los dedos de las patas. El material será inyectado muy lentamente. A los cuyes es posible administrarles hasta un máximo de 0.1 ml, lo que es similar para las ratas; pero para los ratones solo se les puede administrar 0.025 ml por planta del pie. Dado que la vía de inyección por esta ruta, a menudo causa la intranquilidad del animal debido a la hinchazón o inflamación, es deseable el tener a los animales en un lugar confortable. No debe administrarse solución alguna, empleando esta vía, en las patas delanteras; ya que el animal las emplea para su arreglo y alimentación.

Vía Intraperitoneal.

La vía es muy útil cuando se requiere que el material inyectado sea rápidamente metabolizado. (En aproximadamente 15 minutos posteriores a la inyección). La vía, de ser aplicada correctamente, es inocua y aplicable para conejo, rata, ratón y cuye. Poco volumen puede ser administrado por tal ruta (de 3 a 5 ml en ratón y de 15 a 25 ml en rata).

Material y equipo.

1. Aguja y jeringa estériles. Calibre 22 y de 1/2 pulgadas de longitud.

2. Empleo de un sujetador de animales, o la asistencia de una persona.

Proceso.

1. Cualquiera que sea el caso, (empleo de un sujetador o ayuda de un asistente), el animal debe tener las piernas traseras elevadas, lo cual permitirá que los intestinos se muevan hacia el tórax. El animal puede ser colocado verticalmente, cabeza abajo, y con el abdomen hacia afuera.

2. Desinfectar el área, y se aplica un "pellizco", lo que elevará la zona para inocular.

3. Insertar la aguja unos 30° de ángulo respecto a la superficie de la piel. En este mismo momento colocar la jeringa en ángulo derecho rápidamente. Se empuja a la aguja dentro de la cavidad peritoneal. Cuando exista un cese de resistencia contra la aguja, es un adecuado nivel de penetración lo que se ha realizado, posterior a ello hay que retraer ligeramente la aguja con lo que la posibilidad de aplicar la inyección dentro del intestino es reducida. Por último, el material será inyectado, y luego, la aguja tendrá que ser sacada rápidamente.

Vía Intramuscular.

Esta es una vía de administración muy utilizada en función de las características de densidad del tejido. Aquí solamente pueden ser inyectados pocos volúmenes. La absorción de los fluidos por tal vía es baja (de 45 minutos a una hora para la mayoría de los fluidos). Las áreas más comunes a inyectar son: la musculatura gruesa de las piernas traseras, el área más glútea y los músculos del biceps.

Cuando se aplica esta ruta de administración de fluidos, con el fin de no tocar algún vaso sanguíneo, es común el retirar ligeramente el émbolo antes de inocular la solución, con lo que se -

comprobará la no aspiración de sangre. Asimismo, al momento de inyectar, habrá de evitarse el que se lastime a algún hueso. Al introducir la aguja en el área seleccionada, hay que orientar la punta en sentido de las estriaciones musculares (de lo contrario, si el animal llegara a moverse, se le provocaría un desgarre).

Aparte de las vías discutidas anteriormente, existen algunas otras que son aplicables y útiles dependiendo de lo requerido por administrar, así como de las características del animal^{3,4}. Algunos ejemplos son: (a) Vía conjuntival. Donde se administra el fluido sobre la córnea empleando una jeringa de tuberculina o una pipeta (b) Vía intraocular. Inmovilizado el animal, se le inyecta en la cámara anterior del ojo; (c) Vía intracerebral. La que comúnmente se realiza con el empleo de un mandril. (d) Otras.

Bibliografía.

1. Garvey, S.J.; N.E. Cramer & D.H. Sussdorf. Methods in immunology. 3a. Edición. Edit. W.A. Benjamin, INC. U.S.A. 1977.
2. Griffith, J.Q. & E.J. Farris. The rat in the laboratory investigation. 2a. Edición. Edit. Hafner Publishing Company. New York, U.S.A. 1971.
3. Gay, W.I. Methods in animal experimentation. Vol. I. Edit. Academic Press. New York, U.S.A. 1965.
4. Hoffman, G. Les animaux de laboratoire. Edit. Viget Frères. Paris, France. 1963.
5. Owent, E.W., y colaboradores. A new technique for rapid, repeated blood sampling in the conscious rat. Fed. Proc. Abstracts. Ref. 1335. 15-23 Abril. 1982. 41 (3), 1982. March. 1.

Capítulo IV. Apéndice 4. Técnicas quirúrgicas.

Para realizar estudios a nivel fisiológico es necesario contar con herramientas de trabajo útiles para la obtención de resultados demostrativos y confiables. Las técnicas quirúrgicas no pueden ser la excepción dentro de dichas necesidades, si no que más bien son parte integral de las investigaciones por realizar. El empleo de estas técnicas es aplicable, porque ya existe una metodología para el manejo de los animales de laboratorio durante estos casos^{1,2,3}.

Al efectuar un estudio en el que la cirugía es un importante proceso, esto implica el manejar conceptos bien definidos. Sobre todo, nada de lo que se haga debe dejarse sin ser tomado en cuenta, o dejarse a la memoria. Por ello, los puntos que a continuación serán tratados, es necesario el tenerlos presente siempre^{1,2}.

1) Anotaciones e identificación. Dentro de este punto habrán de considerarse todas aquellas anotaciones (detalladas y precisas) de la historia preoperativa, operativa y postoperativa para cada animal.

Un adecuado record incluye espacio para las características de identificación (raza, color, tamaño, sexo) del animal, así como otros datos proporcionados y su fuente de suplemento. Debe ser anotado lo correspondiente al examen preoperativo, con un espacio que remarque los cuidados durante la etapa así como lo observado. Será involucrada una amplia descripción del tipo, cantidad y fuente de la anestesia. A continuación se mencionará de forma detallada, la descripción de la operación. Todos los resultados internos que aparecen al momento deben ser registrados; esto mismo debe ser hecho para el tipo, cantidad y el tiempo de administración de cualquier anestésico adicional, fluidos, sangre, y otros medicamentos. Puede ser incluida la condición del animal, al final de la operación. Además, puede dejarse si se desea un espacio para dibujos, datos etc.

Una sección final para el cuidado postoperativo y las observaciones, proveen un espacio óptimo para anotar datos sobre alimen

tación, eliminación, cambios de peso, conducta, y otros resultados obtenidos durante el recobramiento de la anestesia y el período - postoperativo inmediato. Pueden anexarse páginas adicionales para proporcionar posteriores estudios y datos. El estado final en que se encuentra el animal, además de los resultados a la necropsia en caso de realizarse completos, deben de ser registrados.

Por otro lado, será anexada una tarjeta con la identificación, de cada animal, en cada caja. En ella se anotará el nombre - o número del animal, el nombre de la persona que está realizando - la investigación (o el número del equipo de trabajo), y una amplia descripción concerniente al animal. Esto es necesario, porque previene la mezcla de animales; o por otro lado, en ausencia de la (s) persona (s), otros en el laboratorio tendrán suficiente información para actuar completa e inteligentemente por si el animal requiere algún cuidado de emergencia. Si las tarjetas por el uso --- constante y el tiempo, se maltratan; ésto debe ser prevenido mediante una comprobación regular de las mismas.

No debe olvidarse, además, el marcado óptimo de los animales*

2) Examen Preoperativo.

- Con la finalidad de obtener resultados uniformes y válidos, los animales empleados deben encontrarse en el mejor estado de salud posible.

- El examen físico preoperativo inicia con la evaluación de la apariencia externa del animal (p. ej. su pelo). Su conducta debe ser normal. Al tocar su piel, esta debe encontrarse firme y delicada. (Por lo consiguiente, las membranas mucosas deben presentar una coloración propia e hidratada). Deben evaluarse las características del músculo interno, además del contenido graso que se encuentre en él. Asimismo hay que correlacionar el peso medido del animal su pulso, su respiración y su temperatura rectal.

- Para los procesos quirúrgicos, es preferible emplear animales jóvenes, debido a que en ocasiones la mayor sensibilidad hacia los anestésicos va acorde a la edad, además de otros problemas como: degeneración renal y hepática, etc.

* Ver lo correspondiente a marcaje de animales de este manual.

- Hay que considerar que las especies de animales roedores -- manifiestan un fuerte stress emocional y subsecuentes cambios fisiológicos, sólo porque se les transporta o maneja, además, de que recientes los cambios en los alojamientos y la alimentación. Por lo que es práctica general, el reducir tal stress a un mínimo, permitiéndole a los animales un periodo de adaptación antes del proceso quirúrgico.

- El alojamiento debe encontrarse en óptimas condiciones, - por lo que hay que evitar la presencia de heces en las cajas de alojamiento.

- Aparte del examen preoperativo de los animales, es menester efectuar un examen preoperativo del material a emplear durante la cirugía. Hojas de bisturí de uso general y nuevas, mangos de bisturí, tijeras (rectas, curvas, de punta), separadores, pinzas de disección, agujas de sutura curvas y rectas, porta agujas, pinzas de hemostasis, etc.; asimismo, se requiere de una mesa o lugar de trabajo, de un lugar donde se esterilize al material (autoclave), así como es necesario contar con unidades con las cuales puedan aplicarse cuidados intensivos (Medios intravenosos para la administración de flúidos, elementos de calentamiento, etc.). El área para la cirugía debe ser completamente dedicada a ello (Hay que contar con agua fría, caliente y además de soluciones antisépticas adecuadas al caso, etc.).

Antes de efectuar la cirugía, es importante el establecer un protocolo de operación:

(a) Preparación de instrumentos. Para la limpieza es necesario el empleo de detergente, de aplicar lavado mecánico (con la posibilidad de aplicar radiaciones con luz ultravioleta) enjuagar, marcar el material (con indicador y fecha) y esterilizar (a 125°C, durante 15 min. y a 15 ó 20 psi).

(b) Preparación del animal. Para lo que se aplicará como sigue: limpieza del lugar a tratar quirúrgicamente, asepsia, secado de la piel, inducción a la anestesia - en caso de emplear algún tranquilizante o preanestésico -, transferencia del animal al lugar de la operación con una aplicación final de solución yodado, y preparación del operador para efectuar la cirugía.

(c) Preparación de la cirugía. Emplear guantes, cubrebocas - así como aplicar un adecuado lavado de brazos.

(d) Preparación del animal en el lugar de la operación. Se efectuará una cobertura total del cuerpo del animal excepto del lugar de la cirugía. En este punto son colocados los implementos quirúrgicos en la charola.

- Dentro del área donde ha de efectuarse la operación, hay que controlar todo lo relacionado con la infección, por lo que hay que tomar en cuenta el movimiento de las personas dentro del área para evitar corrientes de aire.

Para efectuar una óptima curación de heridas, hay consideraciones que tienen que ser manejadas. P. ej: Hay que tener delicadeza en el manejo del tejido, asepsia durante el proceso, una adecuada hemostasis y un sellado apropiado de la piel mediante un correcto patrón de sutura.

Como apoyo a todo lo que habrá de ser efectuado, hay que retirar la hemorragia antes de suturar. En caso de requerir suturar, ligar o cerrar algún órgano interno o músculo, habrá de trabajarse con catgut, ya que el uso de este material se hace ideal porque es absorbible; pero no deberá ser manejado para la piel, ya que genera abscesos. Para esta última, la seda es el material de caso y como no es absorbible tendrá que ser retirada posteriormente.

Para seleccionar el tipo de catgut, es necesario considerar sus características de longitud de tensión acorde a su tamaño. Lo hay desde 0000000 a 7. P. ej. El tamaño 00 tiene una longitud tensional más grande de 5 lb., la longitud de tensión varía en días de acuerdo al tamaño. En el caso del hilo seda, este presenta características comparables al catgut.

El catgut proviene de la submucosa intestinal del ovino; lo que en el caso del hilo seda, éste es obtenido del gusano de seda.

Una sutura óptima requiere de un conocimiento previo de los diversos tipos de nudos existentes, además de las diferentes patrones de sutura.

Las formas más comunes de anudar en cirugía de animales son:

1) El nudo efectuado mediante instrumentos, 2) el nudo aplicado -- con una mano y 3) el nudo realizado a dos manos, para elaborar un buen anudado, se requerirá un cierto grado de experiencia*. En términos generales, éste no debe ser aplicado con exceso al máximo de longitud de tensión de la sutura; asimismo, no deberán unirse a las dos superficies opuestas tan fuertes que comprometa a algunos vasos sanguíneos; posterior al primer tirón, hay que mantener la tracción para que el nudo no se deshaga. Todos los nudos deben estar bien hechos y colocados uno junto al otro para prevenir los posteriores desnudamientos.

- Terapia de remplazamiento de fluidos. Esta es una etapa que no debe descuidarse, tiene que ser considerada durante las fases preoperativa; operativa y postoperativa. Cuando se aplica la terapia, lo único que varía es la vía de administración en función de los fluidos, asimismo, el criterio con que tiene que ser afectuada se da por: signos físicos manifiestos por pérdida de agua corporal, electrolitos o sangre; cambios en la temperatura corporal; en la pliability de la piel (deshidratación); en el pulso; en la presión sanguínea y en el color de las membranas mucosas; así como en la velocidad de respiración; en la cantidad de edema subcutáneo; y en la velocidad de excreción urinaria. En suma, la consideración de los signos clínicos presentes en el animal, podrán conducir hacia una correcta terapia de fluidos**.

Dado que en animales de laboratorio es generalmente difícil administrar una terapia de fluidos por vía intravenosa; la vía más empleada es la subcutánea. Por este último medio, no deben ser administradas las soluciones hipertónicas, ya que producirán serios efectos deshidratantes. Por otro lado, una solución sin un electrolito extracelular, tal como la dextrosa al 5% en agua, provocará -

* En caso de requerir de mayor información al respecto, así como el observar mediante esquemas los diferentes patrones involucrados, se recomienda el dirigirse a la fuente original.

**Es recomendable que para el caso, sea consultada la referencia original.

un movimiento de iones Sodio desde los tejidos intersticiales. Si el animal presentara un estado de baja de la concentración de sal, la baja adicional provocará shock o muerte.

3) Cuidados durante la operación¹.

- Preparación del campo operativo. Para quitar el pelo puede ser empleado un depilador adecuado. Asimismo el área depilada debe ser amplia y posteriormente desinfectada.

- Para prevenir la pérdida de calor en los animales, éstos -- habrán de ser envueltos luego de la cirugía, con ello será evitada una pérdida brusca de la temperatura corporal.

- Posterior a la sutura de piel, es necesario aplicar una -- presión a lo largo de la incisión, de por lo menos tres minutos. -- Esto se hace debido a que durante la suturación, la aguja punciona a menudo vasos sanguíneos pequeños los que provocan el sangrado -- subcutáneo, que por lo general forma pozos pequeños en cada punto de sutura. En caso de que éstos se presentaran, no habría un adecua do sellado y la consecuencia sería una fuente infecciosa con un -- probable desarrollo amplio. Para evitar tal situación habrá que co locar una toalla enrollada o un pedazo de gasa, y presionar sobre la incisión; iniciando del punto inicial al final. Con tres minutos se evitará que haya coagulación en los pequeños puntos de sangrado. Cualquier rastro de sangre o de líquidos tisulares que permanezcan en la zona, deben ser inmediatamente lavados con solución salina -- estéril.

El empleo de vendajes, luego de efectuada una incisión abdominal, proveerá presión y soporte; lo cual será útil para proteger la zona.

4) Cuidados postoperatorios.

Inmediatamente después de vendado el animal, hay que aplicar las medidas necesarias para evitar las infecciones (administración de antibióticos) y las de analgesia postoperatoria (el analgésico -- de caso).

Si, posterior a los tratamientos preventivos, se coloca al animal en su caja; hay que tener la seguridad de que él estará cómodo, no hay que obligarlo a que se coloque.

- Es necesario el tener a la mano las soluciones del caso (solución salina fisiológica, solución glucosada, etc.), así como una

fuelle de calor (con el posible empleo de una lámpara de 100 watts).

- Existe la necesidad de comprobar la frecuencia con la que habrán de ser administrados los antibióticos, los analgésicos, y los flúidos de terapia con electrolitos.

- Diariamente hay que revisar la zona intervenida y proceder a limpiarla y desinfectarla.

- Al quinto o sexto día (dependiendo de como esté recuperada la zona), hay que quitar los puntos de sutura con la ayuda de tijeras de punta. Si a éstas se les dejara por mas tiempo, lo que podría presentarse posteriormente, serían abcesos. En caso de separación de tejidos, luego de haber sido suturados, hay que aplicar vendoteles en la zona hasta una total recuperación (siempre y cuando los tejidos no se encuentren completamente abiertos; para tal caso, es necesario abrir nuevamente y volver a suturar).

Todas las medidas precautorias anteriormente mencionadas, -- pueden ser retiradas al momento en que se observe que la zona se encuentra totalmente sana.

Bibliografía.

1. Gay, W.I. Methods of Animal Experimentation. Vol. I. Edit. Academic Press. London, England. 1965. pp.43.
2. Melby, E.C.M. Handbook of Laboratory Animal Science. Vol I. Edit. CRC Press. U.S.A. 1974. pp. 233-278.
3. Zarrow, M.X.; J.M. Vochim y J.L. McCarthy. Experimental Endocrinology. A sourcebook of basic techniques. Edit. Academic Press. London, England. 1964. pp.309.

Capítulo IV. Apéndice 5. Preanestésicos, anestésicos y complicaciones anestésicas.

Introducción.

Para realizar un experimento en el que se requiere cirugía, es fundamental el conocer todo lo relacionado a las etapas pre, y postanestésicas. Por lo que, los puntos siguientes darán un panorama de lo que es necesario considerar durante tales etapas.

Preanestésicos. Razones científicas y humanas inducen a que sea necesario el administrar anestésicos, analgésicos y tranquilizantes adecuados a los animales de laboratorio. Los relajantes musculares y otros preanestésicos pueden ser usados para algunas cirurgías, pero deberán ser utilizados en conjunto con drogas conocidas de producir una óptima analgesia.

Específicamente, los preanestésicos son usados en animales de laboratorio por las razones siguientes: facilitar su tranquilidad debida al temor; reducir el dolor e inconformidad y llevar a cabo procesos menores tales como: caterización urinaria, minimizar salivación o una respuesta del reflejo vagal (tales como laringoespasmos durante una intubación endotraqueal), reducción del anestésico general a emplear (por potenciación de su efecto, etc.).

Anestésicos. Existen muchos procesos menores que pueden ser llevados dolorosamente con grandes dosis de preanestésicos, los anestésicos son requeridos para cirugía mayor. Si la inmovilización no es necesaria, esto es hecho mas fácil y mas satisfactorio administrando sólo los anestésicos para inducir inconsciencia en el animal.

Independientemente de cual sea el caso del empleo de un anestésico, lo que si es importante; es conocer que efectos provoca, - por lo que de manera resumida, éstos son mostrados como a continuación se indica:

Estados de la Anestesia¹.

1. Embriagamiento y analgesia. Un estado en el que el paciente aún se encuentra inconsciente y puede tolerar procesos dolorosos

medios; el estado termina por una pérdida de la conciencia. Es importante el destacar, que durante una "analgesia por éter", es posible regresar del estado III al estado de la analgesia y por lo cual sólo manos hábiles pueden realizar tal cirugía.

II. Delirio o excitación. Durante esta etapa la respiración es irregular, con gran actividad motora, signos de descarga simpática general y susceptibilidad a estímulos externos. El estado termina cuando se presenta la relajación.

III. Anestesia quirúrgica. En este estado hay una baja progresiva de reflejos y depresión de las funciones vitales. Esta etapa a su vez, se encuentra dividida en cuatro planos:

Plano 1: Hay relajación, respiración regular, disminución del tamaño pupilar, así como desaparición de los reflejos oculares. Este plano es adecuado para procesos que no requieren de una relajación muscular marcada (torácica, neuroquirúrgica, tiroidea, vesiculares, hernias).

Plano 2. Hay una relajación marcada con respiración lenta, así como un cese de movimientos oculares. Este plano es adecuado para efectuar cirugías, que requieran de relajación moderada e inhibición de los reflejos faríngeos, peritoneales, y otros (cirugía abdominal, garganta, coyunturas).

Plano 3. Durante este plano se acentúan los signos del plano 2, por lo que es el necesitado para algunas fases de cirugía abdominal superior.

Plano 4. La respiración es enteramente diafragmática y está dada solamente por puros músculos accesorios, las pupilas se encuentran ampliamente dilatadas; existe un peligro de colapso circulatorio y respiratorio.

IV. Paro Bulbar. En esta etapa la respiración está detenida, pero la parálisis medular usualmente es reversible con respiración artificial y una redistribución del anestésico por todo el cuerpo.

En adición a todos los signos mencionados anteriormente, existen otros exámenes necesarios que son de ayuda al anestesista, de los cuales algunos son: monitoreo de la presión sanguínea y de la respiración, electroencefalograma, etc.

ESTADO	1	2	3				4
PLANO			1	2	3	4	
Respiración							
Pupilas (no medicamento)	o	○	○○	○○	○○	○	○
Reflejo palpebral y movimientos del ojo.							
Reflejo a la luz, corneal, faringeal y laringeal.							
Velocidad de pulso.							
Secreción lagrimal.							
Tono muscular.							
Respuesta a la incisión en piel.							
Presión sanguínea.							

Bibliografía.

1. Cutting, W. C. Handbook of Pharmacology. The action and uses of drugs. 4a. Edición. 2a Reimp. Edit. Meredith Corporation. USA. 1969. pp. 586-587.
2. Melby, E. C. Handbook of laboratory animal science. Vol. I Edit. CRC Press. U.S.A. 1974. pp. 233-273.

Capítulo IV. Apendice 6. Colección de muestras preparación y preservación^{1,2,3}.

En la mayoría de exámenes bioquímicos se requiere el empleo de suero; no obstante, también es práctica común el prevenir la coagulación sanguínea por la adición de sustancias a la sangre. -- (con lo que se obtiene el plasma).

No importando cual sea el tipo de muestra a manejar, ésta no debe tener material celular particulado, dado que la presencia de este último alterará el volumen pipetado e introducirá partículas con actividad metabólica, lo que al final puede incrementar los errores en las determinaciones biológicas o bioquímicas efectuadas.

Hay que considerar que los estudios también pueden ser efectuados en orina, fluido espinal cerebral y extractos tisulares; pero ellos sólo son un porcentaje pequeño de muestras analizadas rutinariamente en la mayoría de los laboratorios, siendo las efectuadas en sangre completa, plasma y/o suero las que predominan.

La sangre tiene básicamente dos componentes: las células (o elementos figurados)* y el fluido en el que se encuentran las células.

Dentro de la parte fluida de la sangre, hay dos subdivisiones principales: plasma y suero. Estos dos últimos difieren en que uno (el suero), tiene ausentes los factores de coagulación y algunas proteínas (fibrinas)**.

* Los elementos figurados son: Glóbulos rojos o eritrocitos, glóbulos blancos o leucocitos y plaquetas o trombocitos.

** Se da el caso de que en algunas ocasiones se hace uso de sangre completa. A esta, el único tratamiento al que se le ha sometido (una vez que ha sido recolectada) es desfibrinarla y por lo consiguiente se ha evitado la coagulación, quedando como parte fluida (luego de una centrifugación) el suero.

En ocasiones, de acuerdo al tipo de estudio hematológico, es necesario trabajar con una muestra sin coagular, pero si al adicionar el coagulante se alteraran los resultados bioquímicos finales; este tendrá que ser seleccionado para que no interfiera con los resultados.

Hay 3 pasos esenciales en la preparación de suero (o plasma): (a) Coagulación (Si la muestra a obtener es suero), (b) Separación del coágulo (En caso de plasma: separación de elementos figurados), (c) Clarificación. En adición, es necesario considerar lo referente a la preservación. Hay que evitar siempre la presencia de elementos celulares de sus restos o de basura en las muestras, debido a que alteran significativamente los resultados en algunos exámenes. Hay que considerar que una centrifugación insuficiente y/o mal manejo de la muestra causará ruptura celular y las muestras se colorearán de rojo (hemólisis), lo que indica contaminación con componentes celulares internos y con restos de paredes celulares. Al coleccionar el suero o el plasma, con un mínimo de trauma para las células, éstos son usualmente de color amarillo-pajizo. Una muestra con gran cantidad de hemólisis hará que no sea aceptable para hacerle estudios bioquímicos*.

* Siempre que se haga una toma de muestra sanguínea, deben tenerse en cuenta a los puntos siguientes:

- Evitar la aplicación de presión negativa con la jeringa al momento de la toma, o comprobar que los tubos de vacío (Vacutainer) sean los adecuados.
- El material de vidriería debe estar muy limpio y seco. De preferencia hay que emplear material estéril, con lo que se eliminará la posibilidad de una fuerte contaminación.
- Al vaciar el contenido sanguíneo de la jeringa a los tubos la sangre debe resbalar lentamente por la pared del tubo. No hay que vaciar la bruscamente.

Una vez obtenido el fluido a estudiar, de preferencia, todas las determinaciones deben de ser hechas el mismo día que la sangre ha sido obtenida. Esto se debe a que algunos metabolitos se descomponen (o son transformados) conforme pasa el tiempo. En caso de no poder analizar las muestras hay que utilizar sustancias conservadoras. Estas son seleccionadas en función de las determinaciones por efectuar**. En caso de agregar tales sustancias, lo recomendable es que las muestras (suero o plasma) sean guardadas a temperaturas menores de -10°C hasta que se les estudie. Aún así, en algunos casos como medida de prevención, será empleado algún preservativo. Si no es posible utilizar un congelador adecuado, las muestras pueden ser guardadas en refrigeración con la adición de un preservativo o sin él. De preferencia en determinaciones con algunos anticoagulantes - hay que procesar la muestra y obtener un filtrado libre de proteína, adicionarle al preservativo y colocarla en refrigeración.

Habrà que evitarse el congelar y descongelar repetidas ocasiones a una sola muestra, porque es posible el ocasionar la descomposición de algún metabolito.

A continuación se establece el material y equipo considerado como necesario para este proceso.

1. Muestra sanguínea.

2. Preservativos químicos. Ejemplos de materiales, de uso corriente, son: merthiolate blanco (1:50,000), azida de sodio (0.1%) metilparabeno, etilparabeno, fenol 5%, cloruro de benzetonio, tolueno, timol, etc. Estos deben ser sustancias originalmente concentradas y puras.

3. Tubos de centrífuga. El tamaño depende del volumen de sangre.

** Existen procesos en los que se requiere determinar contenidos de glucosa en sangre completa y, por lo consiguiente se inhibe el metabolismo de eritrocitos (NaF, timol como preservativo). En caso de trabajar suero o plasma, a éstos se les agregara un preservativo, sin que ello modifique sustancialmente la concentración del metabolito.

4. Palillos de madera de aproximadamente 10 cms. de longitud.
5. Pipeta Pasteur con bulbo para gotero. (Si se involucran - grandes cantidades de suero, la pipeta es unida a un matraz filtrante y a un sistema aspirador).
6. Envase sérico, con tapa de plástico, suficientemente grande para acomodar un volumen sérico dado.
7. Centrífuga, preferiblemente refrigerada, no importando si el rotor es angular u horizontal.
8. Refrigerador o congelador grande.
9. Papel parafilm.

Proceso.

A. obtención de Suero:

1. La formación del coágulo puede acelerarse, o dejar que éste se forme espontáneamente, de acuerdo a las necesidades que el caso lo requiera. Además de que el manejo del mismo, se establece en función de las condiciones en las que se requiera obtener el fluido.

a) Si las condiciones en las que se trabaje la muestra no requiere necesariamente de esterilidad, puede inducirse a la formación del coágulo con temperatura (37°C) en 15 minutos; además, con el fin de lograr una mejor separación coágulo-fluido puede colocarse (una vez recolectada en el tubo a la sangre) un palillo de madera de longitud similar al tubo. Debe tenerse presente que, aún cuando no se utilice el palillo, los tubos que contienen sangre deben estar lo más inclinados posible en una gradilla. Este detalle nos ayudará a una posterior separación del coágulo de manera óptima.

Si la muestra sanguínea requiere de esterilidad, o su manejo no es inmediato, puede dejarse al tubo inclinado por espacio de 1 a 2 hrs. o más a temperatura ambiente; posteriormente se almacena el tubo en un refrigerador por 12 a 24 hrs. (lo cual permite mayor concentración del coágulo).

2. La separación del coágulo y del fluido puede hacerse de la forma siguiente.

- Empleando un palillo. Desde el momento que se deja coagular la sangre, hay que agregar el palillo; posteriormente, ya con el -- coágulo formado, este ha de ser girado muy delicadamente con la ayuda del palillo. Tal acción desprenderá el coágulo, y para sacarlo, - el palillo es llevado fuera del tubo muy lentamente tratando de no - tocar las paredes, con lo que se evitará cierto grado de hemólisis. Recuperado el fluido, es común que esté rojizo, por lo que hay que - proseguir con los pasos posteriormente señalados*.

- Por retracción del coágulo. Luego que se ha dejado reposar - a la sangre, el coágulo se retrae. Si esto ha sucedido, puede remover (con mucho cuidado y utilizando las paredes del tubo) el coágulo con la ayuda de un palillo o una espátula de metal. El coágulo se -- irá al fondo con lo que puede procederse a la recuperación del suero.

Si no hubiera una concentración óptima del coágulo (tal que pa rezca que no hubo retracción), o aún formándose el mismo y no se uti lize nada para despegarlo; proceda a centrifugar a 1000 x g por es pacio de 15' (si es posible a 4°C)**. Efectuado lo anterior recu pere el suero.

3. Obtención del suero. Sea el caso que fuere, recolecte el - suero empleando un pipeta Pasteur. Cuando haga uso de esta, la po sición de su punta siempre debe estar junto al menisco del fluido - a ser aspirado y a la pared del tubo. Esta precisa localización de la punta, minimizará corrientes en la fase líquida, lo que pu die- ra resuspender al sedimento.

4. Dado que siempre es deseable el tener un suero muy claro, y a menudo el suero de la primera centrifugación contiene pocos erit ro- citos o células blancas, remueva éstos por centrifugaciones repetidas

* Los tubos empleados aquí directamente, luego de haberles sacado el coágulo, se centrifugan.

** Si se emplea un radio de rotación de 14 cm. , la velocidad de cen- trifugación es de 2500 rpm.

como anteriormente ha sido descrito. Si al momento de realizar los procesos anteriores, hay turbidez (causado por la presencia de lípidos), ésta puede formar un film sobre la superficie del suero y, - si el mismo es centrifugado a aproximadamente 25 000 x g a 4°C, el film puede ser quitado por una simple filtración con papel filtro - ordinario.

Es aconsejable almacenar el suero en frascos viales de 2 ó 5 ml, repartiendo pequeños volúmenes del total en cada uno de ellos.

5. Si el suero ha de tenerse almacenado en refrigeración por sólo algunos días, es necesario el remover microorganismos o detener su crecimiento. Esto puede ser llevado a cabo por la adición de preservativos, esterilización por filtración o liofilización.

El suero puede ser almacenado por períodos de tiempo moderadamente largos, a temperatura de refrigeración, por la adición de algunos de los compuestos siguientes en concentraciones finales recomendadas.

Merthiolate	0.0001% (Una gota)
Fenol	al 0.25%
Cloruro de Benzetonio	0. 20%
Metilparabeno, 0.20%	
más etilparabeno 0.20%	una gota.
Tolueno	una gota.

El método más común para preservar suero es congelarlo a -20°C o menos.

B. Obtención de Plasma.

1. Una vez obtenida la sangre, se vierte a ésta en un tubo que contenga una gota de solución al 1% de Heparina y se hace una mezcla invirtiendo varias veces al tubo, esto hay que efectuarlo muy suavemente.

2. Para separar el plasma de los cuerpos figurados, centrifuge durante 15' a 10,000 x g.

Proceda cuantas veces sea necesario para recuperar un plasma - adecuado.

3. Continúe con los pasos 3,4,5 anteriormente mencionados para suero.

Bibliografía.

1. Garvey, S. J.; N. E. Cramer y D. H. Sussdorf. Methods in -- Immunology, 3a. Edición. Edit. W.A. Benjamin, Inc. USA. 1977.
2. Hepler, O.S. Manual of clinical laboratory methods. 4a edición. Edit. Charles C. Thomas. Illinois, USA. 1963.
3. Melby, E.C. Handbook of laboratory animal science. Vol. II. Edit. CRC Press. USA. 1974.

Capítulo IV. Apéndice 7. Elaboración de la curva de calibración.
Consideraciones Generales.

La curva estándar o curva de calibración, es una gráfica - donde se acomodan las lecturas de absorbancia contra las de concentración. Dado que tales lecturas habrán de ajustarse a la ley de Beer, el empleo de sustancias de concentraciones conocidas habrá de facilitar la construcción de una curva estándar. Estas concentraciones son seleccionadas de tal forma que al graficarlas den una línea perfecta, la cual debe de ir del origen a un punto determinado. Es muy común el no poder obtener una recta de tales características, lo que la haría ideal; por lo consiguiente, varias son las consideraciones que habrán de tomarse en cuenta a la hora de - construir las. En algunos casos es muy ventajoso el seleccionar los estándares en el límite medio y superior del rango normal para una determinación particular dada. En otros, es necesario el hacer con sideraciones de tipo matemático para el trazado de la línea ideal con su consiguiente factor de error; esto es, se aplicará a lo obtenido por la recta, el porcentaje de error o de desviación de la línea ideal. Cuando en algunos de los casos los puntos de los estándares no orientan hacia una recta, es común el aplicarles el es tudio matemático de mínimos cuadrados para ajustar a la recta y -- posteriormente (en caso de no partir del origen) hacer las obser- vaciones pertinentes de porcentaje de desviación y ajuste.

Es muy importante tomar en cuenta lo mencionado anteriormente, debido a que al momento de establecer concentraciones de sustancias problema, empleando para ello estándares de concentraciones conocidas, los resultados obtenidos no son confiables y presentan un cierto grado de error. Para poder comprender mejor lo dicho, ve remos algunos ejemplos.

1. Cuando la línea no pasa a través del origen, es posible - el emplear una simple fórmula para calcular la concentración a par tir de lecturas de absorbancia. De acuerdo a la ecuación de la rec- ta ($y = mx + b$), si la línea pasa por el origen entonces b es cero. Pero si b no fuera cero, y si y es igual a la absorbancia lo mismo

que x lo es a la concentración, reacomodando la ecuación tenemos:

$$\text{Concentración} = x = \frac{y - b}{m}$$

Para determinar m corremos dos estándares, digamos 10 y 20 - mg/100 ml para una determinación dada, las cuales tienen una absor**u**bancia de 0.080 y 0.28 respectivamente. Dado que la pendiente es $-(y' - y) / (x' - x)$, obtenemos $(0.280 - 0.080) / (20-10)$ ó 0.020 - por m . Estableciendo, ya la ecuación lineal, tenemos: $b = 0.080 - (0.020) (10) = 0.120$. En este caso la línea en el eje y se encuentra por debajo del x . Por lo que la fórmula para calcular una gran can**u**ntidad de determinaciones, viene a ser:

$$\text{Concentración del problema} = x = \frac{\text{Absorbancia del problema } (y) + 0.120}{0.020}$$

Para utilizar la fórmula, es más conveniente el utilizar una multiplicación en la que se involucre el numerador y el denomina**u**dor. La multiplicación deberá efectuarse por 1000. Entonces, si una lectura particular dá 0.120, esta será 120. Dividiendo 120 entre - 20, este producirá 12 mg/100 ml que es la concentración del proble**u**ma.

En este ejemplo, la y se interceptará con valor negativo y b vendrá a ser un número positivo. A menudo la y interceptada se**u**rá positiva y uno deberá sustraer el número constante de todas las lecturas del colorímetro y posteriormente dividirlo por la pendien**u**te o sus múltiplos por la inversa de la pendiente.

2. En algunas técnicas colorimétricas, el color lineal es ob**u**tenido en rangos más bajos y entonces, en aquellos más altos, el color curva. En estos casos, deberán ser seleccionadas una serie de ecuaciones en las que se calcule la pendiente entre los puntos sucesivos sobre la curva y usando la ecuación particular en el ran**u**go de la lectura.

3. En muchos procesos colorimétricos, el color desarrollado no es directamente proporcional a la concentración del constituyente que está siendo ensayado. Sin embargo, si los valores obte**u**

dos son reproducibles dentro del límite de precisión deseada, entonces el gráfico de absorbancia contra concentración debe ser elaborado: para ello habrán de emplearse soluciones de concentración conocida y esta curva debe ser utilizada como referencia para obtener la concentración del problema.

Al preparar una curva logarítmica; la concentración está -- siendo proporcional a $2 - \log. \% T$. Dado que un número grande de puntos son requeridos para establecer una curva y sólo dos puntos son requeridos para establecer una línea recta, uno a menudo gráfica el logaritmo de las lecturas del $\%$ de transmisión contra concentración. Es de esta forma como uno puede realmente darse cuenta si la ley de Beer está siendo seguida. Se hace conveniente el emplear el papel semilogarítmico. En este caso la curva obtenida es similar a aquella formada por graficar absorbancia vs concentración, pero excepto que la línea se inclina hacia abajo conforme se encuentra incrementada la concentración.

Bibliografía.

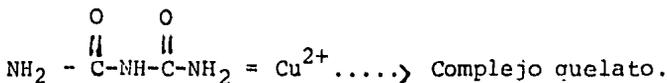
1. Natelson, S. Techniques of clinical chemistry. 3a. Edición. Edit. Charles C. Thomas. Publisher. Illinois, U.S.A. 1971.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de apoyo.

A. Determinación de proteínas¹, Método de Biuret.

La reacción del Biuret se basa en que al reaccionar un reactivo alcalino de cobre con una sustancia que contiene dos o más - enlaces peptídicos, se produce color azul debido al complejo que se forma entre el ion cúprico y dos enlaces peptídicos adyacentes.

Proteína + Cu²⁺> Complejo quelato coloreado de composición desconocida entre el ion -- Cu⁺² y grupos C = O y = N- H de los enlaces peptídicos.



En base a que la reacción del cobre con proteínas dá parecido a la del Biuret con Cu²⁺, se llama método de Biuret.

La reacción ocurre entre el ion cúprico y todos los compuestos que tengan por lo menos dos grupos NH₂CO- , NH₂CH₂- NH₂CS- y grupos similares unidos mutuamente, de modo directo o a través de un átomo de C o de N.

Aminoácidos y dipeptidos no dan la reacción. Tripeptidos, - polipeptidos y proteínas si la dan.

Metodología.

Curvas Patrón:

Se prepara un asolución de albúmina, disolviendo 1 g en --- 100 ml. de NaCl al 0.9 %.

Se rotulan tubos de ensaye del 1 al 6, adicionarse en ellos los reactivos en el orden indicado:

Reactivos.	Tubos.	1	2	3	4	5	6
1. Albumina patrón (ml).			0.1	0.2	0.5	1.0	1.4
2. NaCl al 0.9% (ml).		1.5	1.4	1.3	1.0	0.5	0.1
3. Reactivos de Biuret (ml).		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

El orden de adición de reactivos debe respetarse, agitando - bastante bien. Llevar a baño María a 50°C los tubos y leer en fotocolorímetro a 540 nm (filtro verde). El color producido es estable 1 hora.

Precipitación de proteínas para determinación de albumina.

Con una solución de sulfato de sodio al 20.0% y de sulfito de sodio al 7% a pH 7.5, se hace precipitar las globulinas del suero.

1. Adicionar en un tubo de ensaye 0.5 ml de suero problema, y poco a poco 0.75 ml de solución de sulfato y sulfito de Na.
2. Tapar los tubos e invertir 10 veces.
3. Agregar 1 ml de eter etílico, tapar.
4. Invertir o agitar lentamente 50 veces.
5. Dejar reposar 1 minuto, destapar y centrifugar 10 minutos a 2500 rpm.
6. Aparecen 3 capas (acuosa, interfase-proteínas, fase orgánica).
7. Con una pipeta Pasteur extraer la fase acuosa, en la que se encuentre la albúmina. Las proteínas precipitadas son las globulinas.

Concentración de Proteínas en la Fase Acuosa (Albumina en Suero por Biuret).

a. En un tubo de ensaye limpio, adicionar 0.5 ml. de fase acuosa, 1.0 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.9% y 1.5 ml del reactivo de Biuret. Agitar, llevar 30 minutos a 50°C y leer a 540 nm. Extrapolar en la curva patrón.

b. Adicionar en otro tubo de ensaye 0.5 ml. de suero problema, 1.0 ml. de NaCl al 0.9% y 1.5 ml. de reactivo de Biuret y agitar.

Llevar 30 minutos a 50°C y leer a 540 nm (filtro verde). Extrapolar en la curva patrón.

c. Hacer los calculos necesarios para reportar mg/kg de -- suero.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de Apoyo.

B.1. Lípidos totales en tejidos animales.¹⁰

Metodología.

1. Pesar el fragmento de tejido animal (hígado, cerebro, etc). Anotar el peso.

2. Homogenizar en mortero, agregando 2 tantos en peso de sulfato de sodio anhidro, hasta tener una papilla fina.

3. Añadir 2.5 ml de alcohol y continuar moliendo; añadir 2.5 ml. más de alcohol, obtener una papilla fina, de aspecto homogéneo.

4. Pasar la papilla con espátula a un matraz Erlenmeyer de 125 ml. enjuagando la espátula, mortero, etc. con tres porciones de 2.5 ml de alcohol, evitando así que se quede la papilla adherida.

5. Colocar el matraz, con el extracto alcoholico, a baño de agua a 37°C para extraer los lípidos (15').

6. Enfriar el matraz al chorro de agua y añadir 2.5 ml. de eter etílico con objeto de hacer más completa la extracción. Agitar el matraz y calentarlo de nuevo. "cuidado con la flama directa" ¡inflamable! (5').

7. Dejar reposar, decantar y filtrar el sobrenadante y repetir el procedimiento, agregando porciones de 5 ml. cada una de mezcla alcohol: eter (3:1); calentar con el solvente cada vez y filtrar. Desechar el sulfato de sodio y el residuo de tejido insoluble (precipitado).

8. Evaporar el eter de los filtrados, colocando el matraz en agua caliente hasta sequedad, sin olor o solventes (sobre la parrilla).

9. Enfriar el matraz y agregar 5 ml. de eter de petróleo, -- agitando para disolver los lípidos (lentamente).

10. Filtrar recibiendo el filtrado en una probeta seca, enjuagando el filtro con porciones sucesivas de eter de petróleo en tal forma que el volumen total de los filtrados se ajuste a 12.5 ml con eter de petróleo.

11. Rotular la muestra obtenida "extracto de lípidos totales del tejido X". Hasta este punto, se logra tener los lípidos de un tejido en un extracto. Para conocer la cantidad de ácidos grasos totales en ese extracto se requiere hacer uso de cálculos (posteriormente explicados).

12. Pipetear 5 ml. de extracto de lípidos totales en un matraz de 125 ml. y añadir 10 ml. de solución alcohólica de hidróxido de potasio 0.1 N.

13. En otro matraz (blanco), colocar 5 ml. de eter de petróleo y 10 ml. de KOH solución alcohólica 0.1 N.

14. Agitar los matraces y colocarlos en baño de agua hirviente, durante 30 minutos, para obtener la saponificación. Si se seca demasiado, agregar pequeñas porciones de alcohol para mantener el volumen aproximadamente constante.

15. Agregar, después de enfriar, 10 ml. de alcohol y dos gotas de fenolftaleína.

16. Títular con ácido clorhídrico 0.1 N. hasta la desaparición del color. Anotar el volumen gastado de HCl 0.1 N. necesarios para neutralizar el blanco y el problema.

Reacción de saponificación.

Triglicerido + 3 HOH> Glicerol + 3 Sal de K.

Cálculos:

Restar los ml. de KOH (0.1 N) gastados en la titulación del problema de los gastados en el blanco.

La diferencia, multiplicarlos por el milequivalente de los ácidos grasos, en promedio 265 mq. que corresponde al peso molecular del ácido palmítico $C_{16}H_{31}O_2$.

El peso inicial del fragmento de tejido se extrajo con solventes hasta un volumen de 12.5 ml. De este volumen, se toma 5 ml. para hacer las titulaciones. Haciendo una regla de tres, se tiene la relación final expresada en miligramos de ácidos grasos por gramo de hígado, o de otro tejido, que se puede convertir en gramos por ciento.

B.2. Lípidos totales séricos. Extracción por cloroformo-metanol.⁹

En un matraz volumétrico, adicionar 1 ml de suero, 8 ml de cloroformo, y 8 ml. de metanol. Mezclar agitando al colocar la mezcla en un baño de agua a 61°C. Dejar hasta ebullición, y luego se retira la mezcla del baño. Se deja al matraz enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se lleva al aforo con cloroformo, se filtra al contenido del matraz en un embudo de separación de 60 ml. Se adicionan 10 ml. de solución salina y se agita la mezcla vigorosamente. El filtrado debe ser principalmente la capa baja (cloroformo), y será efectuado a través de un papel filtro (con dobles) en un tubo de ensaye.

Se pesará a un vaso de precipitado de 20 ml. (a 0.01 de valor constante), adicionarle 10 ml. de la alícuota del extracto cloroformico. Evaporar hasta sequedad, en una platina caliente, a una temperatura constante (la temperatura debe ser constante entre -- 67-70°C). Enfriar a temperatura ambiental y pesar el vaso.

Cálculos:

Peso del residuo en el vaso de precipitado $\times 160 =$ mg de lípidos/100 ml. de suero.

Notas del Proceso:

1. La mezcla cloroformo-metanol, sirve para extraer todos los lípidos y precipitar las proteínas. El metanol se ha removido con la solución salina normal y la capa de cloroformo ha sido secada cuando se pasa a través del papel filtro.

2. Dado que fueron adicionados 16 ml de cloroformo a una alícuota dada, entonces $1 \times 10/16 = 0.625$ ml. de extracto sérico que se encuentra en la alícuota. Para encontrar la cantidad de lípidos, en 100 ml. de suero, uno necesita multiplicar los miligramos encontrados por $100/0.625=160$.

3. Hay que emplear una balanza analítica y tomar el peso por lo menos dos veces (ésto por el cambio de temperatura que puede -

sufrir el vaso al meterlo a la balanza).

4. El vaso debe ser manejado solamente con pinzas, no con las manos (dado que pueden cometerse errores de sobrepeso).

5. Deberá correrse un suero control para las muestras.

6. El extracto clorofórmico puede ser utilizado para la determinación del triglicéridos.

7. Dado que el cloroformo y el metanol tienen puntos de ebullición bajos, emplear (para evitar proyecciones) una platina caliente con control de temperatura. Hay que respetar el rango previamente mencionado. Luego de que han secado los vasos, habrá que dejarlos calentar otros 20 minutos adicionales para asegurar el completo retiro del solvente.

9. Deberá ser comprobado, posterior a los lavados de los vasos con la mezcla de solvente, su peso inicial.

B.3. Determinación de Colesterol^{4,7} (Técnica de Person Stern y Mc Gaveck).

El ácido paratoluensulfónico, en medio acético, reacciona con el colesterol para formar un complejo, que con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, se vuelve de color verde. (cuya intensidad es proporcional a la cantidad de colesterol presente).

Método.

1. Marcar dos tubos: P (Problema), B. (blanco).
2. Poner 0.1 ml. de suero al tubo P y 0.1 ml. de agua al tubo B.
3. A los tubos P y B agregarles 0.1 ml. de ácido acético glacial.
4. Agregarles 0.5 ml. de solución acético de ácido paratoluensulfónico al 12% a cada uno de los tubos.
5. Agregar a los dos tubos 1.5 ml. de anhídrido acético y no agitar.
6. Dejar la mezcla a temperatura ambiente hasta que se enfríe.
7. Añadir 0.2 ml. de ácido sulfúrico concentrado, agitar vigorosamente.
8. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente.
9. Leer en D. O a 550 milimicras (filtro verde), con el tubo B ajustar al cero de D. O1 y leer el tubo B.

Calibración.

De una solución de colesterol de 400 mg. en 100 ml. tomar - 10, 20, 30, 40 y 50 ml. y aforar a 50 ml. con ácido acético para obtener las concentraciones siguientes: 80, 160, 240, 320 y 400 - mg. en 100 ml.

Solución de Colesterol 4 mg/kg.	ml. de ácido acético glacial	mg. en 100 ml.
1. 10	50	80
2. 20	50	160
3. 30	50	240
4. 40	50	320
5. 50	50	400

De cada una de estas diluciones, tomar 0.1 y continuar como se indica en la técnica a partir de que agrega 0.1 ml. de ácido - acético glacial y 0.5 ml. de solución acético de paratoluensulfó- nico.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de apoyo.

c. Determinación de glucosa en sangre (método de Duboski)^{2,6,7}

Se determina glucosa de sangre completa, suero o plasma de un preparado libre de proteínas, obteniéndose un color verde probablemente debido a glucosilamina cuya absorbancia presenta una relación lineal entre amplios límites.

Metodología.

1. A 1.9 ml. de ácido tricloro acético al 3% se le añaden - 0.1 ml. de sangre completa con anticoagulante, teniendo cuidado de no tocar las paredes del tubo de ensayo.
2. Se agita suavemente y se deja reposar 5 minutos.
3. Se centrifuga 10 minutos a 2500 rpm.
4. Del sobrenadante que debe ser transparente, se toma 1.0 ml.
5. En otro tubo se coloca 1 ml. de agua destilada que servirá como blanco.
6. El tubo patrón se prepara colocando 1.0 ml. de solución de glucosa patrón.
7. Todos los tubos se protegen contra la luz.
8. A los tres tubos se les añaden 5 ml de reactivo de orto - Toluidina.
9. Se mezclan suavemente con cuidado y se tapan con papel - aluminio.
10. Se calienta a ebullición en un baño de agua durante 10 - minutos.
11. Los tubos se enfrían con agua.
12. Se leen las absorbancias a 630 milimicras (filtro rojo) - rápidamente.
13. Se determina la concentración de glucosa de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia patrón}} \times 200 = \text{mg. de glucosa/100 ml. de sangre.}$$

Reactivos:

Reactivo de Orto-Toluidina. 1.5 gr. de Tiourea se disuelve en 20 ml. de ácido acético glacial, se añaden 6 ml. de Orto-Toluidina y se afora a 100 ml. con ácido acético glacial, se mezcla por inversión y se almacena protegido de la luz.

Solución patrón de glucosa.

- a.- Solución concentrada Glucosa al 1% en solución saturada de ácido benzoico.
- b.- Solución diluida: 1.0 ml. de la solución anterior se diluye a 100 ml. con solución saturada de ácido benzoico.

Capítulo IV. Apéndice 9. Técnicas de apoyo.

d. Determinación de Urea⁹.

Metodología.

Con ácido Túngstico. 0.05 ml. de suero, plasma o sangre entera, son lavados con 1 ml. de agua. En caso de sangre entera esta será mezclada hasta que completamente esté hemolizada. Llevar a - 2 ml. con ácido túngstico. Posteriormente mezclar y centrifugar. A 1 ml. del sobrenadante le serán adicionados 3 ml. de ácido-diacetil (mezcla). Se calienta a 100°C en baño por 30 minutos. Se enfría la mezcla y se lee con el filtro 44 en el colorímetro Klett-Summerson. (480 nm).

Se harán dos estándares de 10 mg/100 ml. y 20 mg/100 ml. colocando 0.05 ml. y 0.1 ml. del estándar de 10 mg/100 ml. en 1 ml. de agua respectivamente. La misma pipeta será empleada para los problemas, y dos veces para el estándar de 20 mg/100 ml. Posteriormente se aforará con 2 ml. con ácido túngstico. Todo el proceso siguiente será el mismo que para los problemas. Para el blanco habrá que utilizar 1 ml. de una mezcla 1:1 de ácido túngstico y agua procediendo como en los problemas.

Curvas estándar. La concentración contra las lecturas de absorbancia deberán ser graficadas usando los dos puntos obtenidos al dibujar la línea. Si la lectura de absorbancia es aproximadamente de 0.800 (o la lectura del Klett es anterior a 400), se diluirá al problema con el blanco hasta que la lectura sea anterior a su límite superior. Determinar la concentración de la curva para el problema. Para lecturas más precisas es necesario seleccionar estándares de 10, 20, 40, 100 y 200 mg/100 ml. de estándares equivalentes.

Notas del Proceso.

1. El diacetil reacciona con la urea en una solución fuertemente ácida, produciéndose un color amarillo. La proteína debe ser eliminada antes de efectuar la prueba.

2. Para el análisis de orina, diluir 1 ml. de esta a 20 ml. y proceder como en el caso del suero. Medir 0.05 ml, etc.

3. Si se trabaja con cierta cantidad grande de muestras, es necesario establecer la proporcionalidad de los reactivos y mantenerlos constantes.

4. En lugar de hacer una mezcla del ácido, el cual se establece por solo un periodo corto de tiempo, los dos reactivos deberán ser adicionados simultáneamente.

5. Si la curva, aunque lineal, no parte del origen, deberán considerarse diluciones bajas al rango lineal.

6. La intensidad del color se incrementa con el tiempo y no alcanza su máximo hasta aproximadamente una hora a 100°C.

7. 2 ml. de diacetil en 100 ml. de alcohol, o ácido acético al 2%, debe ser sustituido por la solución de monoxima. El diacetil, dadas sus características, debe ser guardado en el refrigerador.

8. La dimetil glioxima (diacetil dioxima), en ácido acético al 2%, será usado cuando se requiera; pero, necesita de aproximadamente una hora de calentamiento previo a la prueba.

Reactivos.

1. Acido Tungstico. (a.) Tungstato de sodio al 2.2%. 22 g. de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es llevado a un litro. (b) Acido sulfúrico 0.15 N: -- 4.17 ml. de ácido concentrado (gravedad específica 1.84) es llevado a 1 litro. En el día de la prueba se mezclan partes iguales de (a) y (b).

2. Sulfato de Zinc (0.2 M). 57.7 g. de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ son disueltos y aforados a 1 litro de agua.

3. Hidróxido de Bario (0.06 M). 10.3 g. de hidróxido de Bario anhidro (18.9 g. del octahidratado) son adicionados a 500 ml. de agua. Una vez disuelto, se afora a 1 litro con agua destilada. Esta preparación debe estar almacenada y preservada del CO_2 atmosférico.

4. Diacetil monoxima (al 2% en ácido acético al 2%). Adicione 2 g. de diacetil monoxima en 50 ml. de agua y mezcle. Adicione 0.1 ml. de solución stock de urea (1 mg N/ml.). Adicionarle 2 ml.

de ácido acético glacial, mezclar y aforar a 100 ml. La solución es estable indefinidamente si está en frío y en un lugar oscuro.

5. Mezcla ácida. (fosfórico-sulfúrico). A 700 ml. de agua - adicione 250 mg. de sulfato de amonio férrico y 750 ml. de ácido fosfórico al 85%. Se mezcla bien y se les adiciona lentamente (y - con mezclado) 250 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

6. Mezcla de diacetilácido. A una parte de diacetil adicionarle 4 partes de la mezcla de ácido (ácido sulfúrico-fosfórico). Se mezclan bien. Estable por 3 horas solamente a temperatura ambiente.

7. Urea standard stock. (1 mN/ml.). Disolver 2.144 g. de urea secada en un desecador, y llevar a 1 litro. La solución será guardada en el refrigerador (con tolueno como preservativo).

8. Standard de trabajo (10 mg. urea N/100 ml.). Diluir el stock de urea 1:10 en agua, posteriormente se guardará en el refrigerador y se le agrega tolueno.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de apoyo.

e. Determinación de Amino. Ácidos sanguíneos.⁹

Proceso.

Mezclar 0.05 ml. de plasma sanguíneo o suero en 0.2 ml. de agua. Se le adiciona 1.0 ml. de ácido tungstico. Posteriormente, - se mezclará y centrifugará a 2000 rpm. A una alícuota de 1 ml., en un tubo con una marca en 2 ml, se le adicionan 0.2 ml. de solución de bórax al 2%. Mezclar, luego se le adicionarán 0.1 ml. de NaOH 1N. El pH debe encontrarse entre 8.7 y 8.9, comprobado con una papel - pH de rango corto o con un potenciómetro. Mezclar, ahora adicionar 0.1 ml. de solución de beta-naftoquinona sulfonato de sodio. Agitar bien la mezcla, y calentarla 10 minutos a 100°C. Enfriar a temperatura ambiental. Adicionar posteriormente 0.25 ml. de buffer de ácido acético seguido de 0.25 ml. de solución de tiosulfato de sodio. El color será leído a 480 nm en el espectrofotómetro Beckman; a - 470 nm del espectrofómetro Coleman, o con el filtro 47 (color ver de) del colorímetro Klett Summerson.

El blanco comprende a 1 ml. de alícuota dada de una mezcla - de 0.2 ml. de agua y 1 ml. de ácido tungstico, y será tratado como la alícuota del problema. 0.005 ml. de estándar de nitrógeno de aminoácido (concentración de 10 mg/100 ml.) serán empleados para - el estándar y serán tratados como al problema; adicionándoles 0.2 ml. de agua, 1 ml. de ácido tungstico, etc.

Cálculos:

Abs. del problema

$$\frac{\text{abs. del problema}}{\text{abs. del estándar}} \times 10 = \text{N aminoácido mg/100 ml.}$$

Notas del Proceso.

1. Pueden emplearse 0.02 ml. medidos directamente de la he- rida, los cuales pueden ser analizados de la misma forma: pero hay que diluir y leer el color en cubetas con una longitud de paso de la luz de 5 cm. (capacidad de 3.5 ml.) para el espectrofotómetro -

Coleman, o directamente en las cubetas de 4 cm. de longitud para el paso de luz del colorímetro Klett-Summerson.

2. La 4-sulfonato de beta-naftoquinona sódica se descompondrá lentamente si se encuentra seca. Entonces, el reactivo debe ser rosado cuando se prepara. Filtrando con carbón activado se retirará al color rojo. Este reactivo debe ser empleado recién preparado.

3. La lectura tendrá que ser tomada antes de media hora, dado que después de éste tiempo la muestra tiende a perder color.

4. En el caso de orina, hay que agregar 9 ml. de ácido túngstico a 1 ml. de orina. Se mezclará y filtrará o centrifugará para eliminar las proteínas. A 5 ml. del filtrado, le serán adicionados 1 ml. de solución de borax al 2%, luego se agregará una solución de NaOH 1 N. El pH debe estar entre 8.5 a 8.9. Si es necesario, la muestra será ajustada y se evaporará a la mitad de su volumen. Con esto se hidrolizan las amidas que se encuentran en la orina, tales como urea, así como se remueve al amoníaco. Si las lecturas llegaran a ser elevadas, habrá que reconstituir el filtrado.

Reactivos.

1. Solución de NaOH (1 N). Se adicionan 4 g. de NaOH en 100 ml. de agua.

2. Borato de Sodio (2%). 2 g. del decahidrato (borax) son disueltas en 100 ml. agua.

3. Beta-naftoquinona 4-sulfonato de sodio (0.5%). Disolver 500 mg. en 100 ml. de agua. Esta debe ser de un color amarillo pálido. Como el reactivo no es estable, se guarda en congelación dividido en pequeñas cantidades. Posterior al descongelamiento, el reactivo no empleado, será desechado.

4. Buffer de ácido acético-acetato. Mezclar 100 ml. de ácido acético al 5% (50 ml. de ácido acético glacial más 50 ml. de agua) con 100 ml. de acetato desodio al 5% (5 g. del trihidratado a 100 ml. con agua).

5. Tiosulfato de Sodio (4%). 4 g. del pentahidratado son disueltos en 100 ml. de agua.

6. Estándard de Nitrógeno de Aminoácido. (10 mg/100 ml). ---

187.8 mg. de prolina y 412.8 mg. de glicina son llevadas a 1 litro con HCl N/10 el que contiene 2 g. de ácido benzoico.

7. Acido tungstico. Volúmenes iguales de ácido sulfúrico -- 0.15 N y 2.2% de tungstato sódico serán mezclados el día de la prueba.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de apoyo.

f. Determinación de bilirrubina^{1,4,8,9}.

Mientras que las vías metabólicas exactas de producción de bilirrubina son líneas de especies definidas, es importante que - aproximadamente el 85% del contenido sérico de esta sustancia resulte de la destrucción de eritrocitos senescentes por el Sistema Retículo Endotelial. El 90% de la bilirrubina sérica total está enlazada a la albúmina para transportarse al hígado, donde se detoxifica para conversión a un glucurónido. Si la bilirrubina no pasó a través del hígado, pero es el resultado de la hemólisis (hemobilirrubina) esta continuará enlazada a dicha proteína hasta ser posteriormente degradada. Esta última se definirá como bilirrubina libre, o no conjugada o indirecta. Para el caso de la bilirrubina esterificada, son dos los sinónimos que se le han atribuido: conjugada o directa.

De las consideraciones generales en el manejo de muestras para la determinación del metabolito presente, se pueden mencionar - las siguientes:

- Las muestras obtenidas deben ser analizadas inmediatamente luego de su colecta, debido a que la bilirrubina es fotolábil.

- En caso de no ser posible el análisis inmediato, las muestras deben ser almacenadas, protegidas de la luz y en el refrigerador por lo máximo dos o tres días; así mismo, si se emplea la congelación, ésta debe ser por aproximadamente nueve días.

- A pesar de que existen numerosos métodos para la determinación de bilirrubina, todos se dividen básicamente en aquellos - que usan un medio acuoso (reacción directa) y aquellos métodos que emplean un acelerador (reacción indirecta).

- Debe considerarse que los niveles de bilirrubina están influenciados por la edad del organismo, así como deben estar influenciados por variación diurna. Aunque esto sucede, se ha visto que - las variaciones en especie no son de gran magnitud.

A continuación describiremos algunas técnicas empleadas, así

como las consideraciones que se indican en cada una de ellas. (cada técnica varía según el autor, en caso de seleccionar alguna tenga presente las recomendaciones indicadas).

Van den Bergh. (Método colorimétrico de Thannhauser y Anderson)².

A. Principio. El examen depende del acoplamiento de diazobencensulfocloruro (reactivo diazo de Ehrlich) con la bilirrubina del suero y la producción de un color rojo debido a la formación de acetofenolazobilirrubina. El tiempo de la aparición y el depósito de este color indica el tipo y el grado de bilirrubina. Si la bilirrubina es conjugada, debe reaccionar directamente con el reactivo diazo (Reacción directa). En caso de ser la bilirrubina no conjugada, reaccionará solo con el reactivo diazo luego de que las proteínas, con las cuales se ha combinado, han sido precipitadas con alcohol (Reacción indirecta); aún cuando a éste último tipo de bilirrubina se le denomina indirecta, debe ser designada como bilirrubina total ya que incluye ambos tipos de bilirrubina (esto, por que efectúan la reacción directa e indirecta).

B. Consideraciones Generales.

1. La Sangre debe encontrarse libre de hemólisis.

C. Método.

1. Coloque 2 ml. de suero claro en un tubo de centrífuga de 15 ml. agregue un ml. de reactivo diazo recién preparado.

2. Reacción directa (cualitativa).

a. Rápido.- el cambio de color inicia dentro de 30 segundos y alcanza su desarrollo total en un minuto.

b. Retardo.- el cambio de color inicia luego de 30 segundos y requiere de 10 minutos para alcanzar su máximo.

c. Bifásico.- el color aparece prontamente pero requiere 10 minutos para alcanzar su máximo.

d. Si no hay desarrollo del color, es posible que no haya la suficiente bilirrubina que se manifieste durante la reacción indirecta.

3. Reacciones indirectas (bilirrubina total).

a. Adicionar 2 ml de solución de sulfato de amonio saturado y 10 ml. de alcohol al 95% al tubo de centrifuga utilizado para reacción directa.

b. Se tapa el tubo, y por inversión se mezclará el contenido. Posteriormente éste deberá ser centrifugado.

c. Estándard.

1) Pipetear 5 ml. de solución diluída estándar en un embudo de separación de 60 ml., se adicionan 5 ml. de solución de tiocianatopotásico al 20% y 20 ml. de eter.

2) Mezclar bien y luego recuperar la capa más baja del fluido, dejando el eter sobrenadante.

3) Estandarize el colorímetro inmediatamente con el extracto de eter.

d. El problema (extracto alcohólico superior) será leído inmediatamente con el estándar seleccionado a 20 mm.-

Cálculos:

$$\frac{\text{Lectura del estándar (LE)}}{\text{Lectura del problema (LP)}} \times 0.5 \times \frac{15}{2} = \frac{75}{(LP)} = \text{mg. \% de bilirrubina.}$$

D, Soluciones.

1. Bilirrubina artificial estándar.

a. Solución Stock.

1) Disolver 0.1508 gr. de alumbre de amonio férrico en 50 ml. de HCl concentrado, en un matraz volumétrico de 100 ml. y llevar al volumen con agua destilada.

b. Solución estándar diluída.

1) Adicionar (25 ml. de HCl concentrado) a 10 ml. de la solución Stock, a un matraz volumétrico de 250 ml. y diluir al volumen con agua destilada.

2) Esta solución puede ser guardada indefinidamente en un recipiente de vidrio obscuro y bien tapado (sólo se guarda por 6 meses).

3) Representa 0.5 mg. de bilirrubina en 100 ml. de suero.

2. Reactivo Diazo.

a. Solución A. Disolver 5 g. de ácido sulfanílico en 50 ml. de HCl concentrado en un matraz volumétrico de 1 litro, se aforará con agua destilada.

b. Solución B. Disolver 0.5 g. de nitrito sódico en 100 ml. de agua destilada y posteriormente se guardará en un recipiente obscuro en el refrigerador.

c. Preparar el reactivo diazo de manera inmediata, previo a la realización del examen, por adición de 24.2 ml. de solución A a 0.8 ml. de solución B.

3. Solución saturada de sulfato de amonio. A 100 g. de esta sal adicionele 100 ml. de agua destilada.

4. Solución de tiocianato potásico. Esta será preparada al 20%.

Método de micromedición de Bilirrubina⁷

Consideraciones Generales y Fundamentales. Esta técnica es muy aplicada cuando no se puede contar con volúmenes grandes de plasma o suero, y en donde en ocasiones la hemólisis es relativamente frecuente; en éstos casos el método exacto para la medición de la bilirrubina, consiste en medir la Densidad Óptica del plasma o suero diluidos en dos longitudes en onda, 457 y 412 nm.; de preferencia en un espectrofotómetro de banda estrecha, utilizando luego las lecturas obtenidas en una fórmula que permite corregir los valores de absorción en la longitud máxima de la bilirrubina, en función de la presencia de la Hemoglobina. En caso de no poder contar con aparatos precisos, debe aceptarse cierto grado de error experimental. Para macromedición de bilirrubina, puede emplearse el método clásico de Van den Bergh, diluyendo de 0.1 ó 0.2 ml. de plasma hasta 1.0 ml. con solución salina o solución amortiguadora y multiplicando el resultado final por 10 ó por 5 respectivamente. Los resultados que se obtienen son casi siempre bajos, por pérdida de azobi-

lirrubina por absorción sobre la protefina precipitada, y también - por la interferencia debida a la hemólisis, Existen micrométodos con mejores resultados, excepto que presentan características que los hacen difíciles de emplear o más conflictivos para las cuantificaciones. P. ej. Coloraciones de muy baja intensidad, excepto - por demasiada bilirrubina, así como problemas de turbidez (método de Malloy y Evelyn); otro ejemplo puede verse con que la formación de la coloración de rápida, así como su desaparición (Método Powell) La técnica posteriormente mencionada da resultados estrechamente semejantes a los de las técnicas puramente espectrofotométricas; - puede ser empleado con fotómetros de filtro o espectrofotómetros, y resulta exacto para niveles de bilirrubina de 4.0 mg. por 100 ml. o más.

Método.

Nota: La heparina utilizada para recoger el plasma no debe - tener una concentración mayor de 1000 unidades por ml., y el tubo de plástico donde se recoja la muestra deberá estar bien seco antes del uso; un exceso de heparina enturbia la solución final de lectura.

1. Se preparan tres tubos de ensaye que se rotulan total, directa y blanco.
2. Se prepara el reactivo diazodico especial (Ver reactivos).
3. A los tubos total y directa se añaden 2.0 ml. de dicho -- reactivo.
4. Al tubo blanco se le añaden 2.0 ml. de la solución especial A.
5. A cada tubo se añaden 0.1 ml. de plasma o suero con una micropipeta. Si no se tiene una cantidad suficiente de plasma o suero, puede omitirse el tubo directo. Se mezcla por agitación lateral.
6. Al tubo directo se le añaden 2.0 ml. de agua destilada y se mezcla.
7. A los tubos totales y blancos se añaden 2.0 ml de Metanol al 90% v/v; se mezclan los contenidos.
8. Se deja reposar con luz tenue durante 10 minutos exacta-

mente.

9. Se leen las densidades ópticas de los tubos totales y directa a 570 nm. (con un filtro verde cuya transmisión máxima se sitúa entre 560 y 580 nm), estableciendo el 0 con el blanco.

10. Las lecturas que da el instrumento, se transforman a valores de bilirrubina, refiriéndolas a una curva de calibración preparada; tratando volúmenes de 0.1 ml. de soluciones patrón de bilirrubina en suero sintético como el tubo total.

Reactivos.

- Solución especial A. Acido sulfanílico al 0.2% p/v en HCl 0.2 N.
- Solución B. Nitrito de Sodio al 0.5% p/v en agua destilada.
- Reactivo Diazónico especial. Se mezcla 20 ml. de solución especial A con 1.0 ml. de solución B.
- Metanol al 90% v/v.

Estandarización de las mediciones de bilirrubina en suero o plasma.

- La absorbancia molar de la bilirrubina en cloroformo, a 453 nm, debe situarse entre 59100 y 62300.
- La bilirrubina debe ser disuelta en un suero tipo, empleando un suero mezclado que, diluido 25 veces con solución de cloruro de sodio al 0.85%, tenga una absorbancia inferior a 0.100 con una cubeta de 1 cm. a 414 nm., e inferior a 0.040 a 460 nm. La técnica de preparación de la solución patrón de bilirrubina es: Una cantidad de bilirrubina, pesada con exactitud, se disuelve completamente, en el menor tiempo posible (menos de 5 minutos) en luz tenue, a temperatura ambiente, en solución de Carbonato de Sodio M/10 (el volumen de esta solución se escoge de manera que represente 2% del volumen final del patrón cuando se haya terminado de preparar). La solución roja transparente se diluye inmediatamente con un "diluyente de suero aceptable", hasta un volumen final que de una concentración final no inferior a 5 mg/100 ml.

El suero empleado para preparar los patrones se obtiene juntando en un frasco de plástico, en el refrigerador, todos los sue-

ros transparentes, sin ictericia ni hemólisis, de muestras en el laboratorio con otros fines. Se necesitan unos 250 ml. Antes del uso, puede ser necesario aclarar el suero mezclado, haciéndolo pasar por algún filtro adecuado. Toda la técnica de preparación durante la preparación del patrón, y su empleo para calibrar las técnicas de medición de bilirrubina que vayan a ser utilizadas, debe llevarse a cabo en el menor tiempo posible, pues la bilirrubina disuelta es sensible a la luz.

El patrón inicial debe consistir en 20 mg. de bilirrubina pura, disueltos en 2.0 ml. de soluciones de Bicarbonato de Sodio M/10, aforando con diluyente de suero. A partir de ésta solución concentrada, pueden prepararse rápidamente con el suero en cuestión otros patrones diluidos cuyo empleo se puntualiza más adelante. Si se aplican métodos de medición de bilirrubina sérica, distintos de los descritos, los patrones empleados para la calibración deberán cubrir la gama de valores en la cual el método empleado de una relación lineal entre las lecturas de absorbancia y las cifras de bilirrubina. Esto dependerá de las reacciones químicas involucradas, del tipo de espectrofotómetro y del tamaño del tubo o la cubeta.

Examen de Van den Bergh (Determinación de Bilirrubina total y glucurónido de Bilirrubina)⁹.

Método.

Adicionar 0.1 ml. de suero para cada uno de los cuatro tubos de ensaye, conteniendo 1 ml. de agua. Márquelos "blanco total", "desconocido total", "Glucurónido desconocido".

Total. Al tubo blanco total se le adicionan 0.3 ml. de la solución de ácido sulfanílico. Al tubo desconocido total se le agrega 0.3 ml. del reactivo diazo. Se mezclan y adicionan rápidamente 1.5 ml de metanol a ambos tubos, se lee a cada desconocido contra su propio blanco (tal caso en aplicado luego de haber dejado reposar por treinta minutos) a 540 nm -Filtro 54 en un fotoclórimetro Klett Summerson-.

Glucurónido. Adicionar 1.5 ml. de agua a los tubos glucurónico blanco y desconocido. Adicionar 0.3 ml. de ácido sulfanílico

al blanco y 0.3 ml de reactivo diazo al desconocido. Se deja reposar por 10 minutos. Al leer cada problema hay que hacerle contra su propio blanco.

Estándard. A los dos tubos hay que adicionarles 0.1 ml. del estándar de bilirrubina (5 mg/100 ml.). Adicionar 0.3 ml. de ácido sulfanílico a uno marcado con blanco y 0.3 ml. de reactivo diazo a otro marcado estándar. Se deja reposar 30 minutos y luego se lee el estándar contra el blanco a 540 nm.

Cálculo:

$$\frac{\text{Absorbancia del desconocido}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 5 = \text{mg. bilirrubina/100 ml.}$$

Examen de Van den Bergh (Determinación de bilirrubina total. Para ictericia neonatal)⁶.

Método.

Lavado 0.025 ml. de suero en 1 ml. de agua (dos tubos, marcar uno como blanco). Adicionar 0.3 ml. de ácido sulfanílico (al 0.1%) al blanco, así como 0.3 ml. del reactivo diazo al problema. Luego agregar 1.5 ml. de metanol a cada tubo y dejarlos en reposo por 30 minutos. Leer los tubos a 500 nm. (filtro 50 en el fotocolorímetro Klett Summerson).

Cálculo:

Consultar el proceso anterior.

Consideraciones.

(1) Pueden emplearse de 0.1 ml. cuando los valores sean un poco más elevados o normales. Dado que los volúmenes de suero son reducidos por un factor de cuatro, multiplicando el resultado por cuatro; usando los cálculos como anteriormente se explicaron cuando se haga el proceso con 0.025 ml.

(2) El ácido sulfanílico y el reactivo diazo necesitan ser -

adicionados antes de agregar el metanol. Esto se realiza para evitar la precipitación de proteína con la resultante turbidez.

(3) Si posterior al desarrollo de color, la solución es alcalinizada con unas cuantas gotas de solución de NaOH, un color amarillo se formará y éste deberá ser leído con un filtro de 420 nm. Esta determinación es ocho veces tan sensitiva como para el caso de la formación del color violeta. Sin embargo, la hemólisis interfiere. Si tal hemólisis fuera ligera, no interfiere en el examen convencional.

(4) La proteína debe ser precipitada y centrifugada para producir un color azul con un máximo de absorción a 580 nm. En un proceso típico para la bilirrubina total, 0.025 ml de suero será lavado con 0.3 ml de reactivo diazo (0.3 ml de ácido sulfanílico para el blanco). Se dejará reposar algunos minutos, para que posteriormente sea adicionado un volumen de 0.1 ml de HCl concentrado, 0.2 ml de sulfato de amonio saturado en agua y 2 ml de alcohol etílico a cada tubo. En el momento de ir agregando cada sustancia es necesario el ir aplicando agitación a cada tubo. Luego, la mezcla será dejada reposar durante 15 minutos y con agitaciones ocasionales, para inmediatamente después ser centrifugada; el sobrenadante será recuperado y leído a 580 nm (con un filtro 56 para fotocolorímetro Klett-Summerson).

(5) El nivel del glucurónido dividido por el total y multiplicado por 100, es el glucurónido en por ciento. Esto tendrá que ser empleado para distinguir entre un proceso hemolítico y el llamado regurgitivo de ictericia.

(6) El estándar será usualmente leído, y necesariamente, el día de su preparación.

Reactivos.

(1) Estándar de bilirrubina (5 mg/100 ml). Se disuelven 5 mg de bilirrubina en 100 ml de cloroformo.

(2) Solución de Nitrito de Sodio (0.5%). 0.05 g de nitrito de sodio, serán disueltos en 100 ml de agua.

(3) Solución de Acido sulfanílico (0.1%). 1 g. de ácido sulfanílico será diluido a un litro en ácido clorhídrico 0.18 N.

(4) Solución de Acido Clorhídrico (0.18 N). 15 ml de ácido - clorhídrico (12 N) será diluido a un litro con agua destilada.

(5) Reactivo Diazo. 0.3 ml de la solución de nitrato de sodio al 0.5 %, son adicionados a 10 ml de la solución 0.1% de ácido sulfanílico. Se le deja reposar por 5 minutos y se aforará antes de ser utilizada.

(6) Alcohol metílico absoluto. Metanol anhidro.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de Apoyo.

g. Determinación de Urobilinógeno (En heces y orina)⁹

Método.

A una alícuota de orina, le son adicionados, en un matraz Erlenmeyer, 9 ml de agua, posteriormente se agregarán 1.0 g de sulfato ferroso; y la mezcla será agitada hasta disolver el contenido. Inmediatamente después, adicionar 6.3 ml de NaOH al 10% y calentar la mezcla a 50°C por 15 minutos con agitaciones adicionales. Pasado el tiempo de calentamiento, la solución deberá ser filtrada. Tomando una alícuota de 5 ml del filtrado, en un matraz Erlenmeyer de 25 ml y con la ayuda de una varilla de vidrio, se adicionarán 0.5 ml de HCl 5N y 1 ml del reactivo de Ehrlich. Para el desarrollo del color, la mezcla debe estar en reposo durante 5 minutos, y previamente habrá sido bien homogeneizada. Posteriormente se adicionarán 10 ml de cloroformo, y se coloca en agitación por 10 minutos. Pasado el tiempo, se recuperará el sobrenadante, el cual será examinado y desechado. El color rosa formado en la capa de cloroformo, será examinado para su valor de absorbancia con el filtro 56 - para el fotocolorímetro Klett-Summerson, o a 560 nm en el espectrofotómetro. Para el blanco hay que utilizar 4 ml de agua como si fuera la orina. En el caso del estándar, hay que seguir los procedimientos recomendados para los reactivos.

Si lo que fuera a examinarse, son las heces, pesar 1 g. (o aproximadamente 1/100 de lo depositado en 24 horas), en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, y se llevarán a 50 ml con agua. La emulsificación se logrará si se aplica agitación. Posteriormente serán adicionados 2 g de sulfato ferroso disuélto en 40 ml de agua. Se mezcla, y se adicionan 10 ml de NaOH al 10%. Hecho lo anterior, la mezcla será calentada a 50°C por 15 minutos con agitaciones ocasionales. Se filtrará el contenido, y se toma una alícuota la cual se procesará como se ha indicado para la orina.

Cálculo para la orina:

$$\frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia estándar}} \times \text{factor} \times 7.5 = \text{mg de urobilinógeno/100 ml de orina.}$$

El factor será 0.387 o 0.6 dependiendo de que haya sido empleado como estándar (fenolftaléina o pontacyl respectivamente).

$$\frac{\text{Orina expulsada a las 24 hrs (ml)}}{100} \times \frac{\text{mg urobilinógeno}}{100} =$$

=Urobilinógeno expulsado a las 24 hrs.

Cálculos para heces.

$$\frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{factor (como en orina)} \times 200 =$$

=mg Urobilinógeno en heces a las 24 hrs.

$$\frac{\text{Peso de la muestra a las 24 hrs.}}{100} \times \frac{\text{mg urobilinógeno}}{100 \text{ g heces}} =$$

=mg Urobilinógeno en heces a las 24 hrs.

Consideraciones Generales.

(1) El urobilinógeno, como se ha determinado anteriormente, se refiere a aquellas sustancias en la orina y las heces las cuales reaccionan con el reactivo de Ehrlich para producir un color rosa soluble en solvente orgánico.

(2) Si el porfobilinógeno no se encuentra en cantidades significantes, la extracción de cloroforno debe ser omitida. En este caso, la solución acuosa será diluída a 10 ml antes de efectuar la lectura. La presencia del porfobilinógeno está detectada cuando la sustancia rojiza no hace soluble en el cloroformo. Si la capa acuosa es rosa, hay que extraer con una segunda porción cloroformo y mezclar los extractos. El resultado será multiplicado por 2 para corregir la dilución.

(3) La urobilina está siendo reducida a urobilinógeno en presencia del sulfato ferroso. El urobilinógeno reacciona con el reactivo aldehídico de Ehrlich. La urobilina se coloreará lentamente de amarillo a café. Si cualquiera de éstas sustancias son empleadas, -

ellas serán preferidas sobre los estándares artificiales.

(4) Las heces deben ser secadas por aeramiento a 70°C durante toda la noche, para ello habrá que ser empleada una estufa y - cajas Petri cubiertas. La muestra tendrá que ser pulverizada (500 mg), triturada con agua en un mortero y diluída posteriormente a - 100 ml para su análisis. Con esta forma se obtiene un muestreo mas eficiente. Las heces secadas a antes de 70°C no producen olores de sagradables.

(5) La estercobilina indica el urobilinógeno obtenido de las heces, lo cual está acorde a las nomenclaturas. El urobilinógeno - es la mezcla de la bilirrubina y el urobilinógeno. La oxidación produce las urobilinas.

(6) Puede efectuarse un examen semicuantitativo de la forma siguiente: Se harán diluciones seriadas de la orina (1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc). Para cada 5 ml de cada dilución, se le adicionan 0.5 ml de reactivo de Ehrlich. Se anotará la última dilución en la cual se observe un ligero color rosa. La orina normal producirá por lo menos en 1:8 y no mas que 1:32 tal color. Si color observado se encuentra antes de la dilución 1:32, el nivel está considerado como elevado. Si el color está solamente en la dilución 1:4 o menor, el urobilinógeno está bajo. Si la bilis se encontrara presente, adicionar un volumen igual de cloruro de Bario (105 mg en agua), se filtra posterior la solución y se aplicará el examen sobre el filtrado.

(10) En el proceso, 1 g de heces se diluirá a 100 ml. El urobilinógeno, en 5 ml de esta solución, eventualmente termina en un volumen de 10 ml. La dilución entonces es $100 \times 2 = 200$. Lo cual - explica el factor para las heces en los cálculos. Para la orina, 6 ml de orina son diluídos a 22.3 ml y 5 ml de esta solución, son extraídos con 10 ml de cloroformo. La dilución total es de 44.5. Si se divide por el volumen original de 6 ml; se obtendrá un factor - de dilución de aproximadamente 7.5.

(11) La reducción debe ser efectuada por la disolución de 100 mg de ácido ascórbico en 10 ml de orina. Se deja reposar por 5 minutos, y se filtra a la solución. El desarrollo de color en 2 ml de esta solución, por la adición de 0.5 ml de HCl y 1 ml del reactivo de Ehrlich, será obtenido como en el caso anterior; éste color será

extraído como anteriormente se había propuesto. El factor de dilución, para este caso, es 5.

Reactivos.

1) Hidróxido de Sodio al 10%. 50 g de NaOH se llevan a 500 ml, con agua, hasta el aforo.

2) Acido Clorhídrico 5 N. 50 ml de HCl concentrado, son llevados hasta la marca con 120 ml de agua.

3) Reactivo de Ehrlich. 0.7 g de p-dimetilaminobenzaldehído serán disueltos en una solución hecha de 100 ml de agua y 150 ml de HCl concentrado.

4) Estándard. a. A 1 ml de fenolftaleína al 0.05 % en alcohol etílico(50 mg/100 ml), le son adicionados 5 ml de Na_2CO_3 (saturado al 20%). Se diluye a 100 ml con agua. El color es equivalente al obtenido por el tratamiento de 387 microgramos de urobilinógeno con el reactivo de Ehrlich; posteriormente se llevará a 100 ml, y se leerá contra un blanco de agua.

b. Es recomendable el adquirir una solución de colorante de Pontacyl, mezclados equivalentes al tratamiento de 600 microgramos de urobilinógeno con el reactivo de Ehrlich, éste será llevado a 100 ml. La solución se hace disolviendo 95 mg de Pontacyl violeta 6R, con 5 mg de Pontacyl Carmín 2 B en un litro de ácido acético al 0.5 %, y posteriormente diluida con un volumen de 20.4 a 100 ml de ácido acético al 0.5 %. Se deberá leer contra un blanco de agua.

c. Si se adquiere el urobilinógeno o la urobilina, éstos serán empleados como una solución de 2 mg/100 ml hecha con HCl 0.1 N, de los cuales sólo 4 ml son tratados como para la orina. Para tal situación los cálculos serán:

$$\frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia estándar}} \times 2 = \text{mg de urobilinógeno/100 ml.}$$

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de Apoyo.

h. Determinación de cuerpos cetonicos⁴. Examen de Rothera para la detección de acetona y ácido diacético.

Principio. El nitroprusiato de sodio (nitroferricianuro de sodio) se descompone a $Na_2Fe(CN)_6$, $NaNO_2$ y $Fe(OH)_3$ en una solución alcalina. Estos químicos son fuertes agentes oxidantes, y en la presencia de ácido diacético y acetona, producen un complejo que presenta un color rosa púrpura. El sulfato de amonio actúa como un buffer manteniendo la alcalinidad dentro del rango en el cual el complejo tiene un color púrpura. El examen es de 15 a 20 veces mas sensitivo para el ácido diacético, que para la acetona.

Método.

1. A 5 ml de orina fresca, se le adicionan cristales de sulfato de amonio hasta saturar (aproximadamente 1 gramo).

2. Adicionar dos gotas de reactivo de nitroprusiato de sodio y mezclar completamente.

3. Recubrir la mezcla con hidróxido de amonio.

4. Si la acetona está presente, un color rojo púrpura será desarrollado en la línea de contacto. El color no debe aparecer hasta después de los 10 ó 15 minutos de agregar los reactivos.

5. El anillo tiende a ser mas rojo, que púrpura, en bajas concentraciones. Un color púrpura definido aparece con 2 mg por ciento de ácido diacético (expresado como acetona) y a 30 mg de acetona.

6. La orina colectada, luego de una comida pesada, debe dar un color purpurento o violeta dentro de 30 segs, lo cual permanece en el rango de 3 a 4 minutos; ésto no es una prueba positiva.

7. Uratos amorfos deben dar un color café o naranja.

8. Reactivo de nitroprusiato de sodio:

Nitroprusiato de sodio (Nitroferricianuro)

cristales 10 g

Acido sulfúrico concentrado 2 ml

Agua destilada a la marca 100 ml
Guárdese en un recipiente ámbar.

Examen de Gerhardt para ácido diacético.

Método.

1. A 5 ml de orina fresca en un tubo de ensaye, se le adicionan una solución de cloruro férrico, gota a gota, hasta que todos los fosfatos sean precipitados.

2. Si es necesario, se filtrará y se adicionará mas cloruro férrico.

3. Si aparece un color rojo vino, este indica la presencia - posible de ácido diacético, aunque pueden alterar la positividad de los resultados sustancias como: salicilatos, fenol, antipirina y bicarbonato de sodio, los cuales dan un color similar.

4. Si es obtenido este color rojo, debe repetirse el examen con una porción de la orina fresca de la manera siguiente:

a. A aproximadamente 5 ml de orina en el tubo de ensaye, se le adicionan un volumen igual de agua y una gota de ácido nítrico. La mezcla se lleva a ebullición, hasta recuperar el volumen original.

b. Enfriar y agregar cloruro férrico, como anteriormente se ha mencionado.

c. Embullendo se eliminará el ácido diacético, además de que si no existe un color rojo en éste segundo examen, el ácido diacético debe encontrarse en la orina, y el examen es positivo para el ácido diacético.

d. Este examen es positivo en una concentración de 100 mg por ciento de ácido diacético (expresado como acetona).

Capítulo IV. Apéndice B. Técnicas de apoyo.

i. Recuento de Glóbulos rojos⁷

El recuento de los eritrocitos es una medición fundamental en el laboratorio clínico. Aún cuando en la práctica habitual sólo se aplica a los elementos figurados, esta misma técnica permite el cuantificar cualquier tipo de cuerpos aislados pequeños. P. ej.: Espermatozoides. Presenta principios generales, en donde el empleo de una solución como líquido de dilución, permite la cuantificación de tales corpúsculos; además preserva su morfología. Y por otro lado, hace uso de una cámara de recuento de glóbulos, con lo que se establece la concentración de los corpúsculos por unidad de volumen.

En el caso de emplear una cámara, lo común es hacer uso de la conocida con el nombre de Newbauer. Para el recuento de glóbulos rojos, habrá de utilizarse la porción de cuadros centrales y más pequeños.

En el empleo del líquido de dilución, lo que se hace es diluir 200 veces la sangre de un líquido isotónico que impide la coagulación, y la formación de grumos.

Para el recuento de los eritrocitos, con pipeta de dilución para glóbulos rojos, recomendamos se proceda a lo siguiente:

1. Empleando una pipeta de Thoma, se aspira sangre (ya sea directamente de la punción o de la mezcla homogénea de sangre completa) hasta la señal 0.5, asegurándose que la columna de sangre sea continua y no tenga burbujas de aire. En caso de pasarse, el restante será eliminado con el empleo de un papel filtro. Se seca la punta y el exterior de la pipeta.

2. Aspirar el líquido de dilución*, hasta la señal de 101.

3. Mezclar la sangre, utilizando para ello el bulbo.

* Esta solución pueda prepararse como sigue:

Solución de formaldehído al 40%10 ml.

Citrato trisódico al 3%990 ml.

No se modifican los eritrocitos, y la muestra puede dejarse en reposo durante horas antes de contar los glóbulos rojos.

4. Luego del adecuado llenado de la pipeta, se quitará el tubo de aspiración cuidadosamente, colocando la pipeta horizontal, y tapándola por su extremo con un dedo. Pueden taparse a ambos orificios de la pipeta con los dedos de una mano.

5. Agitar la pipeta por lo menos un minuto, de preferencia: dos. Sus movimientos deben ser variados y alternados con rotación horizontal entre las palmas de las manos.

6. Colocar el cubreobjetos sobre la cámara. En los puentes sobre los que descansa el protaobjetos, se aplica una gota de agua destilada, ésto facilitará el que el mismo resbale y caiga.

7. Luego al adecuado mezclado con la pipeta, son expulsadas unas cuantas para descartar el líquido de dilución del tallo capilar de la pipeta.

8. Controlando con el índice, el cierre del extremo de la pipeta, la cual debe mantenerse casi vertical; hay que colocar la punta sobre el borde del cubreobjetos.

9. Disminuyendo la presión del dedo índice, se deja que el líquido penetre lentamente, entre la cuadrícula y el cubreobjetos, hasta que la plataforma de recuento esté completamente cubierta. El líquido es atraído hacia el interior por capilaridad.

10. Luego, se coloca la cámara en la platina del microscopio y se le permite reposar durante dos o tres minutos, con lo que las células sedimentan.

11. Con un objetivo 10x será observada la cuadrícula, para asegurarse que la distribución de las células es homogénea.

12. Colocando el objetivo seco fuerte 40x y reduciendo adecuadamente la iluminación, se procede a contar las células en ochenta y cuatro cuadros medianos incluidos en el gran cuadrado central. Las células que cubren o tocan las líneas intermedias superior o izquierda se incluyen en el área de recuento; las correspondientes a los bordes inferior y derecho no se incluyen.

Cálculo.

Superficie de 89 cuadros pequeños = $80 \times 0.0025 \text{ mm}^2$.

Volumen de 80 cuadrados pequeños = $80 \times 0.0025 \times 0.1 \text{ mm}^2 = 0.02 \text{ mm}^3$.

Si R = No. de células en 80 cuadros pequeños; en el supuesto de que la sangre se ha diluido en 1,200, el número de células en 1 mm³ de sangre es: $R \times 200 \times \frac{1}{0.02} = R \times 200 \times 50 = 10,000 R.$

Por lo tanto, el número de células contadas en 80 cuadros pequeños se multiplica por 10,000 para obtener el número de glóbulos rojos por mm³ de sangre.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de apoyo.

j. Preparaciones de frotis sanguíneos.^{6,7,12}

Los frotis se pueden hacer sobre portaobjetos o cubreobjetos. Este último método permite una distribución mas homogénea de los globúlos, pero sin embargo, se prefieren los portaobjetos dado que: 1) Son mas fáciles de manipular; 2) se rompen menos; 3) se pueden rotular mas fácilmente, y 4) no requieren montaje. Sin embargo la técnica del cubreobjetos produce a menudo excelentes resultados.

A continuación serán descritos los procesos de extensiones sanguíneas efectuadas en dos diferentes medios, en caso de requerirse mayores detalles respecto a cada caso, es recomendable el consultar las citas referidas.

a) Frotis mediante cubreobjetos.

Se coloca una gota, directamente del lugar de la punción, mediante el toque con un cubreobjetos (22 mm por lado) sujetado en posición horizontal por el pulgar y el índice (colocado en los bordes cerca de un ángulo). Inmediatamente se coloca un segundo cubreobjetos sobre el primero, en una posición rotada 90° con respecto al primero, de tal modo que los ángulos pueden ser fácilmente cogidos entre los dedos pulgar e índice de la mano libre. La sangre se deja extender entre los dos cubreobjetos. Tan pronto como la sangre deja de extenderse, los cubreobjetos son separados por un movimiento de deslizamiento de modo que queden en el mismo plano. Si no se efectúa un movimiento de elevación del cubreobjetos, aparecerá una fina y uniforme extensión de sangre en cada cubreobjetos. Una vez secos, se tiñen con la película de sangre hacia abajo en vidrios de reloj. Posteriormente pueden montarse en un portaobjetos, así como en el medio de montaje deseado.

b) Métodos del Portaobjetos.

Es esencial utilizar portaobjetos limpios y sin grasa (para ello son útiles los tratamientos previos con Dicromato, agua destilada, y alcohol al 95°).

Para preparar un frotis en portaobjetos, se pone de 1 a 2 cm del borde, una gota de sangre (2 a 3 mm. de diámetro), y el portaobjetos se deja sobre la mesa con la gota hacia arriba. Se escoge para extender la sangre otro portaobjetos con un borde liso y regular, cuyas esquinas se rompen para que la anchura total del portaobjetos. Este borde, de extensión, se coloca sobre el portaobjetos que tiene la gota de sangre: formando con él, un ángulo de unos 30°. Luego, del borde del portaobjetos que sirve para extender la sangre, se hace retroceder hasta que toque la gota que se encuentra dentro del ángulo agudo. Inmediatamente, la gota de sangre se extiende a lo largo del borde del segundo portaobjetos, que formando el mismo ángulo de 30°, se hace deslizar en sentido contrario al rápido es el movimiento, más espeso resulta el frotis. El espesor también depende del ángulo entre los dos portaobjetos; mientras mayor es dicho ángulo, mas espeso resulta.

Las consideraciones que deben tenerse en cuenta para los frotis, son las siguientes:

- Deben emplearse los frotis mas delgados.
- Mientras mas lentamente se hace un frotis mas delgado resulta, y mayor es la proporción de leucocitos segmentados en los bordes y en la porción final.
- Es común que la mayoría de los leucocitos tiendan a acumularse cerca de los bordes del portaobjetos.
- Una vez preparadas las extensiones, se dejan secar al aire antes de teñirlas. Los nombres de quienes las emplearon, o para quienes se emplearon, se escriben sobre el portaobjetos con lápiz de diamante o con lápiz ordinario sobre el frotis.
- El film sanguíneo debe ser fijado antes de ser coloreado. Con el empleo de colorantes, tales como el Wright; el cual está disuelto en metanol, no se requiere fijación preliminar. En otros casos, se puede hacer la fijación químicamente o por calor. Lo mas sencillo es químicamente con metanol o etanol absoluto por 1 a 2 minutos. El método de calentamiento mas simple, es colocar la cámara en una estufa, y llevar la temperatura a 150°C y luego enfriar lentamente.

Tinciones de sangre 1,6,7,12

La finalidad de ésta prueba, es que la tinción de extensiones sanguíneas con colorantes policromáticos, permita la identificación de los diversos tipos celulares de la sangre periférica y de la médula ósea.

Los colorantes de anilina, ampliamente utilizados en los estudio de la sangre, son de dos tipos generales: los básicos (tales como el azul de metileno), y los ácidos (como la eosina). Los núcleos y algunas otras estructuras de la sangre se tiñen con los básicos, por lo que se les denomina basófilas, oxífilas o eosinófilas. Algunas otras estructuras se tiñen por la combinación de ambos y se denominan neutrófilas.

Los colorantes policromáticos son mezcla de azul de metileno alterado por calentamiento en soluciones de NaHCO_3 o bicromato ácido (azul de metileno) y eosina. Dado que la gran mayoría de éstos colorantes son soluciones alcohólicas del precipitado que se forma al mezclar los dos colorantes: ésta solución puede ser empleada para fijar las extensiones de sangre, así como para teñirlas.

Tinción de Wright.

Este colorante se llama policromático porque produce varios colores. Es una solución de alcohol (metílico o etílico) de un colorante ácido y otro básico, y es uno de los mejores y más empleados. El comercio expende el colorante en dos formas; en una está preparado para su uso inmediato, y en la otra se expende en polvo.

En caso de emplearse en la forma ya preparada, deberán, para obtenerse los mejores resultados, al seguirse las instrucciones del comerciante. Si se empleará el colorante seco, en forma de polvo, es recomendable lo siguiente.

Colorante de Wright 0.1 g
Etanol (libre de acetona) o
Metanol absoluto q.p. 60.0 ml.

Mediante la ayuda de un mortero, se muele el polvo seco con pocos ml. de alcohol. Lentamente se adiciona al alcohol y se continúa moliendo completamente. Este es un proceso que puede durar de 20 a 30 minutos. Todo el colorante debe encontrarse en la solución. Hay que dejar el reposar la solución de uno a dos días, así como tiene que ser filtrada antes de ser empleada o al tomar muestras con ella. El colorante es sensible a la contaminación del agua en reactivos y utensilios de vidrio; el frasco reactivo debe encontrarse siempre bien tapado para impedir la entrada de vapor de agua, y asimismo no deberá abrirse cuando se estén empleando soluciones ácidas o básicas.

Para diluir el colorante de Wright, se emplea la solución siguiente: para un pH de 6.4 mezcle 6.63 g. de fosfato potásico mono básico anhidro (K_2HPO_4), 2.56 g. de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) y agua destilada para hacer un litro. Puede prepararse una solución más alcalina (pH 6.7) con 5.13 g. de sal potásica y 4.12 g. de la sódica.

Tinción de la extensión:

1. Es mejor, para obtener los resultados más óptimos, el teñir las extensiones en cuanto sean secadas al aire, sin dejar transcurrir en ningún caso más de unas horas.

2. Colocar la placa con la extensión secada al aire y hacia arriba en una gradilla sobre una cubeta; si se emplea un cubreobjetos es mejor colocarlo sobre un soporte. (Revítese preparaciones de extensiones sanguíneas).

3. Sin fijación previa, cubrir la extensión con una cantidad determinada del líquido colorante mediante un cuentagotas, pipeta Pasteur, etc. Empléese una gran cantidad de colorante, con el fin de evitar una evaporación excesiva y la precipitación consiguiente. Esta maniobra fija la extensión. Si se usan portaobjetos, puede limitarse la tinción a una área conveniente marcándola con dos señales fuertes de lápiz cera.

4. Después de pasar dos minutos, añadir al líquido colorante en la extensión, una cantidad igual de la solución amortiguadora con un segundo cuentagotas. En algunos otros lugares se emplea

agua de la llave con resultados igualmente buenos. Para conseguir la mezcla de colorante con el diluyente, se sopla con suavidad en varios puntos de la placa para establecer corrientes suaves, igualando así la distribución. La cantidad de líquido de la preparación no debe ser tan grande que rebose. Se deja que la mezcla repose durante unos 3 ó 4 minutos, esperando la aparición de una espuma metálica verdosa (los márgenes deberán tener una tinción rojiza). Si se prolonga el tiempo de coloración, se provocará la presencia de precipitado. Siempre deberá determinarse el tiempo más adecuado de tinción de las placas con los colorantes sin diluir.

5. Quitar el colorante con un chorro de agua (preferiblemente agua destilada), primero suave, luego más fuerte, empleando una piseta por encima, hasta que haya desaparecido todo exceso de aquél y manteniendo horizontal la placa. El lavado tardará de 5 a 30 segundos hasta que las partes más delgadas se pongan de un color amarillento o rosado. La preparación debe estar rebosando agua mientras haya colorante encima de ella; si éste se vierte fuera antes del enjuague, su espuma tiende a depositarse en la extensión donde quedará adherida a pesar del lavado subsiguiente. Si el color es demasiado oscuro, se elimina el exceso de azul mediante más lavados. El colorante que haya quedado en el dorso de la placa se quita con una gasa humedecida con alcohol.

6. Luego del lavado, se quita el exceso de agua inclinando la placa, y tocando con un papel secante el borde inferior.

7. El portaobjetos puede secarse por evaporación, dejándolo en posición inclinada, o secándolo suavemente con papel filtro.

8. Se puede montar el cubreobjetos (con la extensión hacia abajo, en caso de haber sido el lugar de la extensión) sobre un portaobjetos con el líquido de montaje deseado.

Consideraciones de una buena tinción.

- Las extensiones, a simple vista, deben presentar un color rosado.

- Al microscopio los eritrocitos serán de color rosa, deben estar extendidos, sin superponerse ni apilarse.

- Una buena preparación estará dada, por lo menos, con ocho

campos satisfactorios a poco aumento.

- Los núcleos de los leucocitos son de azul púrpura, con las cromatinas basófilas y acidófilas netamente diferenciadas, y los gránulos neutrófilos del citoplasma son de color lila o violeta. Los eosinófilos son rojos tirando a naranja y cada uno se distingue claramente, lo cual permite su recuento individual.

- Los basófilos tienen gránulos de color púrpura tirando a azul oscuro. El citoplasma de los linfocitos es casi siempre azul. El de los monocitos tiene un matiz ligeramente azul.

Tinción de Giemsa.

Este es un colorante muy difundido, y es muy satisfactorio para tinciones de sangre habituales. Además puede ser aplicado en otros casos, como por ejemplo el descubrir microorganismos en sangre. Su composición es como sigue:

Azur II eosina	3.0 g.
Azur II	0.8 g.
Glicerina (Q.P).	250 ml.
Alcohol Metílico (Reactivo de Kahlabaum I o de Merck).....	250 ml.

Su preparación es difícil, y lo mejor es comprarlo ya preparado.

Tinción de las extensiones.

1. Las extensiones de sangre se fijan en alcohol metílico -- (1-2) .

2. Posterior a la fijación, se sumerge a la extensión, en una mezcla (recién preparada) de 1 ml. de colorante y 10 ml. de agua destilada. Hay que evitar la formación de precipitados en las placas, colocándolas verticalmente en el colorante. También se pueden obtener resultados correctos colocando unas 30 gotas de agua destilada en la extensión, añadiendo luego tres gotas del colorante, después se mezcla y se deja actuar durante 15 a 20 minutos.

3. Continúese con lo recomendado a partir del paso 6, en la técnica de tinción con el colorante de Wright.

En ocasiones, las tinciones pueden ser perfeccionadas, mediante la utilización de los dos colorantes. Lo usual, es que vez realizada la tinción con el colorante de Wright, se cubre a los portaobjetos con una dilución 1:10 del colorante de Giemsa, se lava con agua mediante la técnica empleada para el colorante de Wright. Para finalizar; deben dejarse secar a las extensiones al aire.

Para el caso de las tinciones con Giemsa, deben tomarse en cuenta las consideraciones siguientes:

- Generalmente, este colorante no se utiliza sólo en hematología, pero es un excelente modelo para resaltar los cuerpos de inclusión; sólo que, para observar bien dichos cuerpos, los frotis deben permanecer en el Giemsa diluido durante 12 a 18 horas.

- En sí, el colorante de Giemsa tiñe mal los glóbulos rojos y los granulos neutrófilos; en cambio, los granos azurófilos (rojos) resaltan.

En general, cuando al realizar los procedimientos, éstos parecen simples; las extensiones pueden ser teñidas incorrectamente aunque se haya seguido adecuadamente el procedimiento.

Tinción de Reticulocitos^{1,7,12}

Dado que el DNA del reticulocito desaparece a los pocos días de entrar esta célula en la sangre, el recuento de todas ellas servirá como medida del número de células que libera la médula en la sangre; por lo tanto, es una medida de la eritropoyesis muy eficaz. La eritropoyesis no puede ser simplemente dada por el porcentaje de los reticulocitos, es necesario el considerar su recuento absoluto en función del número de los hematíes. Otro de los efectos de la eritropoyetina, es que provoca la liberación acelerada, desde la médula, de los reticulocitos - con lo que se incrementa el tiempo de la maduración de ellos -. Esto es manifiesto con la presencia de grandes células policromáticas o eritrocitos nucleados en las extensiones de sangre.

En el empleo de las coloraciones vitales azul de metileno o azul de cresilo brillante, los gránulos o filamentos azules presentan RNA que se encuentra precipitado dentro de los reticulocitos. En caso de teñir con colorante de Wright, al aire, la tinción del RNA da lugar a una basofilia difusa en el eritrocito joven, y el -

mismo tipo de células manifiesta lo que se conoce como policromatofilia.

El principio de la prueba que a continuación se describe, - implica que el RNA residual de los eritrocitos inmaduros se precipita y colorea con una tinción vital. Se preparan las extensiones y se cuantifican las células que contienen los precipitados reticulares teñidos. Los resultados son dados en porcentajes de reticulocitos examinados o en cifras absolutas por mm. cúbico.

Reactivos.

- a) Azul de Metileno N 0.5 g.
Oxalato de Potasio 1.6 g.
Agua destilada 100 ml.
- b) Azul de Cresilo Brillante 1.0 g.
Citrato de Sodio 0.4 g.
NaCl al 0.85% (solc. acuosa) ... 100 ml.

Se disuelve el colorante en la solución salina, se añade el citrato (u oxalato, dependiendo del caso), se mezcla y se filtra antes del uso. Si se empleará el azul de metileno fresco, quizás el resultado sea más uniforme.

Tinción de la extensión.

1. Se añaden a dos gotas o tres del colorante (en tubo de ensaye pequeño), seis a ocho gotas de sangre capilar, recogida sobre (EDTA u Oxalato). Si se emplea sangre capilar, es aconsejable el aumentar la cantidad de colorante para evitar la coagulación.

2. Se incuba a 37°C durante 10 a 20 minutos. No se deberá rebasar de tal tiempo.

3. Se preparan frotis en la forma habitual, quizá un poco más delgados. Es posible hacer preparaciones satisfactorias con sangre almacenada a 4°C durante 24 horas.

Para hacer el recuento, se escoge una zona del frotis donde no haya superposición de glóbulos. Para el recuento en sí, se procederá como sigue:

- a) Contar el número de células que contienen gránulos azules

o reticulares. Emplee el aceite de inmersión para realizar las observaciones. Si se espera una reticulocitosis menor al 10%, cuéntenese cuando menos 100 reticulocitos.

2. Anotar número de campos necesitados para el conteo.

3. Asimismo, contar el número de eritrocitos en un campo de cada 10, ésto hay que repetirlo cuando menos 10 veces.

4. Ejemplo:

Número de reticulocitos en 150 campos	100
Número total de eritrocitos en 15 campos	300
Número aproximado de eritrocitos totales en 150 campos:	3000

$$\% \text{ de reticulocitos} = \frac{100}{3000} \times 100 = 3.3\%$$

5. Cuando el conteo de reticulocitos es superior al 10%, deben contarse un mayor número de campos completos, en proporción a los campos en los cuales sólo se contaron reticulocitos.

Consideraciones de la prueba.

- En ocasiones es difícil el decidir si un glóbulo rojo es eritrocito o no, pues la mayor parte de reticulocitos maduros sólo contiene algunos puntos o filamentos de material reticular.

- Para convertir en valores absolutos al % de reticulocitos obtenidos, considere lo siguiente:

$$\frac{5 \text{ Reticulocitos X Hematíes/mm}^3}{100} = \text{Reticulocitos/mm}^3$$

- Esto es un método que también tiñe los cuerpos de Heinz.

Prueba de la Inestabilidad del Glutati6n (Detecci6n de Cuerpos de Heinz)⁷.

El fundamento de esta prueba, se basa en la dependencia de la sensibilidad anormal de los eritrocitos, deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ante los efectos t6xicos de la fenilhidrazina.

Proceso.

Muestra sanguínea. Para la prueba, la sangre debe ser fresca (menor a una hora posterior a su toma). Puede encontrarse heparinizada o tomada directamente de una punción cutánea.

1. Se añade 0.1 ml. de sangre fresca a 2.0 ml. de una solución de acetil de fenilhidrazina (concentración 0.1%). Esta solución se encontrará en amortiguador de Sorensen a pH de 7.6 (es un buffer de fosfatos de concentración 0.062 M). Se mezcla y se airea soplando a través de la pipeta varias veces.

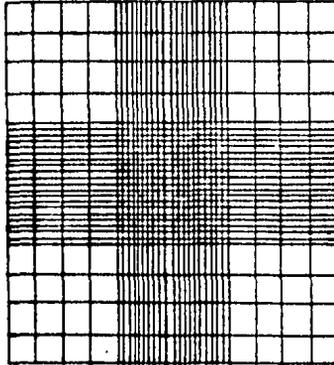
2. Se incuba (destapado el tubo) en el baño de agua a 37°C durante 2 horas. Luego se repite la aireación y se vuelve a colocar en incubación, una vez más, durante 2 horas o más. La incubación total será de 4 horas.

3. Mezcla. Se coloca 1 gota de solución de cristal violeta - (al 1% en NaCl al 0.73% filtrado) sobre un portaobjetos limpio. Se agrega una gota pequeña de la mezcla en incubación y se mezcla; se aplica un cubreobjetos. Se dejará que la mezcla repose por 5 o 10 minutos. Se contará el número de células que contiene cinco o más cuerpos de Heinz. En caso de sensibilidad al fármaco, o de deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, más del 40% de los eritrocitos muestran 5 o más cuerpos de Heinz. Junto a la determinación, deberá correrse una prueba que sea normal.

Capítulo IV. Apéndice 8. Técnicas de apoyo.

K. conteo mediante el empleo de la cámara de Newbauer¹¹.

El dibujo del área cuadrículada de una cámara de conteo de Newbauer es:



El área cuadrículada se divide en 9 cuadrados, cada uno de 1 mm. por 1 mm. Los cuatro cuadrados de la esquina están subdivididos en 16 pequeños cuadrados cada uno de $1/16$ avo de mm^2 .

El cuadrado central está subdividido en 25 cuadrados pequeños (cuadrículado por líneas gruesas), cada cuadrado contiene 16 pequeños cuadrados de $1/400$ avos de mm^2 .

El depósito celular sobre el área cuadrículada corresponde a 0.1 mm.

En caso de requerir un conteo celular para establecer la viabilidad, deberán tenerse presentes los siguientes puntos:

- Cámara de conteo de Newbauer.
- Cubreobjetos específico para la cámara de conteo.
- Solución de azul de tripano al 0.1%.
- Pipeta Pasteur estéril, limpia y con tapón de goma.
- Método.

Una dilución conocida de células se prepara en la solución de azul de tripano. Se llena la cámara de conteo con la suspensión celular diluida y se asegura que la cámara esté totalmente llena y libre de burbujas. Se deja reposar para que las células sedimenten

por dos minutos, entonces el conteo de las células sin colorear se rá realizado. El conteo habrá de ser hecho en cada uno de los cua drados grandes de las esquinas (son cuatro), el resultado será -- anotado, cuéntese un mínimo de 500 células para minimizar las varia ciones aleatorias.

- Cálculos.

Anote: N = al número de células en los cuatro cuadrados de la esquina.

$N/4$ = al número de células en una esquina.

Si el volumen de cada cuadrado es de 1/10 cm. Entonces el - número de células en un cm. es: $N/4 = 10$.

El número total de células por centímetro de suspensión ce- lular sin diluir es:

$N/4 \times 10 \times 100 \times$ Factor de dilución.

Bibliografía.

1. Davidson, I. & J.B. Todd-Sanford. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. edición. 2a. Reimpresión. Edit. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 1979 (1978).
2. Duboswki, K.M. An O-Toluidine Method for body fluid glucose determination. Clin. Chem. 8: 215. 1962.
3. Ennis, L. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzimology. Vol. III. 1957. pp 447-454.
4. Hepler, O.E. Manual of clinical laboratory methods. 4a. Edi- ción. Edit. Charles C. Thomas. Illinois, U.S.A. 1963.
5. Hyvaren A. & E.A. Nikkila. Specific determination of blood - glucose with O-Toluidine. Chim. Acta. F: 140. 1962.
6. Levinson. LE. & H.J. Mc Fate. Clinical laboratory diagnosis. 7a. Edición. Edit. Lea & Febriger. Philadelphia, U.S.A. 1969.
7. Lynch, M.J. y colaboradores. Métodos de laboratorio. 2a. Edi- ción. Edit. Interamericana S.A. México, D.F. 1984.

8. Melby, E.C. & N.H. Altman. Handbook of laboratory animal - science. Vol's II y III. Edit. C.R.C. Press. U.S.A. 1974.
9. Natelson, S. Techniques of clinical chemistry. 3a. Edición. Edit. Charles C. Thomas. Illinois, U.S.A. 1971.
10. Routh, J. Experiments in organic and biochemistry. Edit. W.B. Saunders Company. U.S.A. *1974.
11. Wasley, G.D. & J.M. May. Animal Cell Culture Methods. Edit. Blackwell Scientific. Publications. Oxford, Great Britain. 1970. pp. 187.
12. Williams, W.J. y colaboradores. Hematología. Tomo II. Edit. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 1975. (1979).

Capítulo IV. Apéndice 10.

Elaboración de tablas y gráficas empleadas para mostrar los resultados y observaciones de los modelos experimentales implicados en el presente manual.

De forma general se recomienda se observen los puntos siguientes*.

1. Para todos los modelos experimentales implicados en el manual, deberán llevarse (desde los momentos preparatorios hasta el final del experimento) una hoja en la que se identifique: (a) Laboratorio, grupo y asesor; (b) El animal que se esté trabajando: Especie, raza, sexo, edad. Todos estos puntos constituirán lo correspondiente a la identificación de todo lo que concierne al experimento.

2. Deberá anotarse, en otra hoja, todo el desarrollo experimental que se ha de efectuar. Asimismo, aquí irán incluidos todos aquellos cambios que a último momento habrán de efectuarse.

3. En otra hoja, se trazará un cuadro con las características generales siguientes (En el caso de las determinaciones por realizar, estas serán indicadas en lo correspondiente a cada experimento):

	PARAMETROS →		TALLA ABDOMINAL (CM)	PESO (g)	TEMPERATURA °C
	TIEMPO	GRUPO			
PREINDUCCION	-1	C			
		T			
INDUCCION	1	C			
		T			
POSTINDUCCION	2	C			
		T			
	3	C			
		T			
	Etc				

4. Para las determinaciones de laboratorio por realizar, es

* Estos puntos no solamente irán en las notas del estudiante, sino que deberán aparecer en un lugar visible y protegido en la jaula en la que este el animal de experimentación.

útil que los valores obtenidos sean colocados de la forma siguiente:

PARA UNA SOLA DETERMINACION:

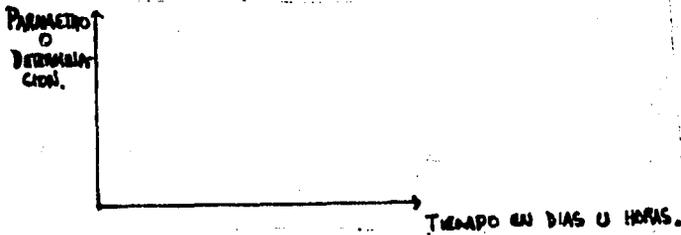
TIEMPO	GRUPO	PROTEINAS TOTALES			
		U.K.	D.O.	[]	[] REAL
-1	C				
	T				
1	C				
	T				
2	C				
	T				

[] REAL = IMPLICA [] * FACTOR DE DILUCION
 U.K. = UNIDADES KUETT D.O. = DENSIDAD OPTICA

PARA TODAS LAS DETERMINACIONES:

TIEMPO	GRUPO	DETERMINACIONES		
		PROTS. TOT.	ALBUMIN.	GLUCOS.
-1	C			
	T			
1	C			
	T			
2	C			
	T			

5. Se elaborarán gráficos de un solo parámetro en función - del tiempo (excepto cuando se indique otra forma) de la siguiente manera:



En ellos deberán involucrarse valores promedios, tanto de los animales controles como de los tratados. (Hay que revisar la forma en que están dadas las unidades para cada determinación). Para cada valor promedio, en caso de contar con varios animales por grupo, deberá anotarse el valor correspondiente a la desviación estándar del promedio correspondiente o en su defecto su error estándar (Es recomendable que para el caso se consulte un texto adecuado).

En algunos casos, cuando se requieran curvas de calibración, ésta deberá acompañar el gráfico donde se establezca la determinación en función del tiempo. La curva deberá contener todos los datos respecto a su ajuste, así como se especificará al pie de ella - el factor de dilución calculada, además del empleado.

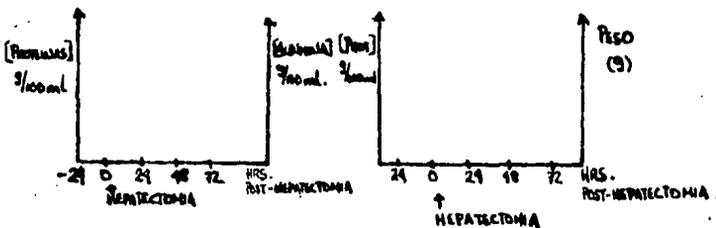
6. A continuación se enunciarán los distintos parámetros que serán seguidos, para cada experimento, con tablas y gráficas.

- Inducción al Hígado Graso.

Se construirá una tabla que contenga desde el inicio del experimento: Comportamiento del animal, talla abdominal, peso y -- otros. A la par se hará una gráfica de un parámetro en función del tiempo: peso y talla serán involucrados. De esta misma manera se construirán gráficas para todas las determinaciones que habrán de efectuarse (Consultar la metodología del experimento).

- Regeneración Hepática.

Para las determinaciones de tipo físico, establecidas en el presente modelo, éstas corresponderán por igual a las que se recomiendan para el modelo de la Inducción al Hígado Graso. El mismo caso será aplicado, en lo que a determinaciones de laboratorio se refiere, excepto que los días posteriores al proceso quirúrgico serán graficadas como horas (24, 48, 72, 144, etc) dependiendo de la extensión del estudio. Asimismo, se hará uso de gráficas con dos parámetros en función del tiempo de: Proteínas totales y albúmina: en contra horas posthepatectomía, Proteínas y peso contra horas -- posthepatectomía. Por ejemplo;



Inducción al Hipotiroidismo.

Las determinaciones que serán tabuladas y graficadas, serán: Peso, temperatura rectal, medida del cuello, comportamiento (esta última solo será tabulada).

Los valores de las determinaciones de laboratorio enunciadas en el experimento, serán graficadas solo como parámetro en función

de tiempo.

Inducción al Estado Hemolítico.

Se formará una tabla de las características siguientes:

PARAMETROS ↓ GRUPO →	DIAS POST-INDUCCION											
	1		2		3		4		5		6	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Globulos Rojos (#)												
Hemoglobina (mg/100ml)												
Hematocrito (%)												
Reticulocitos (%)												
Peso del bazo (% mg/100g peso corporal)												
Cuerpos de Heinz (#, + ó -)												
Urobilinógeno (mg/100ml)												

Asimismo serán elaboradas varias gráficas de dos parámetros en función del tiempo. Estos serán: Hematocrito y Glóbulos rojos - en función de días postinducción; Urobilinógeno renal y hemoglobina en función del tiempo; Reticulocitos y número de eritrocitos en función del tiempo y peso del bazo y reticulocitos en función del tiempo.

Capítulo IV. Apéndice 9.

PARAMETROS BIOLÓGICOS DE ALGUNOS ANIMALES
DE LABORATORIO

I. CONSTANTES BIOLÓGICAS.

ESPECIE	PROMEDIO DE VIDA (AÑOS)	PESO CORPORAL (g)	CONSUMO DE O ₂ PARA EL METABOLISMO BA- SAL. STANDARD. VELOC. METAB. BASAL. (Kcal/m ² /día)	TEMPERATURA CORPORAL (°C)
Ratón	2	23	739	36.5
Rata	3	250	802	38.2
Cuye	6	430	700	38.6
Conejo	7-15 (Dependien- do de la alimen- tación)	3700	809	39.4

Organos(g/100 g. de peso corporal. (Post-mortem)	Ratón	Rata	Cuye	Conejo
Corteza adrenal	0.03	0.05	0.08	0.01
Cerebro	0.29	1.22	0.92	0.29
Ojos	0.10	0.10	0.24	----
Corazón	0.68	0.52	0.39	0.29
Riñones	1.53	1.09	0.86	0.61
Hígado	4.56	3.35	3.86	2.66
Pulmones	1.70	0.79	1.07	----
Tiroides	0.01	0.001	0.02	0.02
Tracto Gastrointestinal	----	2.52	----	----
Bazo	----	0.29	0.21	----

II. INDICES DE LABORATORIO.
HEMATOGRAMA.

ESPECIE	Ht (ml/100 ml)	Hb (g/100 ml)	Eritrocitos (x 10 ³ /mm ³)	MCV (CU μ)	MCH (μμg)
Ratón	41.5	14.80	7.7 - 12.5	51	17
Rata	46.0	14.80	7.2 - 9.6	62	21
Cuye	42.0	12.35	4.5 - 7.0	81	25
Conejo	41.5	13.60	4.5 - 7.0	60	23

	MCHC (%)	Reticulocitos (%)	Leucocitos (X 10 ³ /mm ³)	Tiempo coagulación (Seg)
Ratón	33	-----	3.5 - 13	14
Rata	34	-----	6.0 - 18	20
Cuye	30	2	7.0 - 10	--
Conejo	35	1 - 7	5.2 - 12	60 - 360

III. INDICES DE LABORATORIO.
QUIMICA SANGUINEA. "A"

ESPECIE	GLUCOSA (mg/dl)	NITROGENO UREICO SANGUINEO (BUN) (mg/dl)	PROTEINAS TOTALES SERICAS (g/dl)	ALBUMINA (g/dl)
Ratón	62.8-176.2	13.90 - 23.30	3.99 - 7.51	3.10-4.26
Rata	119.7-280.3	12.40 - 36.98	4.46 - 7.00	2.45-5.80
Cuye	82.0-107.0	8.00 - 28.00	5.00 - 5.73	2.77-3.90
Conejo	67.0-197.3	6.00 - 29.60	4.01 - 8.30	3.06-5.10

	GLOBULINAS (g/dl)	COLESTEROL (mg/dl)	LIPIDOS TOTALES (mg/dl)
Ratón	0.60	-----	-----
Rata	1.80-4.06	28 - 76	70 - 415
Cuye	1.70-2.60	21 - 43	94 - 245
Conejo	1.49-3.60	10 - 80	69 - 415

III. INDICES DE LABORATORIO.
QUIMICA SANGUINEA. "B"

ESPECIE	FOSFOLIPIDOS (mg/dl)	TRIGLICERIDOS (mg/dl)	ACIDO URICO (mg/dl)	BILIRRUBINA TOTAL (mg/dl)
Ratón	-----	-----	-----	-----
Rata	36 - 130	26 - 145	1.80-7.4	0 - 0.47
Cuye	25 - 77	0 - 145	1.30-5.6	-----
Conejo	13 - 145	7 - 205	0.89-4.3	0 - 0.47

	CREATINA (mg/dl)	NITROGENO NO PROTEICO (NPN) (mg/dl)
Ratón	-----	-----
Rata	0.43-0.55	-----
Cuye	-----	-----
Conejo	-----	-----

IV. INDICES DE LABORATORIO.
HORMONAS.

ESPECIE	YODO ENLAZADO A PROTEINAS (mcg/dl)	INSULINA	GLUCAGON	HORMONA ESTIMULANTE DEL TIROIDES
Ratón	0.9 - 5.80	0.5-2.0ng/ml	-----	-----
Rata	3.8 - 7.06	19.0-35.0 μ U/ml	175-375 μ g/ml	24 - 65 nm/dl
Cuye	1.8 - 2.20	-----	-----	-----
Conejo	1.8 - 7.00	30.0-50.0 μ U/ml	-----	-----

Capítulo V.

1. Discusión y comentarios respecto al presente manual.

A pesar de que cada uno de los modelos experimentales aquí propuestos difieren entre sí en contenido, todos están orientados hacia un mismo fin. En algunos de ellos es posible que se hayan omitido ciertas consideraciones que sean importantes para el desarrollo óptimo de los mismos, en algunos otros hay cierta intención en haberlos adaptado así. En el caso de aquellos que han sido montados a la consideración de los autores del presente manual, tienen como base el hecho de que tales experimentos sean aplicables y útiles en la enseñanza práctica de la cátedra. Con tales cambios no se descuida el que se proporcione al alumno una guía óptima para la elaboración de un trabajo experimental; sino que se piensa que esta se ha canalizado para evitar una dispersión de esfuerzos infructuosos. De hecho, mucha de la información contenida (aparte de ser lo más actualizada posible), se basa en función de las necesidades requeridas en cualquier tipo de experimento. Esto último, es una consideración que apoya lo que se ha mostrado en el transcurso del tiempo en que se ha aplicado alguno de los modelos.

Los modelos experimentales en su mayor parte ya han sido sometidos a consideración de los alumnos, sólo recientemente se ha trabajado con algunos de los puntos expuestos aquí. Los resultados han sido diversos, pero el sentir general, es que sí se le ha podido orientar al alumno respecto a lo que el trabajo experimental requiere (constancia, dedicación, aplicación, búsqueda de la información, redacción de los resultados, etc). Aún cuando lo que se ha obtenido, principalmente está basado en la relación asesor-alumno, lo que aquí ha sido estructurado incrementa el caudal de conocimiento necesario para ambos casos.

Aún con los diseños experimentales aquí planteados por primera vez, así como con los ya desarrollados anteriormente, es necesario el destacar que ellos no están limitados; son susceptibles

de cambio en su estructura, o lo que es mejor, son utilizados como apoyo en la búsqueda de experimentos útiles para la enseñanza o - aún más; en diversas facetas investigacionales. Tal es el caso, - por ejemplo: que una vez montados los experimentos, pueden establecerse alternativas en las vías donde se trata de demostrar que existe alguna variación en el sistema, pueden hacerse uso de técnicas más elaboradas, para lo cual la bibliografía (individual o general) que se proporciona, es de gran ayuda para el caso.

Capítulo V.

2. Conclusiones.

El presente manual, como guía y fuente de información, es un trabajo que apoya las necesidades documentales y prácticas requeridas en la enseñanza experimental de la Bioquímica de Sistemas. No solo con lo que proporciona abarca esta área, sino que puede ser útil en cualquier otro campo afín.

Variados son los puntos que salen a la luz con este manual, - principalmente aquellos enfocados por su importancia en la formación profesional del Químico Farmacéutico Biólogo, porque como - va se había mencionado al inicio del trabajo; se busca que este - profesionista tenga bases, no solo teóricas, que fortalezcan su criterio y lo hagan menos técnico. Algunos de los puntos que podemos mencionar son: (1) Se requiere de una continuidad en la información, que respecto al aspecto práctico se le brinda al alumno. Con ello se le está actualizando constantemente y se le muestra el - grado de avance que dentro de lo que en el terreno existe, así como el tipo de conocimiento necesitado para llegar a demostrar un - hecho determinado. (2) El planteamiento de un estudio experimental deberá realizarse en función de las necesidades que se deseen cubrir. Esto es, no con experimentos aislados (aún cuando se empleen metodologías extensas o por demás sofisticadas) se logrará ilustrar lo que respecto a un sistema completo se refiere. Con la ayuda de

un modelo experimental, adecuado al caso, así como con determinaciones simples; es posible involucrar una amplia parte de lo que contiene o desarrolla un sistema en sí; porque para ello solo se requiere conocimiento teórico y una meticulosa actividad en lo que al trabajo experimental se refiere. Y esto se hace más patente por las características de infraestructura que para cada experimento hay, así como el número de alumnos que lo realizan, (3) Organización de una secuencia lógica en el trabajo experimental por efectuar. Este punto se plantea debido a que aún con un buen modelo y con una óptima actualización, no se consigue llegar a la obtención de resultados confiables cuando el trabajo desarrollado no cuenta con cierto orden. Esto es, no es posible el demostrar cambios en algún sistema fisiológico con solo apearse a lo que el horario normal del laboratorio establece; con lo que el estudio de los parámetros implicados se hace infructuoso e insuficiente. Sumado a lo anterior, debe establecerse un número de muestreos óptimos para cada determinación por realizar, así como su adecuado manejo en el estudio. Todo ello de realizarse correctamente, será beneficioso en cuestiones de aprendizaje y evitará la pérdida de esfuerzos. Por último (4) Se requiere de un orden adecuado en lo que respecta al trabajo experimental, cuando éste se realiza por un amplio número de alumnos. Y esto se manifiesta cuando se desea que todos aprendan lo mismo.

Aún cuando muchos puntos más pueden ser debatidos, se considera que la finalidad principal del manual se encuentra contenida en toda su estructura. Se espera que éste sea una herramienta eficaz y útil en lo que al trabajo experimental se refiere. El apoyo que se le brinda con otras fuentes de información serán de beneficio para quien así lo hiciere.

Capítulo V.

3. Bibliografía General de apoyo al curso.

1. Bhagavan, N.V. Bioquímica. Editorial Interamericana. S.A. - México, D.F. 1978.
2. Bioquímica Manual de Laboratorio. Facultad de Medicina, UNAM. 1974.
3. Davidsohn, I & H.J.B. Todd-Sandford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. Edición 2a. Reimpresión. Edit Salvat -- Editores, S.A. Barcelona, España. 1979. (1978).
4. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 9a. Edición. Edit. Lange Publications. 1979.
5. Guyton, A.C. Tratado de Fisiología Médica. 4a. Edición Edit. Interamericana. México, D.F. 1971.
6. Houssay, B.A. y colaboradores. Fisiología Humana. 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975.
7. Lynch, M.J.; S.R. Stanley; D.M. Leslie & J.H.I. Martina, Métodos de Laboratorio. 2a. Edición. Edit. Interamericana S.A. México, D.F. 1984.
8. Melby, E. & N.H. Altman, Handbook of laboratory Animal Science. Vol's I, II, III. Edit. CRC Press. U.S.A. 1974.
9. Natelson, S. Techniques of clinical chemistry. 3rd. Edition. Edit, Charles C. Thomas. Publisher. Illinois, U.S.A. 1971.
10. Rosenblueth, A. El Método Científico. Edit. CONACYT. México, D.F. 1981.
11. White, A.; P. Handler & E. L. Smith. Principios de Bioquímica. Edit. Mc. Graw-Hill. México, D.F. 1974.

3.1. BIBLIOGRAFIA GENERAL DEL PRESENTE MANUAL.

CAPITULO III. 1. Inducción al Hígado Graso.

1. Chopra, P. y colaboradores. Mechanism of Carbon Tetrachloride hepatotoxicity. Lab. Invest. 26(6); 716-726. 1972.

2. Davidson, I. & J.B. Henry. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. Edición. Edit. Salvat Editoriales. Barcelona, España. 1981. pp.825-857.
3. Dianzani, M.U.; F.M. Baccino & M. Comporti. The direct effect of Carbon tetrachloride on subcellular particles. Lab. Invest. 15(1); 149-156. 1966.
4. Elliot, H.W.; R. George & R. Okun. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. Ann. Rev. Pharm. Tox. 16; 125-141. 1976.
5. Feo, F. Alterazioni dello ialoplasma: accumulo di trigliceridi. Min. Med. 71: 63-70. 1980.
6. Ferreyra, E.C. y colaboradores. Treatment of Carbon Tetrachloride induced liver necrosis with chemical compounds. Tox. App. Pharm. 42: 513-512. 1977.
7. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 9a. Edición. Edit. Lange Publications. California, U.S.A. 1979. pp. 366-368, 384-388.
8. Harper, H.A. Manual de Química Fisiológica. 7a. Edición. Edit. Manual Moderno. México, D.F. 1980. pp. 301-304.
9. Houssay, A.B. Fisiología Humana. 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975. pp. 543-545.
10. Ishii, H. y colaboradores. Effect of 3-amino-1,2,4,-triazole on Carbon Tetrachloride-induced necrosis. Chem. Pharm. Bull. 25(8): 2035-2040. 1977.
11. Izutsu, K.T. & E.A. Smuckler. Effects of carbon tetrachloride on rat liver plasmalemmal calcium adenosine triphosphatase. Am. J. Path. 90(1): 145-155. 1978.
12. Netter, F.H. Liver, biliary tract and pancreas. Digestive - Sistem. The Ciba Collection of Medical Illustration. Vol. III. Edit. Ciba. U.S.A. 1961.
13. Osumi, Y.; Y. Amano & Shimamoto. Fatty liver caused by the repetitive administration of relatively small doses of carbon tetrachloride in rats. Jap. J. Pharmacol. 17: 298-307. 1967.
14. Parry, E.W. The mechanism of necrotic tissue removal in mouse liver following CCl_4 - induced injury. Exp. Path. 89: 205-211. 1979.

15. Recknagel, R.O. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life. Sci.* 33(1): 401-408. 1983.
16. Reynolds, E.S. y colaboradores. Metabolism of (¹⁴C) Carbon Tetrachloride to exhaled, excreted and bound metabolites. *Bioch. Pharm.* 33, (21); 3363-3374. 1984.
17. Villaruel, M.C. & J.A. Castro. Irreversible binding of CCl₄ to microsomal phospholipids. Free radical nature of the reactive specie and alterations in the physico-chemical properties of the target fatty acids. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* 101(1): 105-113. 1975.
18. White, A. y colaboradores. *Principios de Bioquímica*. Edit. Mc Graw-Hill. México, D.F. 1977. pp. 500-502.

CAPITULO III. 2. Regeneración hepática.

1. Balasegaram, M.B. & Suresh K. J. Hepatic resection. Pillars of success built on the foundation of 15 years of experience... *The Am. J. Surg.* 141: 360-365. March. 1981.
2. Ganong, W.F. Review of medical physiology. 9th. Edition. - Edit. Lange Medical Publications. Cal, U.S.A. 1979. pp. 385.
3. Houssay, B.A. y colaboradores. *Fisiología humana*. 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975. pp. 487-670.
4. Lynch, M.J. y colaboradores. *Métodos de laboratorio*. 2a. Edición Edit. Interamericana S.A. D.D., México 1984. pp 197.
5. Mc. Manus, J.P. & J.F. Whitfield. Stimulation of autophosphorylation of liver cell membrane proteins by calcium and partial hepatectomy. *J. Cell. Physiol.* 106: 33-44. 1981.
6. Morsiani E. y colaboradores. Attualita in tema ditrofismo e rigerazione epatica. *Min. Med.* 75 (20): 1179-1183. 12 Maggio 1984.
7. Mourelle, M. & Boanerges R. Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. *J. Biol. Chem.* 256. (4): 1656-1660. 1981.
8. Netter, F. H. Digestive sistem. Part III. Liver, Biliary tract and Pancreas. *The Ciba Collection of Medical Illustrations*. Edit. Ciba. USA. 1962.

9. Walker, P.R. y colaboradores. Polyamine metabolism in regenerating livers from normal and hypocalcemic rats. *J. Cell. Physiol.* 94: 87-92. 1978.
10. Walker, P.R. & J.F. Whitfield. Regulation of the prereplicative changes in synthesis and transport of messenger and - hypocalcemic rats. *J. Cell. Physiol.* 108: 427-437 (1981).
11. White, A.; P. Handler & E.L. Smith. *Principios de Bioquímica*. Edit. Mc Graw-Hill. D.F., México. 1977. pp. 280, 500-506.
12. Witek-Janusek, L. & S.F. Marotta. Status of the pituitary-adrenocortical-liver axis following partial hepatectomy. *Prac. Soc. Exp. Biol. Med.* 166: 210-215. 1981.
13. Wondergem, R. & D.R. Harder. Membrane potential measurements during rat liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* 102: 193-197, 1980.
14. Wright, G.H. Changes in plasma membrane enzyme activities during liver regeneration in the rat. *Bioch. Bioph. Acta.* 470: 368-371. 1977.
15. Zieve, L. y colaboradores. Urea excretion, galactose excretion and aminopyrine disappearance during normal liver regeneration after partial hepatectomy. *J. Lab. Clin. Med.* 104 (1): 24-34. July 1984.

CAPITULO III. 3. Perfusión Hepática.

1. Berry, E.N. y colaboradores. Role of the liver in the degradation of very low density lipoproteins: a study of lipolysis by heparin releasable liver lipase and uptake during isolated rat liver perfusion. *Europ. J. Clin. Invest.* 11; 151-159. 1981.
2. Doolittle, R.L. & G.W. Richter. Isolation and culture of - kupffer cells and hepatocytes from single rat livers. *Lab. Invest.* 45 (6); 558-566. 1981.
3. Galigher, A.E. & E.N. Kosloff. *Essentials of practical micro-technique*. 2nd. edition. Edit. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A. 1971. pp. 131-132.

4. Hems, R. y colaboradores. Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 101; 284-290. 1966.
5. Romero, F.J. & J. Piña. A simple procedure for the preparation of isolated liver cells. *Bioch. Educ.* 11 (4); 135-136. 1983.
6. Striffler, J.S. & D.L. Curry. Rat liver-pancreas preparation: perfusion technique and metabolic functions. *Am. J. Physiol.* 237 (4); E340-E348. 1979.
7. Wasley, G.D. & J.W. May. *Animal cell culture methods*. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Great Britain. 1970. pp. 181-187.
8. White, A. y colaboradores. *Principios de Bioquímica*. Ed. McGraw Hill. México, D.F. 1970. pp 281-290.

CAPITULO III. 4. Inducción al Hipotiroidismo.

1. Blonde, L. & F.A. Riddick. Hipotiroidismo: Diagnóstico y Tratamiento. *Tribuna Médica*. Agosto 2ª, 17-22. 1980.
2. Capasso, G.; J.E. Lin & R. Kinne. Lack of effect of low doses of triiodothyronine on $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase activity in single nephrons isolated from thyroidectomized rats. *Fed. Proc.* 43 (3): 633. 1984. Abstract. 2037.
3. Cutting, Windsor C. *Handbook of Pharmacology*. The actions and uses of drugs. 4a. Edición, Editorial Appleton Century Crofts. USA. 1969. pp. 413-415, 417-418.
4. Danowski, T.S. *Outline of endocrine-gland syndromes*. 3a. Edición. Editorial The Williams & Wilkins Company. Baltimore, U.S.A. 1976.
5. Ganong, W.F. *Review of Medical Physiology*. 9a. Edición. Editorial Lang Medical Publications. U.S.A. 1979. pp. 242-256.
6. Guyton, A. C. *Tratado de Fisiología Médica*. 4a. Edición Editorial Interamericana. México, D.F. 1971. pp. 952-964.
7. Harper, H.A.; J.W. Rodwell & P.A. Mayes. *Manual de Química Fisiológica*. 7a. Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. México, D.F. 1980. pp. 561-568.

8. Houssay y colaboradores. *Fisiología Humana*. 4a. Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1975.
9. Iqbal, Z; H. Koenig & J.J. Trout. Triiodothyronine stimulates calcium influx & membrane transport process in nerve cells & terminals of hypothyroid mouse cortex. *Fed. Proc.* 43 (3): 735 Abst: 2635. 1984.
10. Levinson, Mc Fate. *Clinical Laboratory Diagnosis*. 7a. Edición. Editorial. Lea & Febiger. Phylad., U.S.A. 1969. pp. 65.
11. Liberti, P. & J.B. Stanbury. The pharmacology of substances affecting the thyroid gland. *Ann. Rev. Pharmacol.* 11: 113-142. 1971.
12. Malbon, C.G.; M.P. Graziano & G.L. Johnson. Fat cell B-adrenergic receptor in the hypothyroid rat. *J. Biol. Chem.* 259 (5): 3254-3260 Marzo 10. 1984.
13. McClung, M. & Greer-Monte, A. Treatment of Hipertiroidism. - *Ann. Rev. Med.* 31 : 385-404. 1980.
14. Olbrich, Th. & D. Reinwein. Bocio Benigno. *Tribuna Médica*. Diciembre. pp 7-11. 1982.
15. Ross-Mc Dougall, I. Treatment of Hyper and Hypotiroidism. *J. Clin. Pharmacol.* 21 : 365-384. 1981.
16. Ruiz-Velaseo y Aranzolo, G.E. Hipotiroidismo en el adulto. *Medicina de Hospital.* 1 (5): 29 - 31. 1982.
17. Silva, J.E. y colaboradores. Qualitative and quantitative differences in the pathways of extra thyroideal T₃ generation - between euthyroid and hypothyroid rats. *J. Clin. Invest.* 73 - (4): 898-907. Abril 1984.
18. White, A., Handler, P. & S. Smith. *Principios de Bioquímica*. Edit. McGraw-Hill. México, D.F. 1977. pp 927-930.
19. Zarrow, M.N.; J.M.Yochim & J.L.McCarthy. *Experimental Endocrinology. A sourcebook of basic techniques*. Edit. Academic Press. New York, U.S.A. 1964. pp. 1-15.

CAPITULO III. 5. Inducción al Estado Hemolítico.

1. Beutler, E. Drug induced hemolytic anemia. *Pharm. Rev.* 21 (1): 73 - 98. 1969.

2. Chen, L.T. Intrasplenic microcirculation in rats with acute - hemolytic anemia. *Blood*. 56 (4) : 737-740. Oct. 1980.
3. Cohen, C. & P. Hochstein. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochem.* 3 (7): 895-900. 1964.
4. Erslev, A.J. ; J. Caro & E. Kansu. Renal and extrarenal erythropoietin production in anemic rats. *Brit. J. Hemat.* 45 : 65 - 72. 1980.
5. Etukudo, M.H. ; M. Ramachandran & G.V.N. Iyer. Methemoglobin formation and glutathione disappearance in cord blood red cells exposed to acetylphenylhydrazine. *Clin. Chim. Acta.* 138: 135-139. 1984.
6. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 9th. Edition. Edit. Lange Medical Publications. California, U.S.A. 1979. pp 396, 402 - 407.
7. Goldstein, B.D.; M.G. Rozen & R.L. Kunis. Role of red cell -- membrane lipid peroxidation in hemolysis due to phenylhydrazine. *Biochem. Pharmacol.* 29 : 1355 - 1359. 1980. .
8. Harper, H. A. y colaboradores. Manual de Química Fisiológica. 7a. Edición. Edit. El Manual Moderno. S.A. México, D.F. 1980 pp. 237, 266.
9. Holland, S.R.; M. Hasitz & J.H. Bruer. Red cell membrane alterations with pathological implication. Federation of European Biochemical Societies. Ninth Meeting, Budapest. Biomembranes. Structure & Function. Vol. 35, Edit. North-Holland/American - Elsevier. Budapest, Hungría. 1974.
10. Houssay, B.A. y colaboradores. Fisiología Humana. 4a. Edición. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1969. pp. 16 -42.
11. Itano, H.A. ; K.Hirota & K. Hokizaea. Mechanism of induction of haemolytic anemia by FHZ. *Nature.* 256: 665-667. Aug. 21, - 1975.
12. Jain, S.K. & D. Subramanyan. On the mechanism of FHZ-induced hemolytic anemia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 82 (4) : 1320-1324. Jun. 29, 1978.
13. Jain, S.K.; P. Hochstein. Membrane alterations in FHZ- induced reticulocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 201 (2): 683 -687. May. 1980.

14. Kimber, D.C. & C.E. Gray. Manual de Anatomía y Fisiología. Edit. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1966. pp. 289 - 303.
15. Long, P.H. Experimental anemia produced by phenylhydrazine derivatives. J.Clin.Investig. 14 (4): 329 - 342. 1926.
16. Maines, M.D. & J.C. Veltman. Phenylhydrazine-mediated induction of haem oxygenase activity in rat liver and kidney and development of hyperbilirubinaemia. Biochem. J. 217 : 409 - 417. 1984.
17. Melby, E.C. Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. III. -- Edit. CRC Press. U.S.A. 1974. pp. 384 - 401.
18. Misra, M.P. & I. Fridovich. The oxidation of Phenylhydrazine: - Superoxide and mechanism. Biochem. 15 (3): 681 - 687. 1976.
19. Peschle, C. Erythropoiesis. Ann. Rev. Med. 31 : 303-314. 1980.
20. Rice-Evans, C.; P. Hochstein. Alterations in erythrocyte membrane fluidity by PHZ-induced peroxidation of lipids. Biochem. Biophys. Res.Comm. 100 (4) : 1537-1542. Jun. 30. 1981.
21. Rifkind, R.A. & D. Danon. Heinz body anemia: An ultrastructural study. I. Heinz body formation. Blood. 25(6): 885-896. Jun, 1965.
22. Rifkind, R.A. & D. Danon. Heinz body anemia: An ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction. Blood. 26 - (4): 433-448. Oct. 1965.
23. Shalev, O; M.N. Laida.; R.P. Hebel; H.S. Jacob & J.W. Eaton. - Abnormal erythrocyte calcium homeostasis in oxidant-induced hemolytic disease. Blood. 58 (6): 1232-1235. 1981.
24. Vilsen, B. & H. Nielsen. Reaction of Phenylhydrazine with oxidized-Hemoglobin. Biochem. Pharmacol. 33 (17): 2739-2748. 1984.
25. White, A. Principios de Bioquímica. Edit. McGraw-Hill. México, D.F. 1974. pp.548-578, 753.

CAPITULO III. 6. Obtención de Macrófagos Alveolares.

1. S.A. Quantitative study of virus propagation. Virology. 2:533. 1956.
2. Cohen, A.B. Lung metabolism: Cells. Lung cell biology. Fed. -- Proc. 36 (1): 2636 - 2638. Nov. 1979.
3. Cohen, A.B. Lung metabolism: Potential adverse effects of lung macrophages and neutrophils. Fed. Proc. 38 (12): 2644 - 2647. Nov. 1979.

4. Davies, P. y colaboradores. A method for the collection of alveolar macrophages for microscopy. *Am.Rev.Resp. Dis.* 116 (6) - 1113 - 1115. Dic. 1977.
5. Depto. de Inmunología. ENCB - IPN. Manual de Prácticas de Inmunología Básica y Clínica. IPN. ENCB. 1980. pp.95-96.
6. Ganong, W.F. Review of Medical Physiology. 9th. Edition. Edit. Lange Medical Publications. California, U.S.A. 1969. pp: 508.
7. Holt, P.G. Alveolar Macrophages. I. A simple technique for the preparation of high numbers of viable alveolar macrophages from small laboratory animals. *J. Imm. Met.* 27, 189 - 198. 1979.
8. Kikkawa, Y. & K. Yoneda. The type II epithelial cell of the -- Lung. I. Method of isolation. *Lab. Invest.* 32: 295 - 302. 1975.
9. King, R.J. Utilization of alveolar epithelial type II cell for the study of pulmonary surfactant. *Fed. Proc.* 36 (12): 2637 - 2643. 1979.
10. Lehrer, R.I. y colaboradores. Fungicidal activity of rabbit alveolar and peritoneal macrophages against C. albicans. *Infect. Immun.* 28 : 1001. 1980.
11. Moolenbeek.,C. Obtaining alveolar macrophages from small laboratory rodents. *Lab. An.* 16 : 56-58. 1982.
12. Myles, A.;D. Goldstein & L. Triner. Technique of endotraqueal - intubation in rats. *Lab. An. Sci.* 32 (1): 78. 1982.
13. Myrvik, Q.N. y colaboradores. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procedure them in high state of purity. *J. Immunol.* 86: 128-132. 1961.
14. Nguyen, B.Y. Differences in phagocytosis and killing by alveolar macrophages from humans, rabbits, rats and hamsters. *Infect. Immun.* 36(2): 504 - 509. Mayo 1982.
15. Patterson-Delafield, y colaboradores. Preparation of rabbit alveolar macrophages in high purity and yield. *J. Immunol. Met.* 38 (3-4): 291 -294. 1980.
16. Stossel, T.P. Isolation and properties of phagocytic vessels. II. Alveolar Macrophages. *J.Clin. Invest.* 51: 605. 1972.
17. Widman, F.K. Pathobiology. How Happens. Ed. Little. Brown and Company Inc., U.S.A. 1978. pp. 23.
18. Zeligs, B.J.; L.S.Nerurkar & J.A.Bellanti. Maturation of the - rabbit Alveolar Macrophage during Animal Development III. Phagocytic and Bactericidal Functions. *Pediat. Res.* 11: 1208-1211. 1977.

CAPITULO IV. 1. Recopilación de Datos.

1. Baena, P.G. Instrumentos de Investigación. Manual para elaborar trabajos de investigación y tesis profesionales. Edit. Editores Mexicanos Unidos. S.A. México, D.F. 1983.
2. Bottle, T.R. & Wyatt, H.U. The use of biological literature. - 2nd. Edition. Ed. Butter Worths & Co. London, England. 1971.
3. Brighth, W.E. An introduction to scientific research. Edit. McGraw-Hill Book Company. Inc. U.S.A. 1952.
4. Garza, M.A. Manual de técnicas de investigación para estudiantes de ciencias sociales. 3a. Edición. Edit. El Colegio de México. México, D.F. 1981.
5. González, R.S. Manual de redacción e investigación documental. 2a. Edición. Edit. Trillas. México, D.F. 1983.

CAPITULO IV. 2. Manejo y marcaje de animales de laboratorio.

1. Garvey, S.J.; N.E. Cremer & D.H. Sussdorf. Methods in Immunology. 2nd. Edition. Edit. W.A. Benjamin Inc. U.S.A. 1977.
2. Griffith, J.Q. & E.J. Farris. The rat in laboratory investigation: 2nd. Edition. Edit. Hafner Publishing Company. New York, U.S.A. 1971.
3. Flecknell, A. The relief of pain in laboratory animals. Lab. - Anim. 18 : 147 - 160. 1984.
4. Lane, P.W. Animals for research. Edit. Academic Press. London, England. 1963.
5. Oteiza, F.J. Manejo de animales. Textos Universitarios. UNAM. México, D.F. 1971.

CAPITULO IV. 3. Toma de Muestras.

1. Garvey, S.J.; N.E. Cramer & D.H. Sussdorf. Methods in Immunology. 3th. Edition. Edit. W.A. Benjamin, INC. U.S.A. 1977.
2. Griffith, J.Q. & E.J. Farris. The rat in the laboratory investigation. 2nd. Edition. Edit. Hafner Publishing Company. New York, U.S.A. 1971.

3. Gay, W.I. Methods in animal experimentations. Vol. I. Edit. Academic Press. New York, U.S.A. 1965.
4. Hoffman, G. Les animaux de laboratoire. Edit. Viget Frères. Paris, France. 1963.
5. Owent, E.W. y colaboradores. A new technique for rapid, repeated blood sampling in the concius rat. Fed. Proc. Abstracts. - Ref. 1335. 15-23 Abril. 1982. 41 (3). March 1. 1982.

CAPITULO IV. 4. Técnicas Quirúrgicas.

1. Gay, W.I. Methods of Animal Experimentation. Vol. I. Edit. Academic Press. London, England. 1965. pp. 43.
2. Melby, E.C.M. Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. I. - Edit. CRC Press. U.S.A. 1974. pp. 233-278.
3. Zarrow, M.X. ; J.M.Yochim & J.McCarthy. Experimental Endocrinology. A sourcebook of basic techniques. Edit. Academic Press. - London, England. 1964. pp.309.

CAPITULO IV. 5. Preanestésicos, anestésicos y complicaciones anestésicas.

1. Cutting, W.C. Handbook of Pharmacology. The action and uses of drugs. 4th. Edition. Edit. Meredith Corporation. U.S.A. 1969 - pp. 586 - 587.
2. Melby, E.C.M. Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. I. - Edit. CRC Press. U.S.A. 1974. pp. 233-273.

CAPITULO IV. 6. Colección de muestras, preparación y preservación.

1. Garvey, S.J.; N.E. Cramer & D.H.Sussdorf. Methods in Immunology. 3th. Edition. Edit. W.A. Benjamin, INC. U.S.A. 1977.
2. Hepler, O.S. Manual of clinical laboratory methods. 4th. Edition. Edit. Charles C. Thomas. Illinois, U.S.A. 1963.
3. Melby, E.C.M. Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. II. Edit. CRC Press. U.S.A. 1974.

CAPITULO IV. 7. Elaboración de la curva de calibración.

1. Natelson, S. Techniques of Clinical Chemistry. 3th. Edition. - Edit. Charles C. Thomas Publisher. Illinois, U.S.A. 1971.

CAPITULO IV. 8. Técnicas de apoyo.

1. Davidson, I. & J.B.Henry. Todd-Sanford. Diagnóstico Clínico - por el Laboratorio. 6a. Edición. 2a. Reimpresión. Edit. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 1979 (1978).
2. Dubowski, K.M. An O-Toluidine method for body fluid glucose determination. Clin. Chem. 8 : 215. 1962.
3. Ennis, L. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzimology. Vol. III. 1957. pp. 447.
4. Hepler, O.E. Manual of clinical laboratory methods. 4th. Edition Edit. Charles C. Thomas. Illinois, U.S.A. 1963.
5. Hyvaren, A. & E.A. Nikkila. Specific determination of blood glucose with O-Toluidine. Chim. Acta. F : 140. 1962.
6. Levinson, L.E. & H.J. McFate. Clinical laboratory diagnosis. - 7th. Edition. Edit. Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A. 1969.
7. Lynch, M.J. y colaboradores. Métodos de laboratorio. 2a. Edición. Edit. Interamericana, S.A. México, D.F. 1984.
8. Melby, E.C.M. Handbook of laboratory animal science. Vol's. II y III. Edit. CRC Press. U.S.A. 1974.
9. Natelson, S. Techniques of clinical chemistry. 3a. Edition. - Edit. Charles C. Thomas. Illinois, U.S.A. 1971.
10. Routh, J. Experiments in organic and biochemistry. Edit. W.B. - Saunders Company. U.S.A. 1974.
11. Wasley, G.D. & J.M.May. Animal Cell Culture Methods. Edit. -- Blackwell Scientific Publications. Oxford, Great Britain. 1970. pp. 187.
12. Williams, W.J. y colaboradores. Hematología. Tomo I. Edit. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 1975 (1979)