



19
24

Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA"

Evaluación de los efectos del ácido acetilsalicílico
sobre el sistema inmunológico de ratas determinado
por las reacciones de hipersensibilidad.

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P r e s e n t a n :

DIAZ PANTOJA FABIAN

LUNA RODRIGUEZ JUAN CARLOS



México, D. F.

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO .

	Pág.
CAPITULO I	
Introducción	
El sistema inmune	1
Mecanismos inmunitarios en el daño a los tejidos	7
Acido acetilsalicílico	22
CAPITULO II	
Fundamentación del tema	32
Planteamiento del problema	34
CAPITULO III	
Objetivos	35
CAPITULO IV	
Hipótesis	36
CAPITULO V	
Material.	37
Métodos	40
CAPITULO VI	
Resultados	47
Discusión de Resultados	67
CAPITULO VII	
Conclusiones	68
CAPITULO VIII	
Bibliografía	69
ANEXO	72

C A P I T U L O I

EL SISTEMA INMUNE.

Las respuestas inmunológicas son procesos adaptativos extraordinariamente versátiles, que dan lugar a que los animales produzcan proteínas reactivas específicas como respuesta al estímulo que presentan las innumerables moléculas orgánicas y las macromoléculas. Al parecer, es ta capacidad es de adquisición relativamente reciente siendo característica única de los vertebrados; ningún otro tipo de organismo posee ésta gran capacidad de reco nocer bioquímicamente una variedad aparentemente ilimita da de sustancias extrínsecas. (3)

La principal función del sistema inmunitario es la conservación de la integridad del cuerpo. Este sistema ha elaborado mecanismos para repeler y destruir a los in vasosores de origen exógeno que varían desde los virus, las bacterias, los hongos y los protozoarios, hasta los meta zoarios, como los helmintos. No obstante, cada vez hay mayor razón para creer que cuando menos, parte del sistema inmunitario puede haberse formado para combatir a un tipo de parasito mucho más insidioso, cuyo origen está den tro del organismo, o sea la célula neoplásica. Como éstas células neoplásicas provienen del propio cuerpo, es un problema difícil que el sistema inmunitario del mismo, las reconozca como células alteradas, peligrosas para el individuo, las cuales tienen que ser destruidas. Sin embargo, es bastante razonable el suponer que existen pode rosos mecanismos de vigilancia inmunitaria, que son capa ces de lograr el reconocimiento y la destrucción del tejido neoplásico. (2,3)

Los mecanismos de defensa los podemos dividir en dos tipos: los no específicos y los específicos. Los mecanismos no específicos se conocen también como inmunidad innata, inmunidad natural o resistencia no específica y son todos aquellos mecanismos con los que se nace. La inmensa mayoría de las infecciones son eliminadas aquí. El mecanismo específico es aquella inmunidad que adquirimos a través de la vida y se caracteriza por ser: específica; es decir, la inmunidad contra un germen es específica de éste, inducible; para que se genere la serie de efectores se requiere de la exposición previa del germen en cuestión, presenta memoria; en la cuál la inmunidad tiene la capacidad de reconocerlo cuando se le presenta por segunda ocasión y es transferible; por suero o por linfocitos (1,2).

La inmunidad adquirida se puede dividir en: activa y pasiva. La inmunidad activa es aquella en la que la serie de mecanismos de defensa son generados por el propio individuo y puede ser: natural; cuando el contacto con el germen es en forma natural (padecer la enfermedad) e inducida; cuando el contacto con el germen es en forma deliberada (vacunación). La inmunidad adquirida pasiva es aquella en la que le son transferidos al individuo los mecanismos de defensa y puede ser también natural; paso por placenta o por calostro de los anticuerpos vía madre-feto o madre-producto, y artificial; como la seroterapia.

El sistema inmunitario puede dividirse funcionalmente en dos partes. El contacto con sustancias antigénicas

hace que se active una de ellas o ambas divisiones del sistema. Por consiguiente, la estimulación antigénica en un vertebrado eficientemente inmunitario, puede resultar en la síntesis de un anticuerpo contra el antígeno (inmunidad humoral), en la aparición de inmunidad celular respecto de dicho antígeno o lo más probable ambos tipos de respuesta.

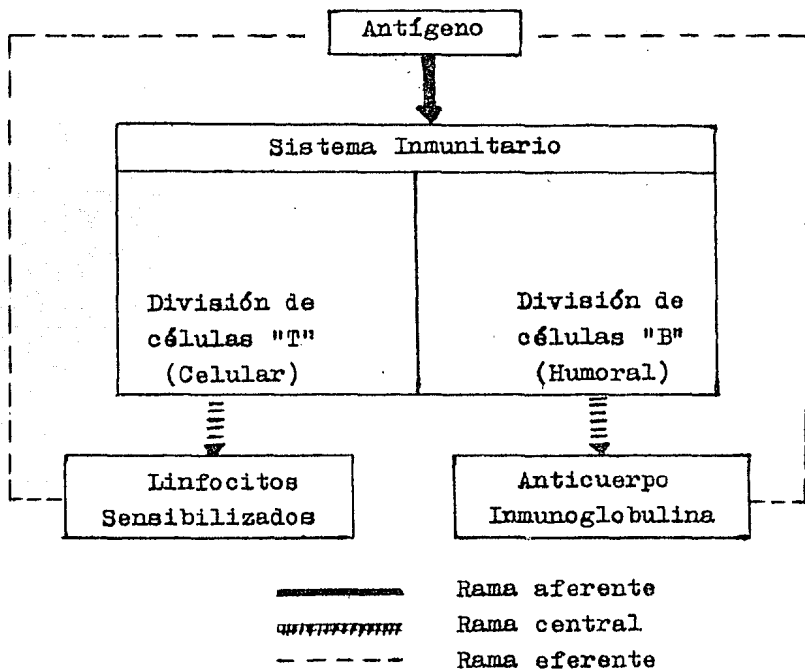


Fig. 1. Fisiología de la inmunidad(3).

Tanto la respuesta inmunitaria celular como la humoral se han dividido arbitrariamente en tres ramas fisiológicas. La rama aferente comprende todos los procesos participantes en el transporte del antígeno hacia el sistema inmunitario. La rama central abarca todos los procesos (de ambas divisiones del sistema inmunitario) que culminan con la producción de los efectores de la inmunidad (es decir, las células sensibilizadas o los anticuerpos humorales). La rama eferente implica todos los procesos que ocurren desde la liberación de los efectores hasta que tiene lugar la acción final de éstos contra el antígeno provocador (fig. 1) (3,10).

La respuesta inmune humoral es muy importante en la eliminación de bacterias extracelulares, así como en la neutralización de toxinas, pero es ineficiente en la eliminación de bacterias de tipo intracelular, así como también en el rechazo de transplantes y tumores.

Se le llama antígeno o inmunógeno a una sustancia que introducida en un animal induce una respuesta inmune detectable celular, humoral o en la mayoría de los casos ambas. Para que la molécula pueda ser inmunogénica debe cumplir con algunas características como: masa molecular mayor de 10,000, que sea extraña, que sea antigénica, que presente rigidez estructural, la dosis y la vía de administración son también importantes así como la constitución genética del animal (6, 12).

Los antígenos pueden ser divididos en base a su des tino en la respuesta inmune en: antígenos timo-dependien tes; aquellos que para que induzcan una respuesta inmune, requieren de la participación de células "T" y en antíge nos timo-independientes; aquellos en donde no es india - pensable la participación de células "T". Una vez que el antígeno alcance el sistema linfático, es necesario una serie de interacciones celulares (linfocitos-macrófago) para que se induzca adecuadamente una respuesta inmune. El macrófago juega un papel central, en la inducción de una respuesta inmune con respecto a la presentación del antígeno. Esta célula es la responsable de fagocitar el antígeno, procesarlo y presentarlo de una manera adecuada a los linfocitos (células que dan origen a los mediadores de la respuesta inmune).

Si un antígeno timo-dependiente llega directamente a un linfocito "B" éste es bloqueado y no producirá anticuerpos; pero si el antígeno es timo-independiente, és te será capaz de provocar una fuerte respuesta produciendo anticuerpos. El hecho de que el antígeno timo-independiente (antígeno polimerizado) sea capaz de producir anticuerpos, tal vez se pueda explicar mediante la presentación del antígeno en forma polimerizada (forma de presentación del antígeno por el macrófago al linfocito "B"). Una vez que el linfocito "T" o "B" entra en contacto con el antígeno específico en una forma adecuada, comienza una fase de proliferación que se conoce como fase inductiva, dando origen a células de memoria y a células efec toras.

Las células de memoria son linfocitos pequeños que tienen una vida larga, que al ponerse en contacto por segunda vez con un antígeno específico se dividen dando orígen a las células de memoria y a las células efectoras nuevamente (1,13).

MECANISMOS INMUNITARIOS EN EL DAÑO A LOS TEJIDOS

Los diversos mecanismos inmunológicos involucrados en la producción de daño a los tejidos fueron clasificados en 1963 por Gell y Coombs en cuatro tipos básicos:

Reacciones de tipo I: Incluyen todos los fenómenos inmunitarios que involucran atopía. Son mediadas por anticuerpos IgE llamados reagentes, las cuales se fijan a los mastocitos, basófilos y neutrófilos. Al entrar en contacto con un alérgeno, tales células sensibilizadas por los reagentes, se rompen liberando mediadores farmacológicos como histamina y SRS-A.

Reacciones de tipo II: Incluye todos los fenómenos inmunitarios mediados por anticuerpos citotóxicos y el complemento.

Reacciones de tipo III: Incluye a todas las reacciones mediadas por complejos inmunitarios, es decir, aquellos trastornos en donde los antígenos circulantes libres forman complejos con anticuerpos circulantes y el complemento.

Reacciones de tipo IV: Incluye todas las reacciones inmunitarias mediadas a través de células, que provocan daño tisular. Estas reacciones son mediadas por la división del sistema linfóide dependiente del timo (ver figura 2) (1.3).

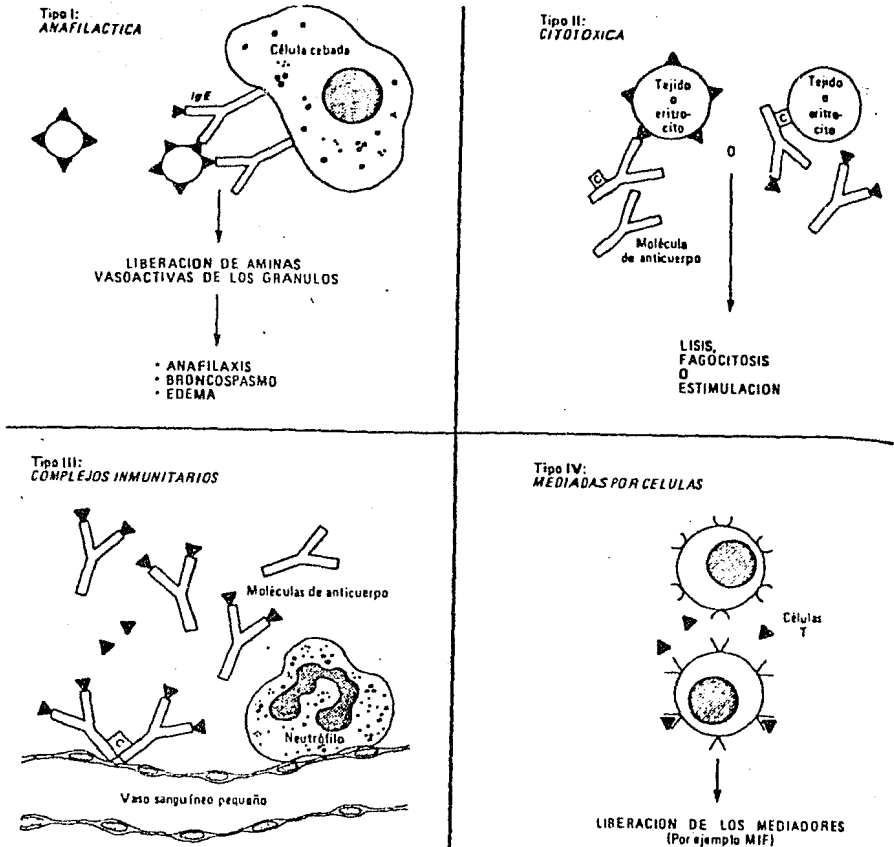


Fig. 2 Diagramas esquemáticos de los cuatro tipos de mecanismos inmunológicos que pueden producir daño a los tejidos. C indica complemento; Δ , antígeno; U y V, son receptores específicos para los antígenos (1).

Componentes de las reacciones de tipo I

A. Anticuerpos reagínicos. Los anticuerpos reagínicos son también llamados anticuerpos homocitotrópicos debido a sus propiedades de fijación al tejido autólogo. La mayor parte de los anticuerpos responsables de las reacciones para el tipo I en el humano pertenecen a la clase IgE. La fijación de los anticuerpos reagínicos es lograda por medio de la región Fc de la molécula la cual es termolábil y el calentamiento da por resultado la pérdida de la capacidad de IgE para sensibilizar las células de los tejidos.

B. Antígeno (alergeno). Muchos antígenos son capaces de inducir anticuerpos IgE en condiciones apropiadas. La anafilaxis generalizada es muy probable que sea hallada después de la exposición de un sujeto sensibilizado a compuestos como las proteínas heterólogas (antisueros, hormonas, enzimas, venenos de himenópteros, extracto de polen y alimentos), polisacáridos (dextran hierro), agentes de diagnóstico (material yodado de contraste, sulfobromotaleína) y medicamentos (antibióticos, vitaminas). La respuesta de anticuerpos IgE a un antígeno es T-dependiente y se encuentra bajo control genético complejo.

C. Células de los tejidos (basófilos y células cebadas). Un basófilo o célula cebada posee receptores de membrana capaces de fijar la región Fc de las moléculas de IgE. Las moléculas IgE ligadas se encuentran en un estado de equilibrio dinámico, debido a que los fragmentos Fc de las moléculas IgE compiten con toda la molécula de

IgE para el receptor. El enlace de las moléculas IgE adyacentes de membrana por el antígeno específico, inicia una serie de cambios bioquímicos que causan la liberación de las sustancias activas almacenadas en la célula cebada y los basófilos.

D. Eventos bioquímicos intracelulares. El orden de sucesión postulado de los eventos bioquímicos vitales que ocurren en la célula blanco después del enlace al antígeno de las moléculas de IgE sobre la superficie de la célula blanco, que da como resultado la liberación de aminas vasoactivas se resume en la fig. 3. Hay varias etapas en el proceso con requerimientos variables de energía y se conocen varios factores que influyen sobre el proceso en etapas diferentes.

1.- La activación de una proesterasa celular requiere la entrada de calcio extracelular en la célula. Esta etapa es inhibida por el diisopropilfluorofosfato y está asociada con la contracción de microfilamentos.

2.- La proesterasa adicional es activada autocatalíticamente.

3.- Una etapa, que requiere energía con microfilamentos que mueven gránulos a lo largo de los microtúbulos o de la membrana plasmática, es inhibida por la privación de glucosa (por ejemplo, por dos-desoxiglucosa).

4.- Una etapa subsiguiente que requiere calcio es inhibida por el ácido etilendiaminotetracético.

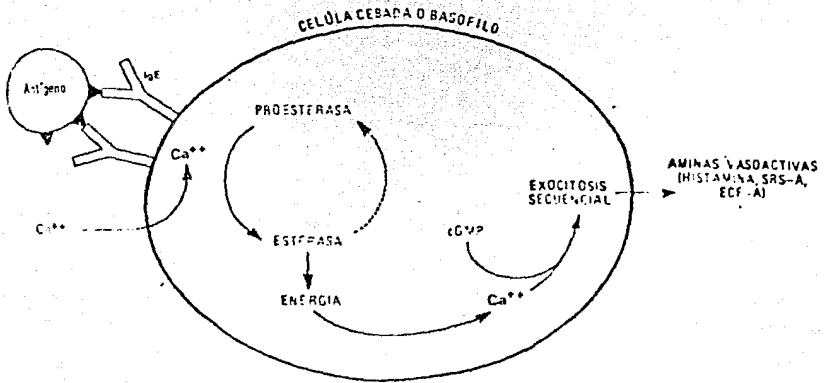


Fig. 3

Diagrama esquemático de los principales eventos bioquímicos en una reacción de tipo I, que sigue al enlace de las moléculas IgE con el antígeno sobre una célula blanco, que da por resultado la liberación de aminas vasoactivas (1).

5.- Una etapa que conduce a la liberación de aminas (quizá intercambiadas por Na^+) es inhibida por la elevación de la concentración intracelular de cAMP.

E. Aminas farmacológicamente Activas.

1.- Histamina: Es la amina vasoactiva más importante, para la observación de que los compuestos antihistamínicos fracasaban en situaciones experimentales y en aplicaciones clínicas para controlar todas las manifestaciones de las reacciones de tipo I, condujo a comprender que, por lo general, se liberan una mezcla de aminas vasoactivas a partir de la célula blanco. La histamina existe preformada en gránulos de basófilos, célula cebada, plaquetas y otras células de los tejidos. Los efectos en el humano son del tipo eritematoso y angioedematoso, y son atribuibles a un aumento de la permeabilidad capilar consecutiva a la interrupción parcial del endotelio vascular. Produce también aumento de la resistencia al paso del aire en el sistema respiratorio.

2.- Sustancia de reacción lenta de la anafilaxis (SRS-A): No existe preformada pero su producción es inducida durante una reacción anafiláctica. Produce aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso. No es inhibida por los antihistamínicos.

3.- Factor quimiotáctico eosinofílico de la anafilaxis (ECF-A): Existe preformado en los gránulos de las células cebadas como un péptido ácido.

4.- Serotonina: Es la 5-hidroxitriptamina, existe preformada en los gránulos de las células cebadas, plaquetas y las células enterocromafines. Causa dilatación cu

pilar, aumento de la permeabilidad y contracción del músculo liso (en algunas especies). Probablemente no sea una amina vasoactiva importante en las reacciones de tipo I en el humano.

5.- Heparina: Es un mucopolisacárido ácido que explica la tinción metacromática de los gránulos de las células cebadas por los colorantes básicos. Contribuye a la anafilaxis en el perro pero, al parecer, no en el humano.

6.- Cininas: No constituyen aminas vasoactivas primarias en las reacciones de tipo I, pero contribuyen a las características clínicas a través de su intervención secundaria. Las cininas poseen toda una gama de actividades incluyendo quiliotaxis, contracción del músculo liso dilatación de las arteriolas periféricas y aumento de la permeabilidad capilar.

7.- Prostaglandinas: Comprende un gran número de ácidos alifáticos naturales con una diversidad de actividades biológicas, incluyendo el aumento de la permeabilidad, la dilatación de los capilares, contracción del músculo liso, constricción bronquial y alteración del umbral al dolor. La mayoría de sus acciones parecen estar mediadas por los cambios en las concentraciones intracelulares de CAMP. Su papel exacto en la producción de diversas características clínicas en las reacciones anafilácticas del tipo I, en el humano, no ha sido definido.

8.- Factor aglutinante de las plaquetas (PAF): Es liberado por los basófilos de conejo y hace que las plaquetas se aglutinen. Estas liberan histamina. No es seguro que éste factor tenga un papel semejante en el humano (1, 2, 4, 5, 11).

Reacciones de tipo IV.

Las reacciones inmunitarias mediadas por células ocurren como resultado de las acciones recíprocas de los linfocitos activamente sensibilizados y los antígenos específicos. Dichas reacciones están mediadas por las linfocinas, por la citotoxicidad o por ambas. Ocurren sin intervención de anticuerpos ni del complemento. La lesión clásica de una reacción inmunitaria mediada por células es la reacción cutánea retardada que aparece durante un periodo de 24-48 horas y que tiene el infiltrado mononuclear característico.

La primera etapa en ésta reacción es la fijación del antígeno por un número pequeño de linfocitos "T" específicos reactivos al antígeno. Esta etapa inicial va seguida por la producción y liberación de mediadores solubles con una amplia gama de actividades biológicas. Estos productos de linfocitos activados o linfocinas tienen diversas actividades sobre los macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y otros tipos de células. Su función global es la de amplificar la respuesta celular inicial mediante el reclutamiento de otros linfocitos (células "B" y células "T"), induciendo la mitogénesis en estos linfocitos, atrayendo leucocitos polimorfonucleares y en particular, atrayendo, localizando y activando macrófagos en el sitio de la lesión (1, 2, 5).

Componentes de las reacciones de tipo IV.

Etapa primaria. Convainación de antígeno con linfocitos "T" específicamente sensibilizados: La reacción mediada por células se inicia con la fijación del antígeno a un receptor de antígeno que existe en la superficie del linfocito T sensibilizado. Esto puede producirse directamente o mediado por antígeno unido a macrófago. Después de la reacción del antígeno con el linfocito T sensibilizado, se produce una serie de acontecimientos morfológicos y bioquímicos que constituyen la etapa secundaria.

Etapa Secundaria. Reacciones morfológicas y bioquímicas: Los cambios morfológicos de los linfocitos en cultivo de tejido consisten en la transformación en células blasto, seguida de mitosis (se cree que el macrófago es esencial para que tenga lugar ésta reacción). Los acontecimientos bioquímicos que ocurren durante la etapa secundaria se manifiestan por la síntesis de novo de DNA, RNA o proteínas.

Etapa Terciaria. Expresiones biológicas: Constan de las siguientes fases: 1) La generación de células T supresoras o coadyuvantes para interacciones de T-T y T-B; 2) La generación de células T citotóxicas; 3) La generación de células T que elaboran las moléculas efectoras (mediadores) de la inmunidad mediada por células, y 4) La generación de células T de memoria.

Tipos celulares y mecanismos efectores.

Hay diversos tipos y mecanismos celulares que intervienen en las expresiones y en la regulación de reacciones mediadas por células. En el cuadro I se presentan los tipos de células con sus lugares de origen, sus características de superficie y su modo de acción. Estas células incluyen: 1) Linfocitos T, 2) Macrófagos, 3) Células destructoras o asesinas o células K y 4) Células destructoras naturales NK.

Tipo celular	Célula precursora o lugar de diferenciación	Marcadores o receptores de superficie				Mecanismos de acción
		mIg	Fc	C3b	Antígeno T	
Linfocitos T	Timo	-	-	-	+	Directamente o por elaboración de linfocinas
Macrófagos	Monocito precursor	±	+	+	-	Directamente o controlado con anticuerpos, estimulados por MAF.
Células destructoras K	?	-	+	-	-	Armado con anticuerpo (ADCC)
Células destructoras NK	?	-	-	-	-	Directa

Cuadro I Tipos de células efectoras que intervienen en reacciones mediadas por células (2).

Linfocitos T: Además de su papel de colaboración con linfocitos B en una función de ayuda o supresión, hoy sabemos que el linfocito T, es importante en las expresiones de la inmunidad mediada por células (rechazo de aloinjertos, rechazo de tumores y en la inmunidad antimicrobiana). Los linfocitos T nacen en la médula ósea y se diferencian en el timo; las formas maduras contienen marcadores característicos (Cuadro I). Al proseguir la diferenciación de éstas células, originan una población de células T citotóxicas que pueden destruir determinadas células blanco directamente o elaborando productos celulares específicos (linfocinas).

Fagocitos Mononucleares: Constituyen una segunda serie de tipos celulares que intervienen en la inmunidad celular. Son importantes no solo en la elaboración o presentación de antígeno para los acontecimientos iniciales de la producción de anticuerpos por células B, sino también pueden llevar a cabo una función accesoria en las expresiones de la inmunidad de tipo celular por linfocitos T. Además, pueden tomar parte directamente en la destrucción de sustancias extrañas por fagocitosis o por efectos citotóxicos directos sobre las células blanco. También, algunos de los productos de linfocitos, por ejemplo el factor inhibitorio de la migración (MIF), puede influir en la función del macrófago, afectando el movimiento o el metabolismo celular. La presencia de un receptor para Fc y otro para C₃ puede facilitar la captación de complejos de antígeno y anticuerpo, o de antígeno-an-

ticuerpo y complemento respectivamente. Además, la presencia del receptor Fc puede permitir que el tipo celular participe en reacciones citotóxicas celulares dependientes de anticuerpo (ADCC) según se describe para la célula destructora K.

Células destructoras o células K: No se conoce bien su identidad ni su lugar de origen, morfológicamente indistinguible de linfocitos pequeños, no presenta receptores para C_3b , negativas para Ig de superficie, tiene receptores para Fc, lo cual le confiere actividad citotóxica contra células blanco revestidas de anticuerpo IgG específico. El complemento parece no participar en éstas reacciones y, a diferencia de la situación que existe con los linfocitos T, éstas reacciones pueden producirse con células K no sensibilizadas.

Células destructoras naturales o células NK: La identidad de éstas células también es desconocida, no tienen marcadores de células T o B (células nulas) y no requieren sensibilización previa para su generación. Puesto que las células NK muestran una amplia variación de reactividad para las células tumorales se ha especulado que pueden ser un componente importante en el mecanismo de defensa del huésped contra las células neoplásicas.

Mediadores de la inmunidad celular.

Después de la interacción entre un linfocito sensibilizado y el antígeno, el linfocito es capaz de elaborar una serie de sustancias diversas. Recientemente se ha comprobado que éstos factores poseen diversas actividades biológicas que se piensa son las que *in vitro* guardan relación con la inmunidad mediada por células.

Aunque éstas sustancias ejercen efectos biológicos notorios sobre las células en el microambiente, son producidas solo en diminutas cantidades por los linfocitos activados. Pocos, si es que algunos, de los mediadores - han sido purificados lo suficiente como para conocer su estructura de manera que su identificación pudiera ser simplificada. En realidad no se sabe cuantos mediadores químicos diferentes hay ni cuantos intervienen en realidad *in vivo* en las reacciones inmunológicas mediadas por células (cuadros 2 y 3) (1, 2, 5, 12, 14).

Mediadores que afectan a los macrófagos
 Factor inhibitorio de la migración (MIF).
 Factor activador de los macrófagos (MAF).
 Factor quimiotáctico para los macrófagos
 Mediadores que afectan a los polimorfonucleares
 Factor quimiotáctico para neutrófilos,
 eosinófilos, y basófilos.
 Factor inhibitorio de los leucocitos (LIF).
 Factor de liberación de la histamina
 Mediadores que afectan a los linfocitos
 Factores mitógenos
 Factores que afectan la producción de
 anticuerpos.
 Factor de transferencia.
 Factores que afectan a otros tipos celulares
 Factores citotóxicos: Linfotoxina.
 Factores inhibidores del crecimiento
 factor inhibitorio clonal
 factor inhibitorio de la proliferación
 Factor activante de los osteoclastos
 Factor estimulante de la colonia.
 Factor fijador de inmunoglobulinas
 Factor de reacción cutánea
 Interferón

Guadro 2 Productos de linfocitos activados (1)

	Peso molecular	Propiedades físicas	In vitro	Actividades In vivo
Factores de transferencia	Menos de 10 000	Termolábil; a) Polipeptido dializable b) No dializable	Producción de mediador Transformación de linfocitos	Transferencia de reactividad a linfocitos nuevos
MIF (factor activador de macrófagos)	25 000-55 000	Termoestable; proteína no dializable	Evita la migración al azar de macrófagos; puede activar macrófagos	Puede originar acumulación de macrófagos; puede aumentar la fagocitosis y la destrucción
Factor inhibidor de linfocitos	65 000	Proteína	Impide la migración de linfocitos	No estudiadas
Linfotoxinas	80 000-150 000	Termolábil; proteína no dializable	Lesión de célula blanco	Puede destruir células blancas
Factor de reactividad cutánea	70 000			Reacción cutánea localizada
Factores quimiotácticos	35 000-55 000	Termoestables; proteínas no dializables	Atrae macrófagos; atrae linfocitos	No estudiadas
Factores mitógenos	25 000	Termoestables; proteínas no dializables	Transformación inespecífica de linfocitos	No estudiadas
Interferón	25 000	Termoestable; no dializable	Inhibe la duplicación de virus	Inhibe la duplicación de virus
Anticuerpo	160 000	Termoestable; no dializable	Reacciona con antígeno	Diversos

Cuadro 3. Propiedades físicas y biológicas de las moléculas efectoras de la inmunidad mediada por células.

	Peso molecular	Propiedades físicas	In vitro	Actividades In vivo
Factores de transferencia	Menos de 10 000	Termolábil; a) Polipeptido dializable b) No dializable	Producción de mediador Transformación de linfocitos	Transferencia de reactividad a linfocitos nuevos
MIF (factor activador de macrófagos)	25 000-55 000	Termoestable; proteína no dializable	Evita la migración al azar de macrófagos; puede activar macrófagos	Puede originar acumulación de macrófagos; puede aumentar la fagocitosis y la destrucción
Factor inhibidor de leucocitos	65 000	Proteína	Impide la migración de leucocitos nucleares	No estudiadas
Linfolaxinas	80 000-150 000	Termolábil; proteína no dializable	Lesión de célula blanca	Puede destruir células blancas
Factor de reactividad cutánea	70 000			Reacción cutánea localizada
Factores quimiotácticos	35 000-55 000	Termoestable; proteínas no dializables	Atrae macrófagos; atrae leucocitos nucleares	No estudiadas
Factores mitógenos	25 000	Termoestables; proteínas no dializables	Transformación inespecífica de linfocitos	No estudiadas
Interferón	25 000	Termoestable; no dializable	Inhibe la duplicación de virus	Inhibe la duplicación de virus
Anticuerpo	160 000	Termoestable; no dializable	Reacciona con antígeno	Diversas

Cuadro 3. Propiedades físicas y biológicas de las moléculas efectoras de la inmunidad mediada por células.

ACIDO ACETILSALICILICO.

El efecto medicinal de la corteza de sauce blanco común (*Salix alba vulgaris*) y otras plantas se conoce hace siglos en varias culturas. En la Inglaterra de mediados del siglo XVIII, Edmund Stone describió, en una carta al presidente de la Royal Society, un caso de éxito de la corteza de sauce en la curación de fiebre. Su razonamiento fué que como el sauce crecía en zonas húmedas o pantanosas donde abundan las fiebres, debía poseer probablemente propiedades curativas apropiadas para esa dolencia.

El ingrediente activo de la corteza de sauce es un glucósido amargo llamado salicina, descubierto por Leroux en 1827. Por hidrólisis la salicina libera glucosa y alcohol salicílico. Piria, en 1835 hizo ácido salicílico con la salicina. En 1841, Cahours preparó ácido salicílico con aceite de gaulteria. La manufactura sintética de éste ácido con fenol se logró en 1860 por Kolbe y Lautemann. El salicilato de sodio fué utilizado por primera vez como antipirético y para la fiebre reumática por Buss en 1875, y al año siguiente su valor en la fiebre reumática fué descubierto en forma independiente por Strieker y MacLagan. En 1879, Sée observó que los salicilatos aumentaban la excreción urinaria de ácido úrico y ésta propiedad se utilizó en el tratamiento de la gota. En 1886 el salicilato de fenilo fué introducido en la medicina por Nencki, y la aspirina en 1899 por Dreser (15,16).

Propiedades Farmacológicas.

La aspirina (ácido acetilsalicílico) posee tres acciones farmacológicas fundamentales, a saber, antipirética, analgésica, y antiinflamatoria.

A) Acción Antipirética. Los salicilatos provocan un descenso de la temperatura corporal, siendo el mismo rápido y manifiesto en los animales y personas febriles, pero en los normales esta acción es muy poco intensa o prácticamente nula. La caída de la temperatura se inicia aproximadamente a los 30 minutos después de la ingestión de la droga, llega al máximo a las 2-3 horas declinando el efecto a las 6-8 horas. Los estudios calorimétricos han demostrado que estas drogas en el individuo febril no tienen prácticamente acción sobre la producción de calor o termogénesis, sino que aumentan la pérdida de calor del organismo o termolisis, con lo que la temperatura desciende. Esta pérdida de calor se produce por vasodilatación cutánea, que da lugar a una piel roja y caliente y expone gran cantidad de sangre caliente al ambiente, disipándose el calor por irradiación y convección, pero sobre todo dicha pérdida obedece a la sudoración, pérdida por evaporación, y dicha sudoración constituye un efecto prominente de las drogas antipiréticas.

Se ha demostrado que la administración de un antipirético durante la fiebre provoca un pasaje de agua desde los tejidos a la sangre; con aumento del volumen plasmático y disminución de la concentración de los elementos

sólidos (hemodilusión), fenómenos opuestos a los observados en la fiebre; dicho efecto, que no aparece en casos no febriles, favorece la circulación cutánea y la sudoración factores esenciales de la termólisis.

La regulación de la temperatura corporal requiere de un delicado equilibrio entre la producción y la pérdida de calor, y el hipotálamo regula el punto fijo en el que se mantiene la temperatura corporal. En la fiebre éste - punto fijo está evidentemente elevado y las drogas tipo aspirina promueven su retorno a la normalidad.

Como es sabido las sustancias pirogénicas, incluyen las toxinas bacterianas, no producen fiebre de por sí, sino que liberan de los leucocitos polimorfonucleares una proteína, el pirógeno endógeno, que una vez liberado a la circulación general, pasa al sistema nervioso central y estimula la liberación de las prostaglandinas de sitios discretos dentro del encéfalo, que incluyen probablemente el área hipotalámica preóptica. Este paso es el sensible a las drogas tipo aspirina (15, 17).

B) Acción antiinflamatoria. La más importante acción de los salicilatos se desarrolla en el tratamiento de los procesos inflamatorios. Una de las acciones más importantes de los salicilatos es la reducción del aumento de la permeabilidad que se presenta en la inflamación. Se sabe que las prostaglandinas PGE_2 , PGE_1 , PGF_1 alfa y la PGF_2 alfa además de la prostaciclina PGI_2 son sustancias que probablemente se generan en la inflamación produciendo aumento

de la permeabilidad vascular, del flujo sanguíneo local, de la quimiotaxis para leucocitos generando también dolor y fiebre. La inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas por las drogas tipo aspirina es considerado para explicar su modo de acción en relación a la inflamación (15, 16, 18).

C) Acción Analgésica. Constituye la segunda acción fundamental de éstas drogas las mismas son capaces de aliviar ciertos tipos de dolor, especialmente el que nace en estructuras somáticas como en músculos (mialgias), articulaciones (artralgias), nervios (neuralgias), dolor dentario y cefaléa, mientras que el dolor visceral es poco influido. Los otros tipos de sensibilidad (táctil, térmica y auditiva) no son afectadas.

La aspirina (ácido acetilsalicílico) sólo es efectiva como analgésico en los estados patológicos o los modelos experimentales en los que las prostaglandinas se sintetizan localmente. Este concepto también explica porque las drogas tipo aspirina son ineficaces contra el dolor agudo "en puñalada" causado por estimulación directa de los nervios sensitivos pero son efectivas contra el dolor sordo "pulsátil" de la inflamación, donde las prostaglandinas sensibilizan aparentemente las terminaciones nerviosas. La aspirina actúa principalmente en la periferia. Así, impidiendo la síntesis y liberación de las prostaglandinas en la inflamación, la aspirina puede evitar la sensibilización de los receptores dolorosos a la estimulación mecánica o a otros mediadores (15, 17).

D) Acción Uricosurica. Los salicilatos a dosis altas (más de 5 gr./día) aumentan la excreción urinaria de ácido úrico y disminuyen los niveles plasmáticos de uratos, probablemente al impedir su reabsorción tubular. Por otra parte las dosis pequeñas usadas como analgésicas no solo no inducen uricosuria, sino que pueden contrarrestar los efectos del probenecid y otros agentes uricosuricos sobre la excreción de ácido úrico (15, 16).

E) Efectos Gastrointestinales. El ácido acetilsalicílico causa irritación gástrica o intestinal y puede - originar posteriormente úlcera gástrica acompañándose de una anemia secundaria debida a hemorragia que puede agravarse por el efecto de la aspirina sobre la agregación plaquetaria. No se conocen las causas de las lesiones producidas por la aspirina en el estómago. Es probable que se deba a la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas o a una irritación local provocada por las partículas insolubles del ácido acetilsalicílico (15).

F) Efectos sobre la agregación plaquetaria. Se ha comprobado que el ácido acetilsalicílico inhibe la agregación plaquetaria inducida por el colágeno en el tubo de ensaye. Incluso la ingestión de dosis analgésicas prolonga - el tiempo de hemorragia en el ser humano, presumiblemente por inhibir la función de las plaquetas. La función plaquetaria parece perturbarse porque las drogas tipo aspirina bloquean la liberación de ADP inducida por el colágeno e impiden la formación por las plaquetas del tromboxano A₂, un potente agente agregante (15, 17).

G) Efectos sobre la prolongación de la gestación o del parto espontáneo. Se produce por que la biosíntesis de las prostaglandinas por el útero produce contracciones uterinas e hipotéticamente este es uno de los mecanismos por los que el feto es expulsado al nacer. Las prostaglandinas de las series E y F son potentes agentes uterotrópicos y su biosíntesis por el útero aumenta notablemente en las horas que preceden al parto. La administración de los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas pueden prolongar la gestación (15,23).

H) Efectos sobre la respiración. Los salicilatos estimulan la respiración directa e indirectamente. Las dosis terapéuticas máximas de salicilatos aumentan el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono. Este efecto se produce principalmente en el músculo esquelético y es el resultado del desacople inducido de la fosforilación oxidativa por el salicilato. La mayor producción de bióxido de carbono estimula la respiración. La mayor ventilación alveolar equilibra el aumento de producción de bióxido de carbono, y así la tensión plasmática de bióxido de carbono (P_{CO_2}) no varía (15,17).

A medida que el salicilato gana acceso al bulbo raquídeo, estimula directamente al centro respiratorio. Esto produce una marcada hiperventilación caracterizada por un aumento de la profundidad y de la frecuencia.

I) Efectos sobre el equilibrio ácido-base. Las dosis terapéuticas de los salicilatos producen cambios definidos en el equilibrio ácido-base y el cuadro de electrolitos. El evento inicial, como ya vimos, es una alcalosis

respiratoria extra e intracelular. Pronto se produce la compensación de la misma, hay aumento de la excreción renal de bicarbonato acompañado de sodio y potasio, disminuye así el bicarbonato plasmático y el pH vuelve a ser normal. Esta es la etapa de alcalosis respiratoria compensada.

Los cambios subsiguientes del estado ácido-base ocurren generalmente sólo cuando dosis tóxicas de salicilatos son ingeridas por niños y ocasionalmente con dosis grandes en adultos. En los primeros la fase de alcalosis respiratoria puede escapar a la observación del médico por que el niño con intoxicación por salicilato se ve raras veces en dicha etapa. Lo que puede observarse está caracterizado por una disminución del pH sanguíneo, baja concentración plasmática de bicarbonato y P_{CO_2} normal o casi normal en sangre, cambios que concuerdan, excepto el último, con el cuadro de acidosis metabólica, aunque en realidad lo que existe es una combinación de acidosis respiratoria y metabólica que se produce así: La depresión respiratoria por dosis tóxicas de salicilato permite la mayor producción de CO_2 para superar su excreción alveolar; por consiguiente aumenta la P_{CO_2} plasmática y disminuye el pH sanguíneo. Como el bicarbonato está bajo por excreción renal, el estado ácido-base en esta etapa es esencialmente una acidosis respiratoria no compensada a la que se superpone una acidosis metabólica verdadera causada por la acumulación de ácidos que se debe a su vez a tres procesos: 1) los derivados del ácido acetilsalicílico

co se disocian al pH plasmático y en dosis tóxicas desplazan 2-3 mEq/l de bicarbonato plasmático; 2) la depresión vasomotora causada por dosis tóxicas de salicilato deteriora la función renal con la subsiguiente acumulación de ácidos fuertes de origen metabólico, es decir, ácido sulfúrico y fosfórico; 3) los ácidos orgánicos se acumulan secundariamente a la perturbación inducida por los salicilatos del metabolismo de los hidratos de carbono, especialmente los ácidos pirúvico, láctico y acetoacético. Así aumenta más aún la acidosis metabólica(15,16,17).

J) Efectos cardiovasculares. Las dosis terapéuticas comunes de aspirina no tienen acciones cardiovasculares directas importantes. Los vasos periféricos tienden a dilatarse después de grandes dosis debido a un efecto directo sobre su músculo liso. Las cantidades tóxicas deprimen la circulación directamente y por parálisis vasomotora central. En los pacientes que reciben grandes dosis de aspirina o salicilato de sodio, como las que se usan en la fiebre reumática aguda, el volumen plasmático circulante aumenta aproximadamente en un 20%, el hematócrito desciende y hay aumento del gasto y trabajo cardíacos(17).

K) Efectos sobre los procesos reumáticos, inflamatorios e inmunológicos. Debido a la relación conocida entre la fiebre reumática y los procesos inmunológicos, se ha prestado atención a los efectos de los salicilatos sobre las reacciones antígeno-anticuerpo. Estos agentes suprimen muchas de éstas reacciones. Participan varios me-

canismos diferentes, entre ellos la supresión de la producción de anticuerpos, la interferencia en la agregación antígeno-anticuerpo, la inhibición in vitro de la liberación de histamina inducida por el antígeno y la estabilización no específica de los cambios de permeabilidad capilar en presencia de insultos inmunológicos. Las concentraciones de salicilatos necesarias para producir éstos efectos son altas y, la relación entre los efectos supresores de los salicilatos sobre los procesos inmunológicos y su eficacia antirreumática en el hombre queda por determinar(15).

L) Efectos metabólicos. Los salicilatos actúan sobre las mitocondrias evitando la formación de ATP y acelerando la velocidad de su destrucción. Por una parte, evitan la fosforilación oxidativa, posiblemente por competir con la NAD; por otra, estimulan la actividad de la adenosina trifosfatasa. En consecuencia, son inhibidas muchas reacciones del organismo que dependen del ATP, y la energía de oxidación que sería normalmente transferida a los enlaces fosfato del ATP se disipa, en cambio, en forma de calor. Así, en presencia de concentraciones elevadas de salicilatos, la oxidación mitocondrial se desarrolla a una mayor velocidad y el consumo de oxígeno y la producción de CO_2 están aumentados; éstos efectos pueden explicar el aumento de la temperatura corporal que se produce en los animales o en el hombre después de grandes dosis.

A grandes dosis, los salicilatos tienen otros efec-

tos importantes. La pérdida diaria de aminoácidos por la orina aumenta de 10 a 100 veces y el balance nitrogenado se hace negativo. El aumento del catabolismo proteico, la disminución de la incorporación de aminoácidos a las proteínas y la insuficiencia en el transporte renal de aminoácidos, contribuyen a la aminoaciduria.

En el hombre y en los animales, las grandes dosis de salicilatos producen hiperglucemia, glucosuria y depleción del glucógeno muscular y hepático; éstos efectos se explican en parte por la liberación de adrenalina por activación de los centros simpáticos centrales. A dosis terapéuticas inhiben también la síntesis de ácidos grasos y disminuyen el nivel plasmático tanto de fosfolípidos como de colesterol. Grandes dosis de salicilatos disminuyen el nivel plasmático de protrombina. La deficiencia de vitamina K hace más susceptible esta acción posiblemente por competición de los salicilatos con la vitamina K por un receptor de las enzimas del hígado responsables de la síntesis de protrombina y de otros factores de la coagulación(factores II,VII,IX y X) (15,16,18).

C A P I T U L O I I

FUNDAMENTACION DEL TEMA.

La aspirina (ácido acetilsalicílico) sigue siendo probablemente el agente analgésico, antipirético y antiinflamatorio más empleado en la actualidad. Es importante mencionar algunos otros efectos sobre el organismo humano como son: el efecto uricosúrico, efectos gastrointestinales, sobre la agregación plaquetaria, sobre la respiración y sobre el equilibrio ácido-base. El hombre confía en ella como analgésico doméstico común, pero por su fácil accesibilidad, el consumo que se hace es excesivo. Del mismo modo el farmacólogo y el clínico elogian la eficacia e inocuidad de la aspirina como analgésico y antirreumático pero creen necesario hacer constantes advertencias acerca de su papel como causa común de envenenamiento letal en niños pequeños debido a su alto potencial de toxicidad si se le usa indevidamente. Enormes cantidades del fármaco se consumen en México y los Estados Unidos, algunas estimaciones hablan de 10-20 mil toneladas por año (15).

Durante casi 100 años el ácido acetilsalicílico y sus derivados han conservado su posición eminente en el tratamiento de las enfermedades reumáticas, suprimiendo los signos clínicos y hasta mejorando el cuadro histológico, sin embargo, no mejoran los daños tisulares subsiguientes, como lesiones cardíacas y otras manifestaciones viscerales. Además de su acción inhibitoria sobre la biosíntesis de las prostaglandinas (inhibiendo la enzima ciclooxigenasa), el mecanismo de acción del ácido acetyl

salicílico en la enfermedad reumática puede también incluir efectos sobre los procesos celulares e inmunológicos.

Debido a la relación conocida entre la artritis reumatoidea y los procesos inmunológicos, se ha prestado atención a los efectos del ácido acetilsalicílico sobre las reacciones antígeno-anticuerpo, sobre el sistema del complemento, la producción de anticuerpos, la interferencia en la agregación antígeno-anticuerpo, la inhibición in vitro de la liberación de histamina inducida por el antígeno y la estabilización no específica de los cambios de permeabilidad capilar en presencia de estímulos inmunológicos. La concentración de éste fármaco para producir éstos efectos son altas (3.6 - 7.2 g/día; la dosis letal para el adulto oscila entre los 20 g/día), y la relación entre los efectos supresores del ácido acetilsalicílico sobre los procesos inmunológicos y su eficacia antirreumática queda por determinar.

Por ello, el trabajo que se pretende realizar consiste precisamente en determinar los efectos supresores del fármaco sobre los procesos inmunológicos evaluados por las reacciones de hipersensibilidad (15,22).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Considerando que en la actualidad el ácido acetilsalicílico es ampliamente utilizado por la población en general, tanto por prescripción médica como por automedicación, teniendo en cuenta además que juega un papel muy importante en el tratamiento sintomático de pacientes con enfermedades autoinmunes, como por ejemplo artritis reumatoidea y, puesto que la investigación realizada hasta el momento no proporciona datos concretos del efecto del ácido acetilsalicílico sobre el sistema inmune; decidimos realizar éste estudio.

C A P I T U L O I I I

OBJETIVOS.**Objetivo General.**

Evaluar los efectos del ácido acetilsalicílico sobre el sistema inmunológico en un modelo en rata.

Objetivos Específicos.

Evaluar los efectos del ácido acetilsalicílico en la reacción de hipersensibilidad inmediata (mediada por anticuerpos IgE)

Evaluar los efectos del ácido acetilsalicílico en la reacción de hipersensibilidad retardada (mediada por células).

Evaluar los efectos del ácido acetilsalicílico sobre el porcentaje en peso de los siguientes órganos: hígado, bazo y riñones.

Evaluar los efectos del ácido acetilsalicílico sobre los siguientes parámetros hematológicos: Tiempo de sangrado, tiempo de coagulación, concentración de hemoglobina, hematócrito, recuento de glóbulos blancos y diferencial de leucocitos.

C A P I T U L O I V

HIPOTESIS.

Después de la administración del ácido acetilsalicílico el sistema inmunológico de la rata estará alterado.

CAPITULO V

MATERIAL.**Equipo.**

balanza analítica. Mettler H80
balanza granataria
baño de agua. Maosa Mod EMT-4
centrífuga. Solbat Mod J-12
espectrofotómetro Bausch y Lomb. Spectronic 20
estufa. Riossa Mod EC
microcentrífuga. Solbat Mod H-07
microscopio. Carl Zeiss
microscopio. American Optical
agitador de tubos. Solbat
agitador de pipetas. Clay Adams
Agitador magnético con placa de calentamiento.
cronómetro

Material.

camara de Neubauer
pipeta de thoma para recuento de leucocitos
pipeta sahli de 20 microlitros
pipetas serológicas de 0.1 ml
pipetas serológicas de 0.2 ml
pipetas serológicas de 1.0 ml
pipetas graduadas de 10 ml
pipetas graduadas de 5 ml
tubos de ensayo de 12 x 75 mm
tubos de ensayo de 13 x 100 mm
vasos de precipitado de 25 ml

vasos de precipitados de 100 ml
vasos de precipitados de 500 ml
matraz volumétrico de 25 ml
matraz volumétrico de 50 ml
tubos capilares sin heparina
portaobjetos
vidrio de reloj
marcadores
papel filtro
toallas sanitarias
gradillas
cinta adhesiva
bisturi
pinzas de disección
tijeras de disección
papel parafilm
papel estaño
cánulas de acero inoxidable
jeringas desechables de 1 ml
agujas desechables
regla transparente graduada
jaulas para las ratas
tabla de disección

Material biológico.

20 ratas cepa C II Zv (machos)
40 ratas cepa Wistar (machos)
ovoalbúmina EGG. Sigma Chemical Company
vacuna BCG liofilizada con glutámato. SSA
 Gcia. Gral. Prod. Biol. y Reac.
vacuna PPD. Tuberculina SSA
 Gcia. Gral. Prod. Biol. y Reac.

Reactivos.

ácido acetilsalicílico grado farmacéutico
 Laboratorios Mercury
aceite puro de cártamo
solución de Drabkin
solución de Turk
solución de citrato de sodio
solución amortiguadora de fosfatos pH 6.4
colorante de Wright

MÉTODOS.

El estudio se realiza en cuatro grupos de ratas (A, B, C, y D). Cada grupo consta de 10 ratas. Los grupos A y B sirven de control o referencia para los grupos C y D. Los grupos A y C se sensibilizan con albúmina de huevo al 1% por vía intraperitoneal y los grupos B y D se sensibilizan con BCG(vacuna) por vía de cojinete plantar; a los grupos C y D se les administra el 15% de la LD₅₀ (1.75 g/Kg) de ácido acetilsalicílico en suspensión por vía oral. Las ratas se pesan cada tercer día con el fin de administrar una dosis del 15% de la LD₅₀ durante los 30 días de aplicación.

Al finalizar los 30 días los grupos A y C se estimulan inmunológicamente con albúmina de huevo al 1% intradérmicamente y los grupos B y D se estimulan con PPD por vía intradérmica también.

Para el caso de la hipersensibilidad inmediata se miden los diámetros de las ronchas a los 120 minutos después de retar inmunológicamente a la rata con el antígeno. En la hipersensibilidad retardada los diámetros se miden a las 24 horas después del reto con el antígeno.

Como parte complementaria del estudio realizamos la evaluación de los siguientes parámetros hematológicos: Tiempo de sangrado, tiempo de coagulación, concentración de hemoglobina, hematócrito, cuenta de glóbulos blancos, diferencial de leucocitos y peso de órganos.

Manejo de animales.

Sacar al animal de la jaula tomándolo por la cola e inmediatamente apoyarlo sobre la rejilla para evitar lesiones. Posteriormente inmovilizarlo utilizando un guante de cuero haciendo presión entre el cuello y las extremidades superiores, evitando dañar al animal de experimentación(24).

Administración del ácido acetilsalicílico.

Inmovilizar y sostener la rata en posición vertical procurando que la cabeza esté en vertical con respecto al cuerpo de la misma e introducir una cánula (adaptada a una jeringa en la que previa administración se mide la dosis) por un extremo del hocico del animal, deslizándola lentamente sin causar daño de manera que llegue al estómago. Se deposita la dosis lentamente y se retira la cánula con precaución.

Sensibilización con albúmina de huevo.

Ya inmovilizado el animal de experimentación se procede de la siguiente manera: se sostiene la rata con la cabeza hacia abajo y el vientre en posición vertical, para evitar el daño de algún órgano, se retira la piel a

dominal introduciendo la aguja hasta el peritoneo e inyectar lentamente la dosis(0.1 ml de sol. de albúmina de huevo al 1%).

Sensibilización con BGG.

Ya sujeto el animal se procede como sigue: se sostiene firmemente una extremidad posterior del animal, se desinfecta la zona de cojinete plantar con cloruro de benzalconio y se introduce la aguja inyectando la mitad de la dosis(0.1 ml de la vacuna), después se aplica la otra mitad de la dosis en el cojinete plantar de la otra extremidad(9).

Estimulación con PPD y albúmina de huevo.

La preparación de la piel para la estimulación es como sigue: se corta el pelo de una área delimitada del lomo de la rata evitando dañar la piel, aplicar crema bariflor depilatoria con una espátula sin frotar, cubriendo el pelo que se desea remover. dejar actuar por 8-15 minutos. Remover la crema lavando con agua tibia y secar sin frotar, con una toalla suave(9).

Sujetar la rata firmemente e introducir la aguja en la piel del animal con el vicel hacia arriba; invertir el vicel para asegurar que se inyecte completamente la dosis(0.1 ml). Retirar la aguja y marcar la zona de inoculación.

Tiempo de sangrado.

Sujetar suavemente la cola de la rata y realiar el corte de la punta de la cola con las tijeras, al mismo tiempo poner en marcha el cronómetro. Cada 15 seg limpiar la sangre que ha fluido con papel filtro sin tocar la superficie de la piel hasta observar que la sangre deja de fluir, en ese momento detener el cronómetro y anotar el tiempo(20,21).

Tiempo de coagulación.

Método del capilar: Teniendo anestesiado al animal se corta la vena axilar e inmediatamente se pone en marcha el cronómetro, al mismo tiempo, llenar el capilar sin heparina hasta las dos terceras partes. Invertir el capilar constantemente hasta observar que ya no hay deslizamiento de la sangre; se rompe el capilar para ver el momento en el que se forman los hilos de fibrina. Detener el cronómetro y registrar el tiempo(20,21).

Toma de muestra sanguínea.

Anestesiarse y cortar la vena axilar del animal e inmediatamente que fluya la sangre se recogen 4.5 ml en un tubo de 13x100 que contiene 0.5 ml de anticoagulante(citrato de sodio al 5%). Agitar el tubo suavemente para mezclar.

Determinación de hemoglobina.

Método de la cianometahemoglobina: Colocar 5 ml de solución de Drabkin en un tubo de ensayo de 13x100. Llenar con sangre exactamente hasta la marca de 0.02 ml la pipeta de sahli, limpiar la sangre adherida al exterior de la pipeta con una gasa. Transferir el contenido de la pipeta a la solución reactiva enjuagando la pipeta en la solución (dilución 1:251). Mezclar y dejar en reposo durante 10 minutos. Leer a 540 nm en el espectrofotómetro contra un blanco de reactivos. Extrapolar la lectura en la curva de calibración (coglubín) (20).

Determinación de hematócrito.

Método del microhematócrito: Llenar las dos terceras partes del capilar con sangre, sellar a la flama o con plastilina por el extremo más distante a la sangre. Una vez sellado se coloca en una microcentrífuga. Centrifugar durante 5 minutos a 10-12 mil rpm. Calcular el % del paquete celular en relación al volumen total (20).

Cuenta de leucocitos.

Llenar con sangre la pipeta de thoma para glóbulos-

blancos hasta la marca de 0.5 . Limpiar la sangre adherida en el exterior de la pipeta con una gasa, completar hasta la marca de 1.1 con líquido de Turk, homogenizar durante un minuto en el agitador de pipetas. Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer, descartar las primeras 4-5 gotas de la pipeta, llenar la cámara por uno de los bordes, dejando que el líquido penetre lentamente. Dejar reposar de 3-5 minutos y observar al microscopio con el objetivo 10X y realizar el conteo en los cuadrantes de los extremos de la cámara de Neubauer. Multiplicar por 50 el número de células contadas(20).

Determinación del % en peso de un órgano de rata.

Se sacrifica el animal, se extraen hígado, bazo y riñones depositándolos por separado en charolas de papel estaño, que previamente se tararán y se procede a pesarlos. Por diferencia se obtiene el peso del órgano, el cual se relaciona con el peso total de la rata de la siguiente manera:

$$\% \text{ en peso} = \frac{\text{peso del órgano en gr.}}{\text{peso de la rata en gr.}} \times 100$$

Recuento diferencial de leucocitos.

Colocar una pequeña gota de sangre con anticoagulante en el extremo de un portaobjetos limpio y desengrasa-

do. Utilizando el borde de otro portaobjetos, se extiende la gota de sangre a lo largo del portaobjetos con un movimiento uniforme. Secar al aire la extensión. Colocar el portaobjetos sobre un soporte en posición horizontal y con la extensión hacia arriba, cubrir el portaobjetos con colorante de Wright el tiempo conveniente (el tiempo de tinción varía de acuerdo al lote y madurez del colorante). Inmediatamente después se adiciona la solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.4 sobre el colorante hasta la aparición de un brillo metálico en la superficie. Dejar reposar por 3-5 minutos. Se lava el portaobjetos con agua destilada secando al aire la extensión. El examen microscópico se realiza en la parte media del frotis, con objetivo 100X agregando una gota de aceite de inmersión.

C A P I T U L O VI

RESULTADOS.

Como se observará en las tablas y sus gráficas correspondientes que están a continuación, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo testigo y el grupo problema al evaluar la hipersensibilidad de tipo inmediata; mientras que en la hipersensibilidad de tipo retardado no se observó diferencia significativa.

Como parte complementaria de éste trabajo, se evaluarón los siguientes parámetros hematológicos, sin encontrar diferencias significativas: Tiempo de sangrado, tiempo de coagulación, concentración de hemoglobina, hematócrito, cuenta de glóbulos blancos, diferencial de leucocitos y pesado de órganos(hígado, bazo y riñones). Se anexan las tablas y gráficas correspondientes.

Para realizar el análisis estadístico utilizamos la prueba de "U" de Mann Whitney; es una prueba que hace un análisis estricto de los datos, proporcionando seguridad en el análisis. A continuación se explica el método del análisis estadístico de Mann Whitney, proporcionando un ejemplo para su mejor comprensión.

Probabilidad de Mann Whitney.

1.- Se tienen dos grupos, uno de ratas testigo (sin administrar ácido acetilsalicílico) y otro de ratas problema (administradas con ácido acidoacetilsalicílico).

2.- Cada grupo está formado de cierto número de elementos que son n_1 y n_2 respectivamente.

3.- A cada elemento de ambos grupos se les enumera en orden progresivo, de acuerdo con sus valores que presentan, asignándoles la numeración 1, 2, 3, ..., etc.

4.- En el caso de dos o más elementos que tengan el mismo valor los números correspondientes del orden progresivo se suman entre sí y se dividen entre el número de elementos, es decir, si los números que les correspondían eran 4, 5 y 6, se suman éstos y se dividen entre el número de elementos en éste caso es 3, y por tanto se les asigna el valor obtenido, y al siguiente elemento en el orden progresivo se le pone el número siguiente en éste caso el número 7 y así sucesivamente.

5.- Obtenido el valor creciente de ambos grupos se procede a sumarlos, cada grupo por separado.

6.- A la suma de cada grupo se le designa con la letra R_1 y R_2 respectivamente.

7.- Se les aplica la siguiente relación para encontrar U_1 y U_2 .

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 (n_2 + 1) - R_2$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 (n_1 + 1) - R_1$$

8.- Obtenidos los valores de U_1 y U_2 , se toma el me
nor.

9.- En la tabla de probabilidad de Mann Whitney, bus
car el número de intersección de n_1 y n_2 .

10.- Si el valor de U es menor o igual que el obteni
do en las tablas, los grupos en cuestión son diferentes
estadísticamente, con una probabilidad (P) menor de 0.05
(25, 26.)

Ejemplo.

Se tienen dos grupos de ratas, testigo sin administración de ácido acetilsalicílico y problema con administración de ácido acetilsalicílico. Se quiere determinar si presentan diferencias en el % de hematócrito.

RATAS TESTIGO		RATAS PROBLEMA	
U_1		U_2	
Resultado	Orden	Resultado	Orden
Experimental.	Progresivo	Experimental.	Progresivo
44 -----	10.5	42 -----	3.5
40 -----	1.0	43 -----	6.5
45 -----	14.5	45 -----	14.5
43 -----	6.5	44 -----	10.5
46 -----	18.0	41 -----	2.0
46 -----	18.0	46 -----	18.0
44 -----	10.5	45 -----	14.5
47 -----	20.0	43 -----	6.5
42 -----	3.5	44 -----	10.5
43 -----	6.5	45 -----	14.5
$n_1 = 10$	$R_1 = 109$	$n_2 = 10$	$R_2 = 101$

Sustituyendo en la fórmula se tiene:

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 (n_2 + 1) - R_2$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_1 = (10)(10) + 1/2 (10)(10 + 1) - 101$$

$$U_1 = 100 + 55 - 101 = 54$$

$$U_2 = (10)(10) + 1/2 (10)(10 + 1) - 109$$

$$U_2 = 100 + 55 - 109 = 46$$

Se elige $U_2 = 46$ por ser éste el menor.

El número de intersección en las tablas de $n_1 = 10$ y $n_2 = 10$ corresponde al número 23 .

El valor de U_2 es mayor al encontrado en las tablas, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre las dos poblaciones de ratas.

Tabla de Probabilidades de Mann Whitney.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2												1	1	1	1	1	2	2	2	2
3						1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4					1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13
5				1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6		1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	16	17	19	21	22	24	25	27
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	30	32	34
8		2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	28	31	34	36	36	38	41
9		2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48	48
10		3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55	55
11		3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62	62
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69	69
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76	76
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	67	74	78	83	83
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90	90
16	1	5	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98	98
17	2	5	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	67	75	81	87	93	99	105	105
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112	112
19	2	7	13	19	25	32	38	45	52	59	65	72	78	85	92	99	106	113	119	119
20	2	7	13	20	27	34	41	47	55	62	69	75	83	90	98	105	112	119	127	127

Lecturas de los diámetros de las rochas en la evaluación de la hipersensibilidad inmediata.

Rata	Testigo (mm)	Problema (mm)
1	17 x 17	15 x 15
2	16 x 17	14 x 15
3	17 x 17	13 x 12
4	15 x 18	13 x 15
5	15 x 15	15 x 15
6	15 x 14	14 x 15
7	16 x 17	11 x 12
8	18 x 17	15 x 15
9	18 x 18	15 x 15
10	-----	13 x 12

$P < 0.05$ Es significativo estadísticamente.
(Mann Whitney)

Nota: Lecturas tomadas a los 120 minutos después del reto con el antígeno(dosis 0.1 ml de albumina de -- huevo al 1%).

Lecturas de los diámetros de las rochas en la evaluación de la hipersensibilidad retardada.

Rata	Testigo (mm)	Problema. (mm)
1	5 x 5	3 x 4
2	4 x 5	5 x 5
3	4 x 5	6 x 5
4	4 x 4	4 x 5
5	4 x 5	4 x 4
6	5 x 6	4 x 4
7	5 x 6	5 x 5
8	4 x 5	4 x 4
9	5 x 5	5 x 5
10	4 x 4	3 x 4

$P > 0.05$ No es significativo estadísticamente.
(Mann Whitney).

Nota: Lecturas tomadas a las 24 horas después del reto -
con el antígeno (dosis 0.1 ml de PPD).

Lecturas de la determinación del tiempo de sangrado en el
grupo testigo y grupo problema.

Rata	Testigo (seg)	Problema (seg)
1	57	120
2	54	82
3	87	68
4	120	90
5	90	93
6	140	161
7	188	---
8	100	65
9	106	106
10	---	87
11	180	143
12	185	81
13	183	136
14	187	166
15	133	133
16	62	60
17	181	180
18	151	85
19	119	138
20	150	175

$P > 0.05$ No es significativo estadísticamente.
(Mann Whitney).

Lecturas de la determinación del tiempo de coagulación en el grupo testigo y grupo problema.

Rata	Testigo (seg)	Problema (seg)
1	62	82
2	81	92
3	109	58
4	82	80
5	85	46
6	85	119
7	136	—
8	126	137
9	120	115
10	---	131
11	75	109
12	159	160
13	147	146
14	145	120
15	103	69
16	148	157
17	133	152
18	150	137
19	152	141
20	143	155

$P > 0.05$ No es significativo estadísticamente.

(Mann Whitney).

Lecturas de la determinación de la concentración de hemo
globina en el grupo testigo y grupo problema.

Rata	Testigo (g/dl)	Problema (g/dl)
1	18.1	17.7
2	16.5	18.1
3	18.1	18.7
4	19.0	18.1
5	18.1	18.7
6	18.1	18.7
7	19.0	17.0
8	18.1	19.0
9	18.1	18.1
10	19.0	18.7
11	18.7	17.7
12	19.0	17.3
13	18.1	-----
14	19.0	-----
15	19.0	-----
16	17.7	-----

$P > 0.05$ No es significativo estadísticamente.

(Mann Whitney).

Lecturas de la determinación de hematócrito en el grupo-
testigo y grupo problema.

Rata	Testigo (%)	Problema (%)
1	44	42
2	40	45
3	43	45
4	46	43
5	45	45
6	44	45
7	47	41
8	43	46
9	43	44
10	46	45
11	45	44
12	46	43
13	43	--
14	47	--
15	47	--
16	42	--

$P > 0.05$ No es significativa estadísticamente.

(Mann Whitney).

Lecturas de la determinación de leucocitos en el grupo -
testigo y grupo problema.

Rata	Testigo (cel/mm ³)	Problema (cel/mm ³)
1	9700	7050
2	8200	7550
3	9700	8350
4	8100	12850
5	10700	10450
6	7650	10500
7	7200	8650
8	9500	9100
9	8900	10150
10	8500	6600
11	9350	10250
12	10650	9100
13	9500	----
14	8550	----
15	8450	----
16	13700	----

P > 0.05 No es significativo estadísticamente.
(Mann Whitney).

Lecturas de la determinación del % en peso de hígado, bazo y riñones en el grupo testigo y el grupo problema.

Rata	Testigo			Problema		
	H	B	R	H	B	R
1	3.84	0.17	0.65	3.86	0.19	0.61
2	4.31	0.18	0.66	3.98	0.20	0.63
3	3.56	0.15	0.60	4.10	0.20	0.66
4	4.00	0.16	0.61	3.85	0.16	0.65
5	4.45	0.17	0.60	3.41	0.21	0.64
6	4.09	0.16	0.65	3.84	0.17	0.66
7	3.44	0.20	0.66	3.74	0.17	0.66
8	4.40	0.15	0.71	4.35	0.19	0.70
9	3.81	0.16	0.60	4.09	0.19	0.62
10	4.30	0.17	0.61	4.03	0.18	0.60
11	4.48	0.18	0.78	4.22	0.16	0.66
12	3.78	0.15	0.59	5.26	0.17	0.71
13	4.16	0.20	0.65	4.57	0.18	0.77
14	4.11	0.18	0.63	5.02	0.20	0.73
15	4.52	0.21	0.67	4.43	0.15	0.68
16	4.60	0.17	0.81	5.04	0.21	0.87
17	4.64	0.16	0.66	4.45	0.18	0.67

H = Hígado

B = Bazo

R = Riñones.

$P > 0.05$ No es significativo estadísticamente.

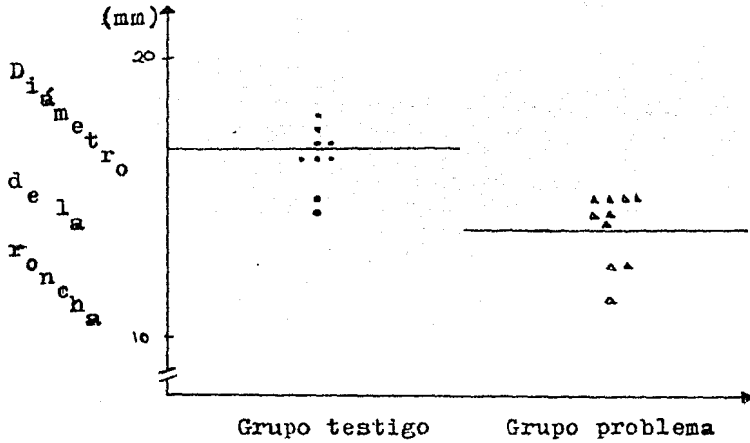
(Mann whitney).

Lecturas de la diferencial de glóbulos blancos en el
grupo testigo y grupo problema.

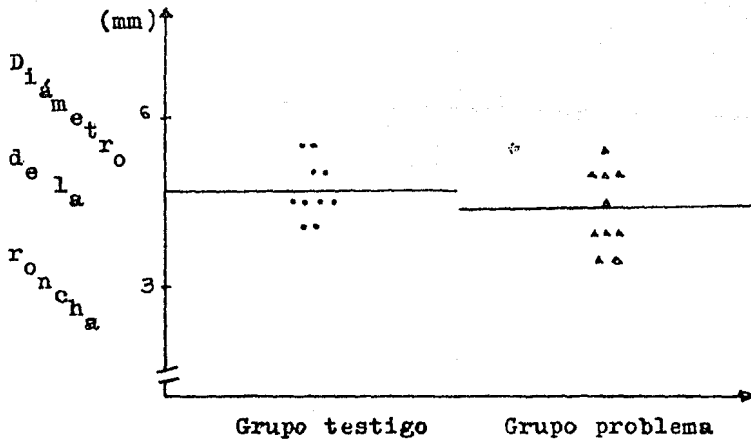
Rata	Testigo					Problema				
	Lin	Seg	Mon	Ban	Eos	Lin	Seg	Mon	Ban	Eos
1	83	10	7	-	-	81	10	7	2	-
2	82	10	4	-	4	82	7	8	2	1
3	69	23	4	2	2	84	7	6	-	3
4	89	8	1	1	1	75	17	8	-	-
5	84	9	5	1	1	86	11	2	-	1
6	84	14	1	1	-	81	14	3	1	1
7	84	13	1	2	-	90	9	1	-	-
8	85	10	5	-	-	94	3	3	-	-
9	87	10	-	3	-	93	6	-	-	1
10	85	10	5	-	-	76	17	6	1	-
11	73	20	1	5	1	94	2	-	-	4
12	88	20	7	5	-	70	23	1	2	4
13	70	22	5	2	1	73	26	1	-	-
14	79	13	5	2	1	90	8	-	1	1
15	89	10	1	-	-	88	9	3	-	-
16	90	8	2	-	-					

$P > 0.05$ No es significativo estadísticamente.

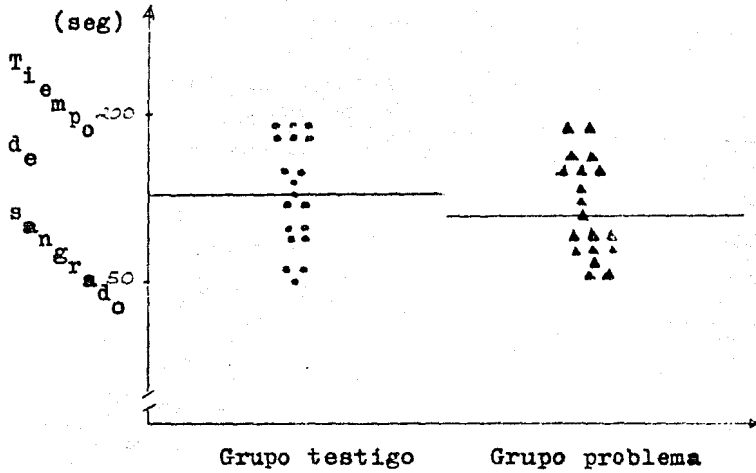
(Mann Whitney).



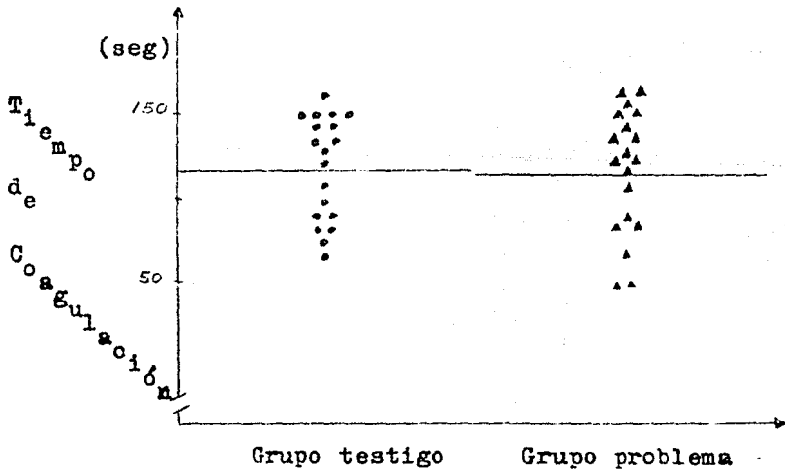
Gráfica # 1. Diámetro de las ronchas en la evaluación de la hipersensibilidad inmediata.



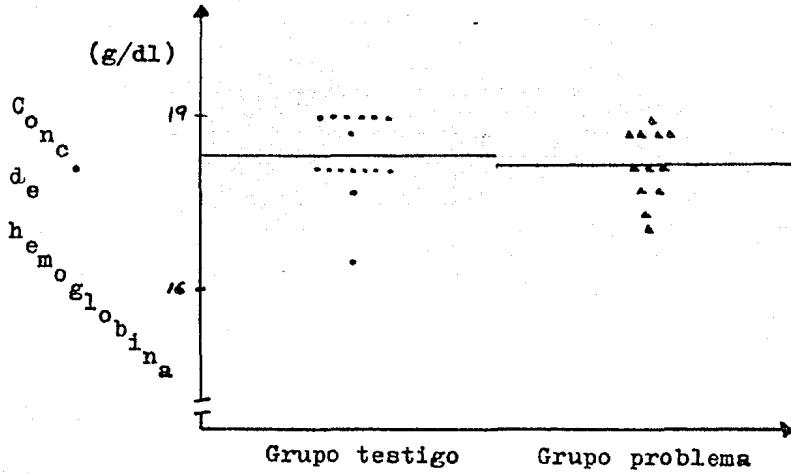
Gráfica # 2. Diámetro de las ronchas en la evaluación de la hipersensibilidad retardada.



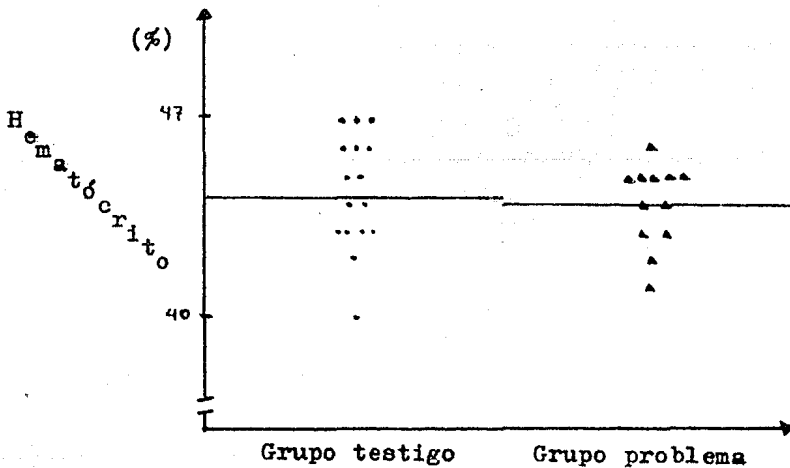
Gráfica # 3. Determinación del tiempo de sangrado en el grupo testigo y el grupo problema.



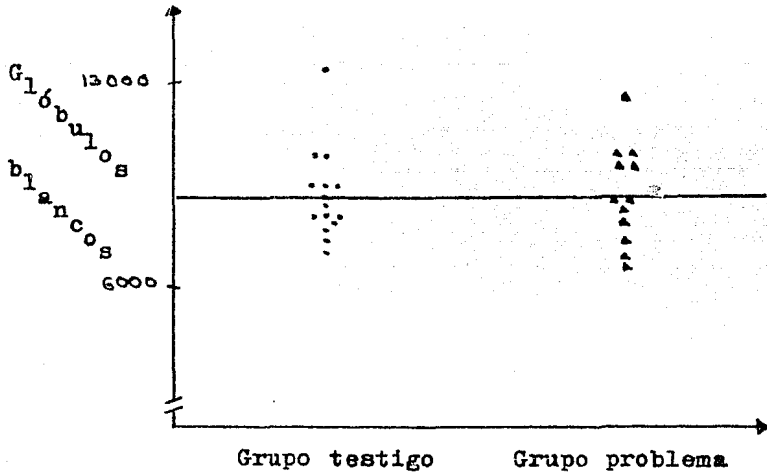
Gráfica # 4. Determinación del tiempo de coagulación en el grupo testigo y el grupo problema.



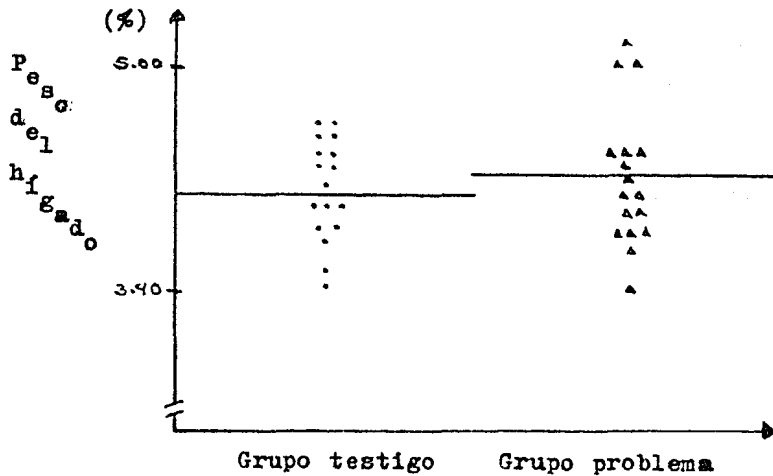
Gráfica # 5. Determinación de la concentración de hemoglobina en el grupo testigo y grupo problema.



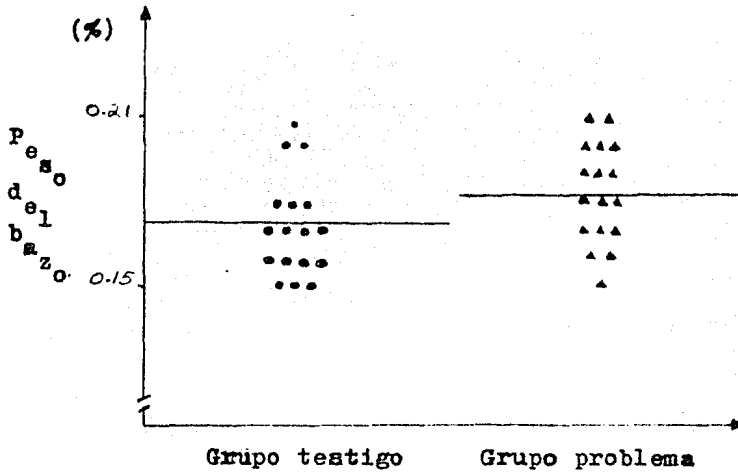
Gráfica # 6. Determinación del hematócrito en el grupo testigo y el grupo problema.



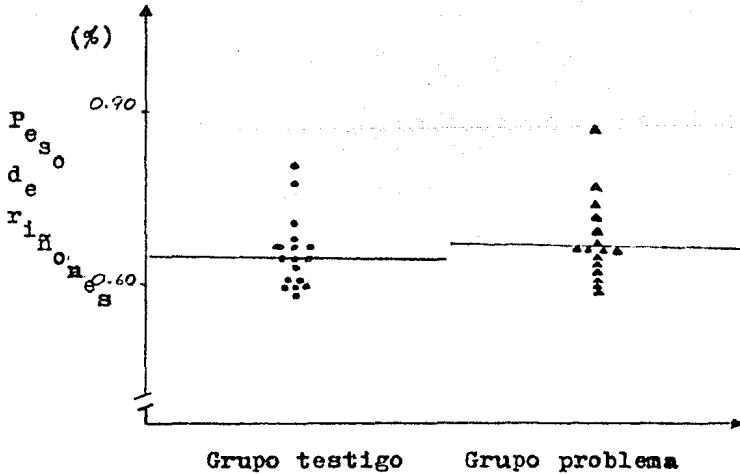
Gráfica # 7. Determinación de glóbulos blancos en el grupo testigo y el grupo problema.



Gráfica # 8. Determinación del % en peso del hígado en el grupo testigo y el grupo problema.



Gráfica # 9. Determinación del % en peso del bazo en el grupo testigo y el grupo problema.



Gráfica # 10. Determinación del % en peso de riñones en el grupo testigo y el grupo problema.

DISCUSION DE RESULTADOS.

Como se observó en los resultados la expresión de la hipersensibilidad de tipo inmediata se encontró alterada, pero no así la expresión de la hipersensibilidad de tipo retardada después de la administración del ácido acetilsalicílico. Suponemos que el efecto del ácido acetilsalicílico sobre la hipersensibilidad de tipo inmediata se puede explicar de la siguiente manera: 1) Por el hecho de que el ácido acetilsalicílico suprime la producción de anticuerpos; 2) Por su interferencia en la expresión biológica de la reacción antígeno-anticuerpo; 3) Por la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas y 4) Por su efecto inhibitorio sobre el PAF (Factor aglutinante de las plaquetas).

Aunque sabemos que el ácido acetilsalicílico inhibe la producción de un potente agente agregante plaquetario (tromboxano A_2) y que disminuye los niveles plasmáticos de protrombina, el tiempo de sangrado y de coagulación no estuvieron alterados a la dosis manejada.

La hipersensibilidad de tipo retardada no se vio alterada posiblemente porque el ácido acetilsalicílico no tiene efecto alguno sobre las células y moléculas efectoras de ésta reacción o probablemente se requieran dosis mayores para que se vea afectada ésta respuesta.

La concentración de hemoglobina, el hematócrito, el recuento de leucocitos, el porcentaje en peso de hígado, bazo y riñones y la diferencial de leucocitos tampoco se encontraron alterados.

C A P I T U L O VII.

CONCLUSIONES.

Después de analizar estadísticamente y discutir los resultados concluimos que posteriormente a la administración del ácido acetilsalicílico por un periodo de 30 días consecutivos y administrando una dosis del 15% de la LD₅₀ ;

- 1) La hipersensibilidad de tipo inmediata se encontró alterada.
- 2) La hipersensibilidad de tipo retardada no se vió alterada.
- 3) La concentración de hemoglobina no se encontró alterada.
- 4) El hematócrito no se encontro alterado.
- 5) El recuento de glóbulos blancos no se encontró alterado.
- 6) La diferencial de leucocitos no se -- encontró alterada.
- 7) El porciento en peso de hígado, bazo y riñones no se encontró alterado.
- 8) El tiempo de sangrado y de coagulación tampoco se encontraron alterados.

NOTA : Sabemos por la literatura y por reportes clínicos que el ácido acetilsalicílico causa disturbios en la función plaquetaria y en algunos factores de la coagulación, por lo que esperabamos encontrar alterados estos parámetros; sin embargo, a la dosis utilizada y al tiempo de administración no se encontraron alteraciones.

C A P I T U L O V I I I .

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Fudenberg, H.H. Inmunología Clínica . Ed. Manual Moderno. 3ed, México, 1982 .
- 2.- Bellanti, A.J. Inmunología . Ed. Interamericana, 2ed, México, 1980 .
- 3.- Gordon, B.L. Lo esencial de la inmunología. Ed. Manual Moderno, 2ed, México, 1981 .
- 4.- Alexander, W.J. y Good, A.R. Fundamental of clinical immunology . Ed. W.B. Saunders Co, Toronto 1977 .
- 5.- Miescher, A.P. y Müller, J.H. Tratado de Inmunopatología. Vol II, Ed. Científico-médica, led, - Barcelona, 1971 .
- 6.- Parker, W.C. Clinical Immunology. Ed. W.B. Saunders Co, led, Vol I, New York, 1981 .
- 7.- Rosenthale, E.M. y Mamsman, C.H. Immunopharmacology. Ed. Spectrum publications inc, New York - 1975 .
- 8.- Hudson, L. y Hay, F.C. Practical Immunology. Ed. Blackwell Scientific Publications, led, Great - Britain, 1976 .
- 9.- Manual de prácticas de postgraduados del departamento de inmunología de ENCB, IPN, México 1978.
- 10.- Bach, J.F. y Lasavre, F. Inmunología. Ed. Masson led, México, 1981 .

- 11.- Saniter, M. Enfermedades Inmunológicas. Ed. Torrey, led, Tomo I, Barcelona, 1974 .
- 12.- Davis, B.D. y Dulbecco, R. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat, 2ed, México, 1980 .
- 13.- Freeman, V.A. Tratado de Microbiología de Burrows Ed. Interamericana. 2led, México, 1983 .
- 14.- Bojalil, F.L. y Santosoy, G.G. Microbiología Médica. Ed. Francisco Méndez Oteo, led, Vol I, -- México, 1981 .
- 15.- Goodman, L.S. y Gilman, A. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. Ed. Médico Panamericana 6ed, Buenos Aires, 1982 .
- 16.- Goth, A. Farmacología Médica. Ed. Mosby, 9ed, -- España, 1979 .
- 17.- Drill, V.A. Farmacología Médica. Ed. La prensa médica mexicana, 2ed, México, 1978 .
- 18.- Passmore, R. y Robson, I. Tratado de enseñanza integrada de la medicina. Ed. Científico Médica-Barcelona, 1971 .
- 19.- Goldstein, A. Farmacología. Ed. Limusa, 2ed, -- México, 1978 .
- 20.- Davidsohn, I. y Henry, J.B. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat, 6ed, Barcelona,-- 1981 .
- 21.- Rapaport, I.M. Introducción a la Hematología. Ed Salvat, led, México, 1981 .
- 22.- Salter, R.B. Transtornos y lesiones del sistema musculoesquelético. Ed. Salvat, led, Barcelona,-- 1981.

- 23.- Robertson, P. Prostaglandinas en salud y enfermedad. Ed. Interamericana, led. México, 1981.
- 24.- Oteisa, J. F. Manejo de Animales. Ed. Textos Universitarios, UNAM, 1979.
- 25.- Campbell, R. I. Statistics for biologist. Ed. Cambridge, led, USA, 1977.
- 26.- Kreyszig, E. Introducción a la estadística matemática. Ed. Limusa, led. México, 1979.
- 27.- Merck Index. Merck and Co, inc, ninth edition, Rahway, New Jersey, 1976.
- 28.- Hansch, G. M. et al. Effect of aspirin in the complement system "in vitro", Int Arch Allergy appl Immunol., 61; 2: 150-58 (1980).
- 29.- Vøightander, B., et al, Effect of aspirin in the complement system "in vivo", Int Arch Allergy Appl Immunol., 61; 2: 145-48 (1970).
- 30.- Hansch, G. M. et al, Effect of salicylates on the complement system: generation of mediators "in vivo" e "in vitro". Clin Immunol Immunopatol., 21; 2: 228-36 (1981).

ANEXO.**Preparación de una solución de albúmina de huevo al 1%.**

Volumen requerido: 5 ml.

Cantida de albúmina requerida: 50 mg.

Disolver los 50 mg de albúmina en los 5 ml de agua-esteril libre de pirógenos y mantener en refrigeración.

Reconstitución de la vacuna de BCG.

Reconstituir la ampollita con 5 ml de agua esteril-libre de pirógenos, homogenizarla adecuadamente y preparar antes de utilizarla.

Preparación de la suspensión de ácido acetilsalicílico.

La suspensión se preparó para llevar el 15% de la LD_{50} en un volumen de 0.5 ml de aceite puro de cártamo para una rata de 200 g de peso. La cantidad de suspensión que se administra a las ratas varía en relación al peso de éstas con el fin de administrar el 15% de la LD_{50} durante los 30 días.

$LD_{50} = 1.75 \text{ g/kg} .$

$$\begin{array}{r}
 1.75 \text{ g/Kg} \text{ ----- } 100\% \\
 X \text{ ----- } 15\% \\
 X = 0.2625 \text{ g/Kg} .
 \end{array}$$

$$\begin{array}{r}
 0.2625 \text{ g/KG} \text{ ----- } 1 \text{ Kg.} \\
 X \text{ ----- } 0.2 \text{ Kg.} \\
 X = 0.0525 \text{ g} .
 \end{array}$$

$$0.0525 \text{ g} \text{ ----- } 0.5 \text{ ml.}$$

Se necesita preparar un stock de la suspensión para administrar a 24 ratas durante 7 días, por lo tanto:

$$\begin{array}{r}
 0.0525 \text{ g} \text{ ----- } 0.5 \text{ ml} \text{ ----- } 1 \text{ dosis} \\
 X \text{ ----- } X \text{ ----- } 24 \text{ dosis}
 \end{array}$$

$$X = 1.26 \text{ g} \qquad X = 12 \text{ ml.} \qquad 1 \text{ día}$$

Por siete días tenemos que:

$$X = 8.82 \text{ g} \qquad X = 84 \text{ ml}$$

Suspender homogéneamente los 8.82 g de ácido acetil salicílico en los 84 ml de aceite puro de cártamo, evi-
tando la formación de grumos. Agitar la suspensión para-
homogenizar adecuadamente antes de cada administración a
los animales de experimentación.

Preparación de la solución de Drabkin.

Pesar: Bicarbonato sódico (CO_3HNa) ----- 1 gr.
 Cianuro potásico (CNK) ----- 0.05gr.
 Ferricianuro potásico ($\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$) - 0.20gr.

Mezclar y aforar con agua destilada hasta un volumen de 1000 ml. Conservar la solución en frasco ambar a temperatura ambiente (20).

Preparación de la Solución de Turk.

Mezclar: Acido acético glacial 3.0 ml.
 Agua destilada 97.0 ml.
 Adicionar una o dos gotas de azul de metileno al 1% y conservar el frasco ambar a temperatura ambiente (20).

Preparación de la solución de citrato de sodio al 5%.

Pesar 5 gr. de citrato de sodio y disolver en 100 ml. de agua destilada. Mantener en refrigeración (20).

Preparación del Colorante de Wright.

La solución se prepara disolviendo 0.1 gr. del colorante (polvo) en 60 ml. de alcohol metílico absoluto químicamente puro. Dejar reposar la solución uno o dos días, y filtrar antes de usar o tomar muestras de ella.

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.4

Disolver en un litro de agua destilada 6.63 gr. de fosfato potásico primario (monobásico) ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) anhidro y 2.56 gr. de fosfato sódico secundario (dibásico) (PO_4HNa_2) ajustar al pH 6.4.