



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"DETERMINACION DE UN POSIBLE FACTOR REUMATOIDE
EN SUERO DE CANINOS MEDIANTE LA PRUEBA DE
ROSE-WAALER".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CLAUDIA ESTELA ARRIAGA BELLO

ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ

COASESOR: M.V.Z. MARIA DE LOURDES JARA RAMIREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinación de un posible Factor Reumatoide en suero de Caninos mediante la prueba de Rose-Waaler".

que presenta la pasante: Claudia Estela Arriaga Bello
 con número de cuenta: 8806422-6 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Abril de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Jorge Luis Rico Pérez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. Guillermo Valdivia Anda</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.C. Ignacio Rangel Rodríguez</u>	

Agradecimientos:

A Dios: que a pesar de no merecer tantas cosas me ha dado todo y de más en charola de plata tanto espiritual como materialmente.

A mis padres: Estelita y Charly por brindarme su enorme apoyo y confianza en todas las cosas que emprendo en la vida.

A Eddie: por aceptarme tal como soy, porque siempre has estado conmigo a pesar de la distancia que nos separa, y por tu valioso apoyo.

Al Dr. H. Alejandro Martínez R. por su apoyo y paciencia incondicional para la realización y culminación del presente trabajo.

A mi H. Jurado: por su disposición y orientación en la culminación de este trabajo.

A la M.V.Z. Lourdes Jara: por su cooperación y paciencia.

Dedicatoria:

A todos los seres que forman parte del grande y fantástico Reino Animal y que han sido de gran inspiración para superarme, gracias a ellos he podido disfrutar de las cosas maravillosas que tiene la vida y existen en el mundo.

INDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
II. Factor Reumatoide (FR).....	4
III. Objetivos.....	12
IV. Justificación.....	13
V. Material y Métodos.....	14
1. Obtención de sueros caninos.....	14
2. Obtención, lavado y sensibilización de eritrocitos de borrego.....	16
3. Prueba de hemoaglutinación.....	16
VI. Resultados.....	18
VII. Discusión.....	21
VIII. Conclusiones.....	27
IX. Recomendaciones.....	28
X. Bibliografía.....	29
XI. Apéndice.....	33
1. Precipitación de gammaglobulinas.....	33
2. Tubo de diálisis.....	33
3. Determinación de proteína.....	34

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Posible esquema inmunopatogénico de factor reumatoide.....	11
--	----

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Títulos de Factor Reumatoide.....	19
Cuadro 2. Titulaciones negativas a Factor Reumatoide.....	19
Cuadro 3. Titulaciones sospechosas de Factor Reumatoide.....	19
Cuadro 4. Titulaciones positivas a Factor Reumatoide	19
Cuadro 5. Frecuencia estadística.....	20
Cuadro 6. Prueba T de una muestra.....	20

RESUMEN

Con el fin de identificar un posible factor reumatoide en perros aplicando la técnica de Rose-Waaler, se obtuvieron 100 sueros de caninos clínicamente sanos de antirrábicos (Naucalpan y Atizapán) y clínicas privadas.

Por otra parte se obtuvieron 500 ml. de suero de 6 perros clínicamente sanos para obtener gammaglobulinas caninas con la ayuda de sulfato de amonio y por medio de la membrana de diálisis.

Se sensibilizaron eritrocitos de un ovino suffolk mezclando a partes iguales: eritrocitos al 2% y gammaglobulinas caninas. Y se procedió a correr las pruebas de hemoaglutinación utilizando microplacas de fondo en U empleando los 100 sueros problemas, haciendo diluciones de 1:2 a 1:256.

Obteniéndose titulaciones de 1:2 (n=28), 1:4 (n=9) y sin reacción (n=39) como negativas, 1:8 (n=11) como sospechosas y de 1:16 (n=1), 1:32 (n=8), 1:64 (n=2), 1:128 (n=2) y 1:256 (n=0) en adelante como positivas.

En el presente estudio se reportó una titulación positiva de el 9.09% en los perros de clínica y de 14.92% en los perros de antirrábico.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los registros fósiles, la relación humano-perro es una de las más antiguas, remontándose a 14 mil años a la era de Piedra o Periodo Paleolítico. Por lo tanto el hombre y el perro fueron compañeros alrededor de 4 mil años, antes de que el género humano hubiese desarrollado la agricultura.

Algunos expertos especulan que los primeros perros fueron compañeros de caza ayudando a los humanos a seguir pistas y obtener comida. Otros presentaron un escenario menos llamativo, postulando que los mismos perros eran guardados como un recurso de comida o alimento para cuando la caza escaseaba. Alguna combinación de las dos teorías es probablemente la más cercana a la realidad. (Beale y Adderly, 1998).

Mientras que éste misterio permanece sin resolver, debemos saber que la unión humano-perros es particularmente muy fuerte. El humano ha venerado e idolatrado a los gatos, así también les ha temido y aún exterminado; los caballos han sido premiados, exhibidos y comercializados por siglos. Pero cuando se trata de compañerismo, los perros y los humanos tienen una afinidad natural el uno al otro considerando las similitudes entre las dos especies, cosa que no nos sorprende. Después de todo ambos, humanos y perros son sociables, viviendo en jaurías ó grupos donde uno de sus miembros se considera el líder; y al mismo tiempo ambos pueden ser protectores y territoriales. (Beale y Adderly, 1998)

Los científicos en general, coinciden con que todos los perros que existen hoy en día son descendientes del lobo. Durante cientos de años, el hombre ha seleccionado diferentes razas de perros para vivir con ellos, de acuerdo a las necesidades que el hombre requiera. Así por ejemplo, una comunidad podría preferir a perros grandes que fuesen capaces de jalar o llevar carga. Otro grupo podría escoger como

compañeros solo perros que ladren cuando algún extraño se aproxime, ó aquellos que fueran particularmente finos y/o veloces cazadores.(Beale y Adderly, 1998)

En adición existen muchas similitudes entre humanos y perros cuando se trata de sistema cardiovascular, nervioso, endocrino, urinario, reproductivo y respiratorio. Las diferencias primarias entre humanos y sus mejores amigos se basa en las áreas de sistema digestivo, piel, pelo y sus sentidos especialmente el oído, olfato y vista. Los perros por ejemplo, no necesitan masticar la comida, mezclarla y ensalivarla para poder digerirla, éste proceso se realiza en su totalidad en el estómago; y a diferencia de los humanos, los perros no enfrían su cuerpo transpirando a través de su piel. En cambio el exceso de calor se regula sólo a través de los cojinetes de sus patas o de la boca y lengua durante el jadeo. (Beale y Adderly 1998).

De hecho los únicos sentidos mas desarrollados en perros son el olfato y el oído, que son 100 veces mas poderosos que el del humano (Beale y Adderly 1998).

Pero existe un padecimiento que el humano y perro tienen en común: la presencia de factores reumatoides, que producidos sistémicamente en la circulación y localmente en el fluido sinovial por diversas enfermedades, pueden ser detectados por pruebas de hemoaglutinación indirectas, tales como prueba de Rose-Waaler, prueba de látex, ELISA (que son más comúnmente utilizadas en el humano y perros), inmunodifusión y electroforesis (Beale y Adderly, 1998; Gorman y Halliwell, 1992; Farber, 1990; Robbins, 2000).

II. FACTOR REUMATOIDE (FR).

El factor reumatoide es un anticuerpo contra inmunoglobulina autóloga, y al igual que todos los anticuerpos es en sí una inmunoglobulina. Reacciona casi completamente con IgM e IgG autóloga, aunque algunos factores reumatoides también muestran reactividad con IgA, IgE o IgD contra el fragmento Fc de seres humanos y diversos animales (Bernard, 1988; Day, J.M, 1999; Farber, 1990; Nicoll y Mc.Phee, 2002; Robbins, 2002).

Los factores reumatoides (FRs) inicialmente fueron descritos en sueros de humanos por Waaler en 1939 y subsecuentemente por Rose en 1948 (Natvig, 1972; Rose y Mackay, 1985; Kahn, 1995) y desde entonces han sido extensivamente estudiados y caracterizados (Teitsson y Valdimarsson, 1984; Tuokko, 1984; Harris, 1990).

En comparación con la literatura publicada para factores reumatoides en humanos, la información es relativamente menor en la especie de interés veterinario. Los factores reumatoides han sido reportados en suero de felinos (Ungar-Waron, 1985), suero de caninos (Halliwell, 1989; Nielsen, 1992) suero de pollos (Reader y Boyle, 1991; Sugi, 1994), suero de equinos (Carter, 1995), suero de bovinos (Ungar-Waron, 1991; Graham y col, 1997) y para FR-IgM en cabras (Ungar-Waron y col, 1985).

Cuando se identificó inicialmente, se consideró que el factor reumatoide consistía exclusivamente en IgM y con la prueba de fijación de látex empleada por entonces se identificaba en el suero de aproximadamente 75% a un 80% de los pacientes de artritis reumatoide (Farber, 1990; Angel, 1993; Robbins, 2000). En la actualidad, cabe decir que uno ó más de los factores reumatoides

se presentan en el suero de más del 80% de los pacientes con artritis reumatoide (AR) (Bernard, 1988; Farber, 1990 y Robbins, 2000), pero no son exclusivos de éstos (Teitsson y Valdimarsson, 1984; Tuokko, 1984; Harris, 1990). El FR no se encuentra en algunos pacientes con esta enfermedad, está presente en otros procesos patológicos e incluso en individuos sanos, y es probable que no sea esencial en la etiología de AR (Angel, 1993; Robbins, 2000).

El desarrollo de autoanticuerpos frente a gammaglobulinas como IgG e IgM es característico de AR y son denominados factores reumatoides, siendo principalmente gammaglobulinas IgM. También pueden presentarse en otras condiciones en las que se desarrolla la formación de amplios complejos inmunitarios (Halliwell y Gorman, 1989).

Los factores reumatoides del suero, tienen una especificidad para regiones de factor de complemento (Fc) de IgG1, IgG2 e IgG4 (pero no para IgG3) (Normansell y Young, 1975) y exhiben un grado variable de reacción cruzada con IgG de otras especies. (Butler y Vaughan, 1965).

La literatura sugiere que los factores reumatoides representan anticuerpos anti-idiotipos a receptores de Fc de bacterias y virus. (Mouritsen, 1986; Oppigler, 1987; Reader y Boyle, 1991). Anteriormente, los observadores creían que los factores reumatoides reaccionaban con determinantes antigénicos únicos descubiertos o formados cuando las gammaglobulinas normales eran alteradas por factores exógenos, posiblemente una infección. De ello se originaba una especie de autoinmunidad (Bernard, 1998; Farber, 1990; Angel, 1993; Robbins, 2000).

Las inmunoglobulinas altamente purificadas son sólo débilmente inmunogénicas, particularmente en la misma especie. Las observaciones de que el suero de muchos pacientes con artritis reumatoide (AR) aglutinan eritrocitos de carnero recubiertos

con anticuerpo de conejo antieritrocitos de carnero (prueba de Rose-Waaler); conduce al hallazgo de que una fijación similar en el suero de la AR a gammaglobulina humana agregada por calor y recubierta por partículas inertes como gotas de látex o bentonita provocaba la aglutinación o floculación (respectivamente) de las últimas. Se encontró que el factor responsable del suero se encontraba en una gammaglobulina IgM, que puede ser cuantificada mediante dilución seriada del suero problema. Técnicas más refinadas como ELISA y electroforésis han descubierto otros tipos de factor reumatoide que pertenecen a las clases IgG y posiblemente a IgA, IgD o IgE. (Farber, 1990; Robbins, 2000).

Según la prueba utilizada, hasta un 80% de pacientes con artritis reumatoide son positivos para el FR. En unos pocos casos se obtienen resultados negativos o títulos bajos de FR, debido a que las IgG circulantes inhiben la actividad del factor reumatoide. En raras ocasiones éste puede no ser detectable en suero, pero sí en el líquido sinovial, aunque ambos son utilizados para detección de FR. (Farber y Rubin, 1990; Robbins, 2000).

Los FRs pueden encontrarse en cualquier clase de inmunoglobulina; la mayoría de los métodos clínicos reflejan la cantidad de FR IgM debido a la mayor eficacia de las moléculas pentavalentes de IgM en las reacciones de aglutinación. El FR de los isotipos IgG, IgA e IgE son más difíciles de analizar y aún no se sabe con seguridad cuál es su significado diagnóstico (Bernard, 1988).

Waaler y Rose encontraron que el suero de un gran número de pacientes con AR aglutinaba eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpo (Ac) de conejo. Sin embargo ahora se sabe que Ac anti-IgG se pueden encontrar en pacientes con una variedad de padecimientos o condiciones. El término factor reumatoide se continúa usando para este tipo de autoanticuerpos (Natvig y col, 1972; Rose y Mackay, 1985).

El FR no contribuye a la patogenia de AR porque es negativo en alrededor del 20% de los pacientes con esta enfermedad, pero puede intervenir en la reacción de tipo Arthus que se produce en los vasos sanguíneos (vasculitis aguda) y en la aparición de los nódulos reumatoides subcutáneos y de otras lesiones extra-articulares (Nicoll y Mc. Phee, 2002; Robbins, 2000).

Como en el humano, los perros con AR también tienen características inmunopatológicas en común (Carter y cols, 1989). Dicha enfermedad denominada también reumatismo, es una inflamación de la articulación, que se puede presentar en forma aguda o crónica, teniendo como causas predisponentes las de tipo físico (traumatismos,), químicos (alteraciones en el metabolismo y depósito de hierro y colágena), nutricionales (alteraciones o deficiencia de calcio, fósforo o selenio), biológicas (infecciosas por virus o bacterias) o por complejos inmunes (Agraz, 1989; Ungar, 1991 y Schewen, 1993). Estas características clínicas contribuyen a diferenciar las artritis bacterianas de las de origen inmunitario que suelen aparecer como poliartritis (más de 5 articulaciones), afectando predominantemente articulaciones distales en razas caninas (Kirk,1997)

En 1967 Lewis y Hathaway fueron los primeros en describir la enfermedad, después notaron sus efectos en un Cocker Spaniel. Aunque parecía difícil y no muy común de reconocer, la AR en caninos fue identificada por Liuen en 1969; por Sikes en 1970; por Lewis y Borel en 1971; por Halliwell y Rudy en 1972; por Newton en 1974; por Alexander en 1976; por Scott en 1980; y por Gorman y Werner 1986 (Klareskog, 1986).

La prueba de Rose-Waaler detecta mejor el FR IgM, y éste puede estar presente en niveles muy bajos en el suero y ser secuestrado por complejos inmunitarios circulantes. Un título de aglutinación de 1:16 o más se considera positivo; de 1:8

sospechoso y de 1:2 a 1:4 negativo o no significativo (Ettinger, 1983; Kirk, 1989; Thoren-tolling, 1992).

Cabe destacar que si bien los pacientes con artritis reumatoide, pueden ser seronegativos, la presencia de títulos altos de factor reumatoide con frecuencia se asocia con enfermedad severa y que no remite, con numerosas complicaciones sistémicas y con un pronóstico grave (Farber y Rubin, 1990).

Los factores reumatoides pueden asociarse con la aparición de complicaciones sistémicas, como vasculitis necrosante. Además es posible detectar complejos inmunes en líquido sinovial (Farber y Rubin, 1990).

Es posible hallar títulos significativos de FR en pacientes con enfermedades relacionadas, como el lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica progresiva, dermatomiositis, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis reumatoide juvenil, poliarteritis nodosa, síndrome de Sjogren, y en gran variedad de trastornos no reumáticos, incluyendo fibrosis intersticial pulmonar, cirrosis, sarcoidosis, macroglobulinemia de Waldenstrom, tuberculosis, Kala-azar, leishmaniasis, lepra lepromatosa, hepatitis viral, cáncer, diabetes mellitus, endocarditis, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerodermia, esplenomegalia, esquistosomiasis, frambesía, hipertensión, infecciones virales, linfomas, mononucleosis infecciosa, neoplasias hepáticas, neuropatía, paludismo, sífilis, transfusiones múltiples, y vasculitis (Barret, 1988; Chernecky, 1997; Farber y Rubin, 1990; Nicoll y Mc. Phee, 2002).

Las pruebas pueden ser positivas en pacientes recién vacunados contra la viruela y en aquellos que han recibido aloinjertos (piel y riñón), o aquellos que tienen endocarditis bacteriana subaguda (Farber y Rubin, 1990).

La importancia del FR en la circulación y en el fluido sinovial en la patogénesis de AR no puede ser minimizado. Ambos producidos local y sistemáticamente, desencadenan el comienzo de la enfermedad formando un complejo con IgG, IgM o de subclase de IgG principalmente. Esto puede tener un efecto significativo en la patogénesis de la enfermedad (ver fig 1).

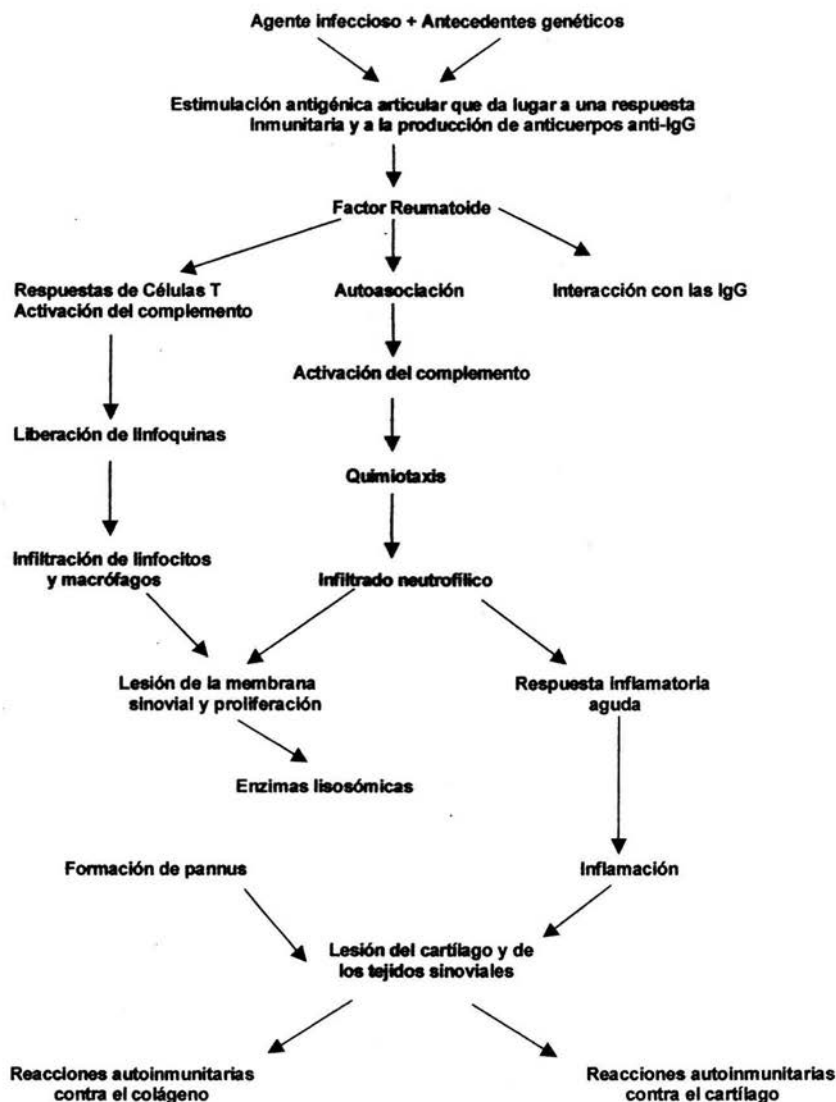
La subclase IgG tiende a formar pequeños complejos inmunes, éstos se depositan rápidamente en la sinovia, son prevalentes y activadores del complemento. De este modo los complejos FR-IgG puede perpetuar la respuesta inmune humoral local y aumentar el tejido dañado. En cambio, los complejos inmunes compuestos de la subclase de IgM de FR, son más largos, comparado con la IgG FR considerándose que los complejos IgM-FR son menos patogénicos (Gorman y Halliwell, 1992).

El punto final de ésta activación es la llegada de los neutrófilos en respuesta al C5a (fragmento). Luego los granulocitos ingieren los complejos inmunes y liberan las enzimas lisosómicas que inducen daño del cartílago. Las células de éste, pueden ser el foco de una respuesta inmune adicional a la posible exposición de los antígenos ocultos sobre las mismas (Ettinger, 1983; Gorman y Halliwell, 1992 y Tizard, 1996).

El carácter erosivo y destructivo que se da en la articulación, puede enunciar un conjunto complejo de fenómenos. La activación del sistema del complemento originaría componentes vasoactivos, quimiotácticos y líticos, dañando las células de la sinovia. Es probable que la fracción quimiotáctica atraiga leucocitos, que fagociten los complejos inmunitarios. La liberación de enzimas lisosómicas de neutrófilos y macrófagos produciría la lesión tisular. En el líquido sinovial de las articulaciones atacadas se han descubierto colagenasas al igual que proteasas ácidas y neutras. Incluso en explantes cultivados de sinovia reumatoide, se ha comprobado que estas

enzimas tienen la facultad de degradar proteoglucanos y colágena. Por atractivo que sea este escenario, quedan incógnitas (Day, 1999; Farber y Rubin, 1990; Robbins, 2000).

Fig. 1 . Posible esquema inmunopatogénico de factor reumatoide implicado en la artritis reumatoide.



(Tizard, 1996; Gorman y Halliwell, 1992).

III. OBJETIVOS.

- a) Detectar un anticuerpo anti-gamaglobulina canina (factor reumatoide) en suero sanguíneo de perros clínicamente sanos.

- b) Desarrollar y aplicar una metodología que permita detectar la presencia del factor reumatoide en perros.

IV. JUSTIFICACIÓN

En México, no existe una forma de identificar el FR en perros sanos ó con algún padecimiento como artritis, como existe en la mayoría de los países desarrollados. Actualmente las pequeñas especies han presentado un desarrollo importante en el cuidado y prevención de enfermedades. Así mismo, la especialización del MVZ requiere un conocimiento mayor de la forma de prevenir y controlar los diferentes padecimientos que presenta ésta especie y México no está exento de esto.

Es importante resaltar la importancia de la detección de este factor reumatoide, que puede tener diversas etiologías y como en la práctica no se diagnostica, parecería que no existe, sin embargo todos los caninos pueden llegar a presentar titulaciones positivas que nos puedan alertar sobre algún padecimiento, y así poder prevenir alguna enfermedad y mejorar el bienestar de esta especie y su calidad de vida.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Obtención de sueros caninos.

Se tomaron 100 muestras de sangre de caninos clínicamente sanos (3 ml cada una) de 61 machos y 39 hembras de diferentes edades, peso y raza, provenientes de clínicas privadas y antirrábicos de Naucalpan y Atizapán. Se utilizaron jeringas estériles desechables con agujas de 22x32mm. De cada muestra se obtuvo el suero por centrifugación a 3500rpm/10 minutos, cada suero se colocó en viales conservándose en congelación a -20°C , con el fin de evaluar un posible factor reumatoide mediante la prueba de hemoaglutinación de Rose-Waaler. Al mismo tiempo se obtuvieron 500 ml de sangre de 6 caninos utilizando jeringas estériles desechables con aguja de 22x32mm, y se obtuvo el suero por medio de centrifugación a 3500 rpm/10 minutos con el fin de precipitar o concentrar gammaglobulinas caninas usando la técnica de sulfato de amonio (Morilla, 1986), de la siguiente manera:

1. De los 500ml. de sangre, se obtuvieron 30ml. de suero, que se colocaron en un vaso de precipitados en baño de hielo y agitación constante, se agregaron 15 ml de una solución saturada de sulfato de amonio en el espacio de 15 minutos.
2. Se dejó en agitación constante a 4°C , durante 24 h.
3. Se centrifugó a 3000 rpm/10 minutos a 4°C .
4. Se decantó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 15 ml de agua destilada.
5. Se repitió el paso 1 con el precipitado.
6. Se centrifugó a 3000rpm/10min a 4°C .
7. Se decantó el sobrenadante y disolvió el precipitado en 10ml de agua destilada
8. Se transfirió el precipitado a un tubo de diálisis.

9. Se dializó en una solución de NaCl al 0.85% en refrigeración a 4°C, cambiando la solución salina frecuentemente (por lo menos se hicieron 3 cambios, uno cada 12 horas)
10. Se determinó si el dializado contenía sulfato de amonio cada 2 o 3 h, después de un cambio de solución salina. Basándonos en los siguientes puntos:
 - a) a una pequeña cantidad del dializado se le añadió un volumen igual de Cloruro de Bario saturado.
 - b) Si aparecía un precipitado, continuaba la diálisis.
 - c) Si no aparecía un precipitado, las globulinas eran satisfactorias para la determinación de proteína.
11. Se retiraron las globulinas del tubo de diálisis y se centrifugaron a 7000rpm/15 minutos a 4°C y se desechó el sedimento.
12. Después al precipitado se le agregó ázida de sodio al 0.2%. Se guardó en refrigeración.
13. Después se determinó la concentración de proteínas haciendo una curva a partir de albúmina bovina, y determinando su correlación, intercepto, y pendiente con la fórmula : $y = mx + b$ (ver apéndice).

2. Obtención, lavado y sensibilización de eritrocitos de borrego.

Se procedió a realizar las pruebas de hemoaglutinación; para esto se necesitó de eritrocitos sensibilizados (adsorbidos). Para la sensibilización de glóbulos rojos se uso una jeringa de 10ml , con 5 ml de solución de Alsever's (como anticoagulante) , y en la misma jeringa se obtuvieron 5 ml de glóbulos rojos de camero Suffolk y se homogenizó suavemente; se colocó la mezcla en tubos para centrifuga, 5ml en cada uno, se centrifugó a 2500 rpm/10 min, se retiró el sobrenadante y se agregaron 3ml de solución salina amortiguadora estéril (PBS), se volvió a centrifugar y se retiró el sobrenadante agregando nuevamente 3 ml de PBS y repitiendo 3 veces más y en la última centrifugación se retiró el sobrenadante y ya no se agregó PBS. A 98 ml de PBS se agregaron 2ml de eritrocitos. Por otra parte se colocaron gammaglobulinas de canino en PBS a una relación de 1:8 (7.5ml de PBS + 0.5 ml de gammaglobulinas) . Para sensibilizar los eritrocitos, se mezclaron a partes iguales V/V : eritrocitos al 2% y gammaglobulinas caninas, incubándose en la estufa bacteriológica a 37°C por 15 minutos.

Una vez sensibilizados los glóbulos rojos se corrieron las pruebas de hemoaglutinación empleando 100 sueros problema de caninos clínicamente sanos provenientes de clínicas privadas, y antirrábicos (Naucalpan y Atizapán).

3. Pruebas de hemoaglutinación

Para estas pruebas se utilizaron microplacas de fondo en U que se limpiaron con alcohol al 70%. Se descomplementaron los sueros en baño María a 56°C durante 30 minutos y a cada pozo de las microplacas de fondo en U se le colocaron 50µl de PBS con una micropipeta, y solo al primer pozo se le agregaron 50µl de suero problema, a partir de aquí se hicieron diluciones hasta completar los 7 pozos restantes (1:2 a 1:256) , se agregaron 50 µl de eritrocitos sensibilizados con

gammaglobulinas caninas, a cada pozo. Realizando este procedimiento con las 100 muestras. Aparte se prepararon 2 pozos controles: uno con glóbulos rojos sensibilizados de ovino y PBS y otro con glóbulos rojos sin sensibilizar y PBS, se dejaron incubar en estufa bacteriológica durante 1:30 hr. y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 2 horas.

Después se procedió a leer las microplacas, considerándose las titulaciones de 1:2 a 1:4 como negativas, de 1:8 sospechosos y de 1:16 ó más como positivas (Kirk, 1989).

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron 100 muestras de sueros caninos clínicamente sanos provenientes de 3 clínicas privadas y 2 antirrábicos (Naucalpan y Atizapán). De los cuales 61 sueros reaccionaron a la prueba de hemoaglutinación, con títulos que varían de 1:2 - 1:256, y 39 sueros no tuvieron reacción a la prueba de hemoaglutinación. (ver cuadro 1)

De las 61 muestras, 37 obtuvieron titulaciones de 1:2 y de 1:4 considerándose como negativas, (ver cuadro 2); 11 muestras presentaron títulos de 1:8 considerándose como sospechosas (ver cuadro 3) y finalmente 13 sueros presentaron títulos de 1:16 ó más considerándose como positivos (ver cuadro 4). Las muestras que no tuvieron reacción a la prueba se consideraron negativas (ver cuadro 2) (Ettinger, 1983; Kirk, 1989; Thoren-Tolling, 1992).

Es importante saber que un resultado positivo se basa en la demostración de aglutinación de las partículas de látex ó glóbulos rojos de ovino cubiertos con antigammaglobulinas. Así mismo el suero del perro sano puede contener ciertas cantidades de anticuerpos reactivos contra la inmunoglobulina empleada para cubrir los glóbulos rojos o partículas de látex, por ello son de interés los títulos que deben alcanzar para que una prueba sea significativa (Ettinger, 1983).

(Cuadro 1)

TITULOS DE FACTOR REUMATOIDE

	SIN TITULO	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	TOTAL
Perros de clínicas privadas	11	11	3	4	0	3	0	0	0	33
Perros de antirrábicos	28	16	6	7	1	5	2	2	0	67

(Cuadro 2)

TITULACIONES NEGATIVAS A FACTOR REUMATOIDE

	SIN TITULO	1:2	1:4	TOTAL
Clínicas privadas	11	12	3	26
Antirrábicos	28	16	6	50
TOTAL	39	28	9	76

(Cuadro 3)

TÍTULOS SOSPECHOSOS A FACTOR REUMATOIDE

	1:8
Clínicas privadas	4
Antirrábicos	7
TOTAL	11

(Cuadro 4)

TITULACIONES POSITIVAS A FACTOR REUMATOIDE

	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	TOTAL
Clínicas privadas	0	3	0	0	0	3
Antirrábicos	1	5	2	2	0	10
TOTAL	1	8	2	2	0	13

Utilizando el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) y comparando las medias con una prueba T (de una muestra) con una significancia de 95%, no se encontró diferencia al FR entre los sueros obtenidos de perros clínicamente sanos provenientes de clínicas y antirrábicos (Ver cuadro 5 y 6).

Al análisis de la estadística descriptiva de frecuencia se encontró lo siguiente en las pruebas evaluadas de perros de clínicas y antirrábicos.

(Cuadro 5)

Frecuencia estadística.

		Clínica	Antirrábico
N	Valor	22	39
	Faltante	17	0
Media		1.5455	1.6923
Error de Media		.17065	.13821
Mediana		1.0000	1.0000
Moda		1.00	1.00
Desviación Std.		.80043	.86310
Varianza		.641	.745
Rango		2.00	2.00

(Cuadro 6)

Prueba T de una muestra.

Sig= 95					
	Prueba	Grado de libertad	Diferencia de Medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
				Inferior	Superior
Clínica	-547.630	21	-93.45455	-93.8094	-93.0997
Antirrábicos	-675.133	38	-93.30769	-93.5875	-93.0279

VII. DISCUSIÓN.

La principal razón para buscar el Factor Reumatoide es la sospecha de artritis reumatoide (AR). Desde éste punto de vista, la determinación de los FR debería considerarse únicamente a la luz del cuadro clínico, la evidencia de una reacción inflamatoria , radiología apropiada de las articulaciones y examen del aspecto del líquido articular, recuento celular, cristales, coágulo de mucina, niveles proteícos, niveles del complemento y cultivo cuando sea adecuado (Bernard, 1988), aunque se puede observar la presencia de factor reumatoide en suero de pacientes sin AR (Halliwell, 1992;Tizard, 1996).

En el presente estudio se buscó el factor reumatoide (antigammaglobulinas caninas en el suero de perros clínicamente sanos. Bernardina y colaboradores (1988), mencionan que detectar el factor reumatoide en suero de caninos sanos es útil para evaluar en forma rutinaria la presencia de éste, como lo realizado en el presente caso.

En medicina veterinaria, la detección de FR se ha basado en los métodos clásicos usando aglutinación de partículas sensibilizadas con eritrocitos de ovino (Prueba de Rose-Waaler) y partículas de látex (aglutinación en látex). No obstante la intensidad de la reacción es baja en perros comparada con la encontrada en humanos (Newton; 1976; Werner, 1884; Halliwell; 1989).

Existen otras técnicas como la prueba de ELISA, sin embargo la técnica de Rose-Waaler modificada es considerada de utilidad para estudios clínicos en las pequeñas especies como se realizó en éste estudio, ya que el evaluar posibles candidatos a padecer artritis reumatoide, permite prever esta manifestación, con la idea de poder controlarla (Chabanne y col, 1993; Harris, 1990; Halliwell,1992).

Los estudios serológicos son bastante polémicos. Ya que el FR en el perro está en forma inconsistente y cuando está presente, los títulos son mucho más bajos que en la especie humana (Gorman y Halliwell, 1992).

En el comercio mexicano no existe una prueba que permita detectar el FR canino ó felino, ni tampoco se conoce la epidemiología de éste padecimiento. Sin embargo utilizar la prueba de Rose-Waaler, permite tener una idea de cómo se está presentando en un grupo de animales en una determinada zona y época. Esta prueba se realiza empleando anticuerpos de conejo (o perro) dirigidos contra eritrocitos de oveja. Inactivando el complemento mediante calentamiento, a 56°C durante 30 minutos, adsorbiéndose con los eritrocitos de oveja para eliminar cualquier anticuerpo antieritrocitario natural, se incuban eritrocitos de oveja con un título subaglutinante de suero de conejo (o perro), antieritrocitos de oveja y a continuación se adicionan a las diluciones de los sueros problema.(Kirk,1989; Halliwell,1992). En este estudio no se eliminaron los anticuerpos antieritrocitarios naturales, ya que las diluciones realizadas permiten eliminar la mayoría de autoaglutinaciones.

El FR no solo se limita a artritis reumatoide, ya que se han descubierto en gran diversidad de trastornos inflamatorios e infecciosos crónicos en un 5% a 10% de la población normal en humanos. Los sujetos jóvenes con artritis reumatoide juvenil, enfermedad íntimamente relacionada a la AR, no presentan factor reumatoide. Sin embargo, se hallan de ordinario en cantidades significativas en cierto número de otras enfermedades caracterizadas a menudo por hipergammaglobulinemia, así como en un porcentaje apreciable en individuos de edad avanzada asintomáticos (Bernard, 1988; Farber y col, 1990).

Los títulos 1:2 a 1:4, no se consideraron significativos y los títulos de 1:8 se consideran dudosos. Así mismo en el presente estudio se hicieron diluciones de 1:2 a 1:256, como lo mencionan Ettinger, 1983; Kirk, 1989; Harris, 1990; Thoren-tolling, 1992 (ver cuadro 2 y 3).

El título de FR considerado como positivo en caninos por la técnica de Rose-Waaler es a partir de 1:16 ó mas y está presente en el 70% de los animales con AR, pero los niveles fluctúan enormemente, generalmente decaen cuando el curso de la enfermedad avanza y no parecen guardar relación con la actividad de la enfermedad; se han encontrado cerca del 6% en suero de perros normales (Halliwell, 1992; Kirk, 1989; Ettinger, 1983; Thoren-tolling, 1992).

Muchos perros con artritis reumatoide son negativos al factor reumatoide, así como hay perros sanos positivos a factor reumatoide (Angel, 1993; Robbins, 2000).

El presente estudio reporta una titulación positiva de el 9.09% en los perros de clínica y de 14.92% en perros de antirrábicos. Si consideramos que son perros sanos el porcentaje es mayor a lo reportado por Halliwell, 1992; Kirk, 1989; Ettinger, 1983; y Thoren-tolling, 1992.

Existe la posibilidad que las aglutinaciones pudieran haberse dado con anticuerpos naturales, sin embargo no parece ser así, ya que no todos presentaron éste fenómeno autoaglutinante a la lectura. Las posibles autoaglutinaciones se eliminaron por las diluciones de las pruebas, ya que un individuo con altas titulaciones de reacción antígeno-anticuerpo pudiera reflejar un problema clínico de tipo autoinmune.

Se desconoce la sensibilidad y especificidad de ésta prueba porque no existe una prueba de oro para tenerla de referencia y poder determinar los resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos.

Aunque los factores reumatoides son de importancia diagnóstica, su significado clínico no está claro; pueden encontrarse en líquido de articulaciones, donde su título tiende a correlacionarse con la gravedad de las lesiones de artritis, mismas que pueden exacerbarse mediante la inoculación intra-articular de inmunoglobulinas autólogas. No obstante, algunos individuos con artritis reumatoide podrían no tener factores reumatoides detectables, y no es raro encontrar otros que no padecen artritis a pesar de la presencia de factor reumatoide en su suero como en este estudio (Halliwell, 1992; Tizard, 1996).

La prueba de Rose-Waaler detecta mejor el factor reumatoide IgM. El factor reumatoide puede estar presente en niveles muy bajos en el suero y ser secuestrado por complejos inmunitarios circulantes. (Kirk, 1989). En gran parte, el FR canino es IgG más que IgM. La relativa ineficacia de esta clase de anticuerpos en las reacciones de aglutinación explica en parte los bajos títulos que FR que se encuentran en caninos con artritis. (Halliwell, 1992).

Posiblemente en este estudio como se trabajó con perros clínicamente sanos pudo haber predominado IgM. El FR puede ser cualquier isotipo de inmunoglobulina; ya sea IgM, IgG, e IgA. (Bernard, 1988), pero en el presente estudio no se evaluaron cada uno de éstos, sin embargo sería interesante evaluarlos en un futuro.

El FR puede ser útil en la diferenciación en artritis reumatoide y otras artritis inflamatorias crónicas. Sin embargo, una prueba positiva de FR es sólo uno entre varios criterios necesarios para hacer el diagnóstico de artritis reumatoide. Pueden encontrarse títulos bajos de FR en pacientes sanos de edad avanzada en un 20%; y de 1 a 4% en individuos normales y en diversas respuestas inmunitarias agudas como enfermedades virales (p.e. mononucleosis infecciosa y hepatitis viral entre

otras), infecciones bacterianas crónicas (tuberculosis, lepra, endocarditis infecciosa subaguda) y hepatitis activa crónica entre otras (Nicoll y Mc. Phee, 2002).

Los sueros caninos con FR están frecuentemente asociados a complejos, lo que efectivamente disminuye el título detectable, y posiblemente pudieran ser los de bajo título en este estudio. (Halliwell, 1992).

No han sido reportadas diferencias significativas entre las técnicas de aglutinación de Rose-Waaler y de látex para medir factor reumatoide en suero de humanos (McKendry y col, 1982; Bampton y col, 1985). Además éstas técnicas tienen buena aceptación en otras especies de interés veterinario.

La prueba de Rose-Waaler utiliza anticuerpos caninos los cuales se unen a la superficie de eritrocitos de borrego. Para las pruebas de ELISA y aglutinación en látex, la inmunoglobulina correspondiente es unida por fuerzas electrostáticas a una fase sólida para aumentar la unión de los factores reumatoides. Esto fue sugerido por Wood y col en 1980 para explicar la baja frecuencia de reacciones de aglutinación positiva en la prueba de Rose-Waaler (Thoren-Tolling, 1989). Aunque dichas técnicas presentan ciertas ventajas, requieren de equipo sofisticado, no así la prueba de Rose-Waaler.

Aunque hay una variación significativa en las pruebas utilizadas, los títulos altos de animales seropositivos son considerados en el diagnóstico de la enfermedad (Feldman, 1996). Es importante insistir en que un individuo con un título negativo, puede ser positivo en estudios posteriores aún siendo clínicamente sano.(Halliwell, 1992).

El sexo no parece tener influencia en la presencia de FR, para evaluar este punto se requeriría de más número de pruebas, ya que no se han realizado estudios en caninos, sin embargo en los humanos, alrededor del 1% de la población mundial

padece artritis reumatoide, afecta tres veces más a las mujeres que a los varones, y la prevalencia es máxima en los decenios tercero y cuarto de vida (Robbins y col, 2000).

Es importante destacar que los estudios en la especie humana han mostrado también que la utilización de las IgG de conejo en pruebas con partículas de látex pueden mostrar una especificidad mayor que las IgG humanas y han demostrado también que la prueba de Rose-Waaler es todavía considerada por algunos como la referencia con que se deben juzgar otras pruebas (Halliwell, 1992; Tizard, 1996).

VIII. CONCLUSIONES.

- I. La metodología que se utilizó mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta en placa por la técnica de Rose-Waaler permite detectar la presencia de un posible FR en caninos.

- II. De los 100 sueros caninos evaluados en este trabajo, 13 obtuvieron titulaciones que van de 1:16-1:128, resultando como positivos a la prueba de Rose-Waaler.

IX. RECOMENDACIONES

Sería de gran aporte tener en cuenta las siguientes propuestas con el fin de tener una idea más clara de la importancia del factor reumatoide en pequeñas especies tanto en perros como en gatos, en futuras investigaciones:

- Realizar una evaluación de factor reumatoide en perros y gatos mayores de 8 años de edad, sensibilizando eritrocitos o partículas de látex con IgG y/o IgM, con el fin de conocer que isotipo es el más frecuente.
- Evaluar animales con problemas artríticos.
- Evaluar el factor reumatoide en animales adultos de talla grande.
- Evaluar el factor reumatoide en perros galgos

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Angel, G., 1993. Interpretación clínica del laboratorio. Bogotá, Colombia.
2. Barret, J. T. 1988. Text book of Immunology. An introduction to Immunochemistry and immunobiology. 5a. Ed. The C.V: Mosby Company.
3. Beale, B., Adderly, B., 1998. The Arthritis Cure for Pets. *How to halt, reverse and even cure your pet's osteoarthritis. N.Y. USA.*
4. Beardina, W.E., Vankol, P.J. y Willhemese, A., 1988. Antibodies to Ig in dog sera, synovial fluids and aquos humor; a comparative study of Rheumatoid Factor of cells coated with animal gammaglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116: 588-593.*
5. Butler, V.P., Vaughan, J.H., 1965. The reaction of rheumatoid factor with animal gamma-globulins: quantitative considerations. *Immunology 8: 144-147.*
6. Carter, S.D., Bell, S.C., Bari, A.S.M., Bennet, D., 1989. Immune complexes and rheumatoid factors in canine arthritides. *Ann. Rheum. Dis. 48: 986-991.*
7. Codner, C.E., 1997. Poliartritis infecciosa en perros y gatos. *Terapéutica Veterinaria de Pequeñas Especies XI: 273-280.*
8. Chabanne, L., Fournel, C., Faure, J.R., Veyseyre, C.M., Rigal, D., Bringuier, J.P y Monier, J.C., 1993. IgM and IgA rheumatoid factors in canine polyarthritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 39: 365-379.*

9. Chernecky, C.C., Berger, B.J., 1997. Pruebas de Laboratorio y Procedimientos Diagnósticos. Mc. Graw-Hill. Interamericana.
10. Day, J.M., 1999. Atlas en color de enfermedades inmunomediadas del perro y gato. Cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento. Grass. Ediciones, Madrid. 126-133.
11. Ettinger, S. J., 1983. Enfermedades Reumatoides. *Tratado de Medicina Interna .3ª. edición. Ed. Inter.-médica. Tomo III.*
12. Farber, L.J., Rubin.E., 1990. Los huesos y las articulaciones. Ed. Panamericana.
13. Feldman, M., Brennan, F.M., Maini, R. N., 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Rev. Imm. 14: 397-440.*
14. Graham, D. A., Mawhinney, K.A., Adair. B.M., Merza, M., 1998. Testing of bovine sera by ELISA for IgG, IgM and IgA rheumatoid factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology 61: 239- 250.*
15. Halliwell, W.E.R., Lavelle, y Butt, K. M., 1972. Canine rheumatoid Arthritis. A review and case report. *J. Small. Anim. Pract. 13: 239-248.*
16. Halliwell, W. E. R ., Werner, L. L. Baum, D.E., Newton, C.D., Wolfe, J.H. y Schumacher, H.R., 1989. Incidence and characterization of canine rheumatoid factor. *Vet. Immunol. and Immunopathology. 21: 161-175.*
17. Halliwell, W.E.R., Gorman. T.N., 1992. Inmunología Clínica Veterinaria. Ed. Acribia. 368-371.
18. Harris, F.D., 1990. Rheumatoid Arthritis. Pathophysiology and Implications for therapy. *Rev. New. Eng. J. Med. 322:1277-1289.*

19. Kahn, M. F., 1995. The history of rheumatoid factor subclasses. *Ann. Rheum. Dis.* 54: 578-581.
20. Kinne, W.R., Palombo, K.E y Emmrich, F., 1997. T-cells in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Villains or accomplices?. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta* 1360.109-141.
21. Kirk, R.W., Bistener, S. I., 1989. Manual de Urgencias Veterinarias. 3ra. Edición . Salvat. 294-297.
22. Klareskog, L., 1986. Reactivity of monoclonal anti-type II collagen antibodies with cartilage and sinovial tissue in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Reum.* 29: 730.
23. Lewis, R. M. y Borel, Y., 1971. Canine rheumatoid arthritis: a case report. *Arthritis Rheum.* 14: 67-74.
24. Morilla, G. A., Bautista, G. C. 1986. Inmunología Veterinaria. Manual de laboratorio. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México. A. C.
25. Natvig, J. N., Gaarder, P. I. y Turner, M.W., 1972. Clín. Exp. Immunol. 12: 177-184.
26. Newkirk, M.M., 1992. Identification of IgG rheumatoid factors by a novel method utilizing immunoblotting. *Journal of Immunol. Meth.* 148: 93-99.
27. Nicoll, D., Mc. Phee., 2002. Manual de Pruebas Diagnósticas. Manual Moderno. Santa Fé de Bogotá, Colombia.
28. Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., 2000. Manual de Patología Estructural y Funcional, España.

29. Rose, H. M., Ragan, C., Pearce, E., y Lipman, M. 1948. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid Arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68: 1-6.
30. Statical Package for the Social Science. Análisis de datos para computadora. The Apache Software Foundation Wes. 1999-2003. USA .
31. Shewwen, P.E., 1993. Veterinary Immunology Course. *Lecture Notes*. Notario Veterinary College. University of Guelph, Ontario.
32. Tizard, I., 1996. *Inmunología Veterinaria* . Nueva Editorial. Interamericana. Mc. Graw-Hill. México. D. F: 390-391.
33. Teitson, J. y Waldimarsen ,H.,1984. Use of monoclonal antibodies and (Fab)₂ enzyme conjugates in ELISA for IgM, IgA and IgG rheumatoid factors. *J. Immunol. Methods.* 71: 149-161.
34. Thoren-Tolling, K., 1992. A comparative study of different Methods for measurement of rheumatoid factor in dog serum. *J. Vet. Med. A.* 37: 430-438.
35. Ungar, W. H., 1991. Circulating immune complexes in bovine leukemia virus (BLV) infected. *Cattle Veterinary and Immunopathology.* 34: 173-179.
36. Wood, D. D., Hurwitz, A. I. y Schultz. R., 1980. A latex test for Canine Rheumathoid Factor. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1: 103-111.

XI. APÉNDICE.

1. Precipitación de gammaglobulinas.

Material:

- Vaso de precipitados de 150 ml.
- Baño de hielo
- Solución saturada de Sulfato de Amonio.
- Suero de caninos clínicamente sanos.
- Agua destilada
- Tubo de diálisis
- Solución de NaCl al 0.85%.

2. Tubo de diálisis. (SIGMA). Lote 38h0224.

Membrana celulosa.

- Remover la glicerina lavando el tubo con agua corriente de 3-4 hrs.
- Remover los compuestos de sulfuro tratando el tubo (w/v), con solución de sulfato de sodio al 3% a 80°C durante 1 minuto. Lavar con agua caliente 60°C por 2 minutos, seguido de la acidificación con una solución de ácido sulfúrico al 0.2% (v/v), enjuagar con agua caliente para remover el ácido.

Este tubo va a retener a muchas proteínas de 12 0000 mol. de peso ó más grandes.

\bar{X} de superficie de anchura:76nm (3.0°), / \bar{X} diámetro = 49mm. (1.9°); capacidad aproximada 640ml/pie.

3. Determinación de Proteína

Material:

- Elisometro
- Agua destilada estéril
- Albúmina Sérica bovina
- Solución Buferada estéril

Pesar 0.1 mg de albumina y agregar a 990 μ l. de agua destilada estéril.

Tubos Ependort	*PBS μ l	*Curva (μ g) (albúmina)	BSA ml (1mg/ml)
1	990	10	10
2	980	20	20
3	960	40	40
4	940	60	60
5	920	80	80
6	900	100	100

Resultados de Lectura en Elisometro

Tubo 1	0.224
Tubo 2	0.514
Tubo 3	0.726
Tubo 4	0.810
Tubo 5	0.824
Tubo 6	0.856

La concentración de proteína se hizo con una curva a partir de diluciones de albúmina bovina, y determinando su correlación, intercepto, y pendiente con la fórmula : $y = mx + b$.

pendiente (m)= 0.005 intercepto (b)= 0.377

$$.726 + .810 = 1.536 / 2 = .768$$

$$y = mx + b$$

despejando $x = \frac{y - b}{m} = \frac{0.768 - 0.3}{0.005} = \frac{93.6 \times 10 \text{ (Factor de dilución)}}{1000} = 0.936$

Concentración de proteínas: 0.93mg/ml.