

53
2ej

VARIACION ESTACIONAL EN LA INTENSIDAD
DE LA RESPUESTA FEBRIL DEL CONEJO ,
EN LA PRUEBA OFICIAL PARA LA DETECCION
DE PIROGENOS.

TESIS QUE PRESENTA:

MA. ILEANA EBERGENYI MAGALONI
PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA,
EN LA CARRERA DE BIOLOGIA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS, DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO:

OBJETIVOS.....	4
PARTE I	
CONTRIBUCION TEORICA	
REGULACION DE LA TEMPERATURA	6
REGULACION DE LA TEMPERATURA EN VERTEBRADOS.....	7
BIOLOGIA DE LA FIEBRE.....	14
AGENTES ACTIVADORES DE FIEBRE.....	17
PIROGENOS ENDOGENOS.....	22
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN LA FIEBRE	30
LA RESPUESTA FEBRIL EN CONEJOS COMO PRUEBA OFICIAL PARA DETECTAR CONTAMINACION PIROGENICA EN MEDICAMENTOS PARENTERALES.....	32
VENTAJAS DEL CONEJO COMO SUJETO DE PRUEBA.....	35
RECOMENDACIONES PARA LA PRUEBA	35
CARACTERISTICAS DEL ANIMAL	37
CARACTERISTICAS DEL MEDIO AMBIENTE.....	38
PROTOCOLO DE LA PRUEBA	40
REGISTRO DE RESULTADOS.....	44
INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	44
CORRELACION EN LA INTENSIDAD DE LA RESPUESTA FEBRIL EN CONEJOS Y EN HUMANOS.....	48

PARTE II
CONTRIBUCION PRACTICA

INTRODUCCION	53
HIPOTESIS	54
PRIMERA ETAPA.....	55
MATERIAL.....	55
METODOLOGIA.....	56
INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	57
+ SEGUNDA ETAPA.....	69
TERCERA ETAPA	76
CUARTA ETAPA	81
DISCUSION	94

OBJETIVOS:

Con la presente tesis intentamos cubrir dos objetivos principales;

- 1) Hacer una contribución práctica que consiste en probar que existe una variación estacional en la intensidad de la respuesta febril del conejo, en la prueba oficial para la detección de pi_rógenos.

- 2) En vista de que el tema no es del dominio común, antes de entrar de lleno en el objetivo anterior, haremos una contribución teórica, que consiste en el resumen informativo de ciertos temas que consideramos básicos, con el propósito de que el lector esté en posibilidades de comprender la problemática planteada.

PARTE I
CONTRIBUCION TEORICA

1: REGULACION DE LA TEMPERATURA

La mayor parte de los organismos que pertenecen al reino animal poseen cierta capacidad termoreguladora, que puede consistir exclusivamente en conductas tendientes a ganar o perder calor, o en mecanismos más refinados, con los mismos fines. En base a esta capacidad es que se divide a estos organismos en ectotérmicos y endotérmicos. La principal distinción entre estos dos grupos es la habilidad de los organismos endotérmicos para producir o generar internamente -- cantidades substanciales de energía, suficientes para incrementar su temperatura corporal considerablemente sobre la temperatura del medio ambiente. Esta capacidad los libera, de alguna manera, de los efectos de la temperatura ambiental, de manera que pueden permanecer activos, manteniendo condiciones óptimas para sus reacciones metabólicas, sobre un amplio rango de temperaturas ambientales. Por otro lado, los organismos ectotérmicos, que carecen de la maquinaria necesaria para generar grandes cantidades de calor, tienen que "confiar", primariamente, en ajustes conductuales, para mantener la temperatura corporal más o menos constante. En consecuencia, un organismo ectotérmico puede regular su temperatura corporal solamente en ambientes que tienen un perfil térmico apropiado. Por la noche en días fríos, durante el invierno, el organismo ectotérmico se vuelve lento, conforme su temperatura baja hacia la temperatura ambiental.

La regulación de la temperatura corporal por medios ectotérmicos, es decir, conductuales, se presenta en la gran mayoría de los seres vivos, incluyendo a las bacterias, que se mueven hacia las temperaturas más deseadas, entre 24° y 28°C . Por otra parte, una regulación de tipo esencialmente endotérmico se presenta, de manera generalizada, solamente en mamíferos y aves, aunque existen algunos casos excepcionales en plantas e insectos.

1.1. REGULACION DE LA TEMPERATURA EN VERTEBRADOS.

La energía que se gasta en un organismo endotérmico, para regular la temperatura corporal es enorme; por ejemplo, a temperaturas ambientales bajas, una persona puede llegar a gastar 1,800 kcal/día, solamente para generar el calor necesario para mantener el cuerpo a una temperatura de 37°C . Este desgaste requiere de grandes cantidades de alimentos, y ha llevado a los organismos endotérmicos a numerosas adaptaciones que les permiten obtener, digerir y utilizar grandes volúmenes de nutrientes.

El enorme gasto de energía que requiere regular la temperatura corporal ha llevado a especular sobre el valor adaptativo que pudiera tener el hecho de mantener la temperatura corporal a un nivel alto y constante, en contraste con el de dejarla fluctuar con la temperatura ambiental. Además, es un

hecho curioso que todos los organismos endotérmicos terrestres regulan su temperatura entre 35° y 42°C .

La explicación se encuentra en el efecto que tiene la temperatura sobre las reacciones bioquímicas, y que es mucho mayor del que puede ser explicado por un efecto térmico en la energía cinética promedio de las moléculas involucradas. Por ejemplo, muchas reacciones bioquímicas incrementan su tasa de reacción dos o tres veces por un incremento de 10°C . en la temperatura (Giese, 1968).

Arrhenius, en el siglo pasado, caracterizó los efectos de la temperatura sobre las reacciones bioquímicas, apuntando que la mayoría de las reacciones bioquímicas tienden a incrementar logarítmicamente, con incrementos en la temperatura hasta un punto de maximización. Sobre esta temperatura óptima, las reacciones decrecen (Johnson et al, 1954). Se ha demostrado que esta temperatura óptima se encuentra alrededor de los 40°C . Por otro lado, el límite superior de temperatura para la supervivencia de la mayoría de los organismos es de 45°C . Sobre esta temperatura, las proteínas tienden a desnaturalizarse (M.Kluger, 1979).

De esta manera, los termoreguladores frecuentemente están a unos pocos grados de su límite superior letal, pero obtienen todas las ventajas de una temperatura que les permite --

reacciones bioquímicas mucho más eficientes.

Desde el punto de vista físico, el proceso de regulación de temperatura es un fenómeno de relación entre pérdida y ganancia de calor del organismo hacia el medio ambiente. El organismo puede intercambiar energía térmica por los procesos físicos de convección, conducción, radiación y evaporación. Los tres primeros dependen de la diferencia de temperatura, y el último de la diferencia de presión de vapor, entre el organismo y su medio ambiente. Una modalidad de estos cuatro sería el incremento en la producción interna de energía térmica mediante el metabolismo o el ejercicio.

Para mantener una temperatura corporal constante, la tasa de pérdida y la de ganancia de calor deben mantenerse iguales. De no ser así, la temperatura corporal bajará o subirá según el caso.

Desde el punto de vista fisiológico, la regulación de la temperatura se puede resumir como un arco reflejo que consiste en sensores, integradores y efectores.

La parte sensora del arco reflejo está compuesta de células nerviosas receptoras, capaces de captar diferentes temperaturas y de convertir estos estímulos en la señal apropiada, es decir, en patrones y secuencias apropiadas de potenciales

de acción, que viajan a través de ellas, hacia los centros integradores (Kluger, 1979).

La receptividad térmica se ha demostrado en muchas y muy variadas zonas, órganos y tejidos del cuerpo, tales como la piel, el abdomen, la médula espinal, la médula oblongada y el hipotálamo (González et al, 1971; Kluger et al, 1971; Bligh 1973; Hamel, 1968), aun cuando algunas de estas zonas son mucho más sensibles que otras, a los cambios térmicos. Un ejemplo claro de ello es cómo los seres humanos perciben cambios térmicos más intensamente en la cara que en el resto del cuerpo.

La diferencia entre los organismos ectotérmicos y los endotérmicos, no parece residir en la parte receptora del arco reflejo, según los experimentos que se han hecho sobre esta cuestión (Kluger, 1979), y donde se demuestra que ambos grupos responden a cambios térmicos internos y ambientales.

El registro de los diferentes receptores, puede ser diferente en un momento dado, es decir, mientras que la piel podría registrar "frío", el abdomen podría registrar "calor", por esta razón, se hace una diferenciación entre la temperatura interna y la temperatura periférica o cutánea.

El integrador o integradores deben ser capaces de decidir

entre los diferentes mensajes de los receptores, para, a su vez mandar la orden correcta hacia los efectores. Se han hecho muchos experimentos e investigaciones tendientes a encontrar la zona del Sistema Nervioso Central que actúa como integradora de este arco reflejo térmico. Estos experimentos incluyen el registro de la actividad neuronal, la lesión de zonas neuronales o la inyección de sustancias -- que afectan la respuesta térmica (prostaglandinas, Na^+ o Ca^{++}) y han demostrado que la región preóptica y anterior del hipotálamo el hipotálamo anterior y el hipotálamo posterior, el tallo cerebral y la médula espinal, están involucradas en esta función, sin que se conozca aún cual es la función específica de cada uno, o el orden en que actúan (Hellon, 1970; Boulant y Hardy, 1974; Nutik, 1973; Wunnenberg y Hardy, 1974).

Snell y Atkins, en 1968 postularon una teoría que es ampliamente citada en la actualidad, y cuyo concepto principal es el Nivel-Fijo de temperatura. Esta teoría propone que, -- cualquiera que sea el integrador o los integradores, éste tiene un nivel-fijo (set-point) de temperatura, alrededor de la cual intentará regular la temperatura corporal. En tal caso, un organismo puede encontrarse en un estado de normotermia, en el cual la temperatura corporal coincide con la del nivel-fijo, de hipotermia o de hipertermia, donde la temperatura corporal es más baja o más alta que el nivel-fijo respectivamente.

te. A estos tres, se añade comúnmente, el estado de fiebre, en donde el nivel-fijo se ha elevado por encima de lo normal y que será tratado con más detalle posteriormente, ya que es el tema principal de este trabajo.

El integrador, pues, intenta mantener la temperatura corporal en el nivel-fijo, utilizando un conjunto de variados mecanismos, y es aquí, en la parte efectora, donde parece residir la diferencia esencial entre los organismos ectotérmicos y los endotérmicos (Kluger, 1979). En los primeros, la parte efectora del arco reflejo térmico, se reduce a patrones conductuales, mientras que los endotérmicos tienen una compleja variedad de recursos internos para controlar la temperatura corporal que incluye: 1) cambios en la producción metabólica de calor; 2) cambios en la circulación sanguínea cutánea o periférica, y 3) cambios en la pérdida de agua por evaporación, y además los patrones conductuales presentes en los ectotérmicos. Todos estos recursos implican de una u otra manera, uno o varios de los tipos de intercambio físico de calor mencionados anteriormente: convección, conducción, radiación y evaporación, y la modalidad que es la tasa de producción interna de calor.

Los cambios en la producción interna de calor se pueden llevar a cabo por efectos musculares (como en los escalofríos) o por la degradación (catabolismo) de las grasas.

Su efecto es directamente proporcional, de manera que, al aumentar la actividad muscular o catabólica de grasas, aumenta la temperatura.

Los cambios en la circulación cutánea o periférica tienen un efecto, más que sobre la temperatura, sobre el aislamiento del organismo mismo. Es decir, el intercambio de energía térmica entre una parte y otra del organismo, o entre el organismo y el medio ambiente, se ve afectado. En este caso, entonces, la medida puede tener el efecto de elevar o bajar la temperatura, según el estímulo. Normalmente, el frío produce una vasoconstricción de los vasos sanguíneos, impidiendo la pérdida de calor del cuerpo hacia el medio ambiente, e incluso el paso de calor de una parte del organismo a otra.

La pérdida de calor por evaporación se puede realizar de dos maneras: por la respiración, en el jadeo, o por el sudor. En ambos casos se requiere que la humedad relativa del ambiente sea menor que la del organismo.

Las respuestas conductuales incluyen salivación, orina y fluidos cloacales utilizados para la evaporación superficial; conductas motoras como cambio de lugar, de un lugar caliente a uno menos caliente, por ejemplo; cambios en la orientación de la superficie corporal, etc.

2: BIOLOGIA DE LA FIEBRE.

Una gran diversidad de experimentos (Liebermaster, 1887; - Cooper, et al, 1964; Cabanac, 1970; Cabanac y Massennet, 1974; - Sherp y Hammel, 1972; Vaughn, et al, 1974) han demostrado que todos los mecanismos de termoregulación se mantienen eficientes en la fiebre. La vasoconstricción en humanos, las respuestas conductuales en mamíferos, las respuestas conductuales de locomoción en iguanas y lagartijas, la tasa de potenciales de acción de las neuronas sensibles al calor y al frío en el hipotálamo, todos estos mecanismos se mantienen funcionales, pero tendientes a elevar la temperatura corporal sobre el nivel normal. Esto demuestra que la fiebre no es una incapacidad del organismo para controlar la temperatura corporal, sino que es una regulación de la temperatura al rededor de un nivel más alto.

El concepto de nivel-fijo, propuesto por Snell y Atkins es de gran importancia para la definición de la fiebre y se explicó en la sección anterior, definiéndolo como el nivel de temperatura alrededor del cual el integrador del arco reflejo térmico intenta regular la temperatura corporal; por ejemplo, el nivel fijo del ser humano, se encuentra entre 36.5° y 37° C. Cuando la temperatura corporal se encuentra por debajo de este nivel, el individuo se encuentra en un estado hipotérmico; en el caso, el integrador, al percibir es

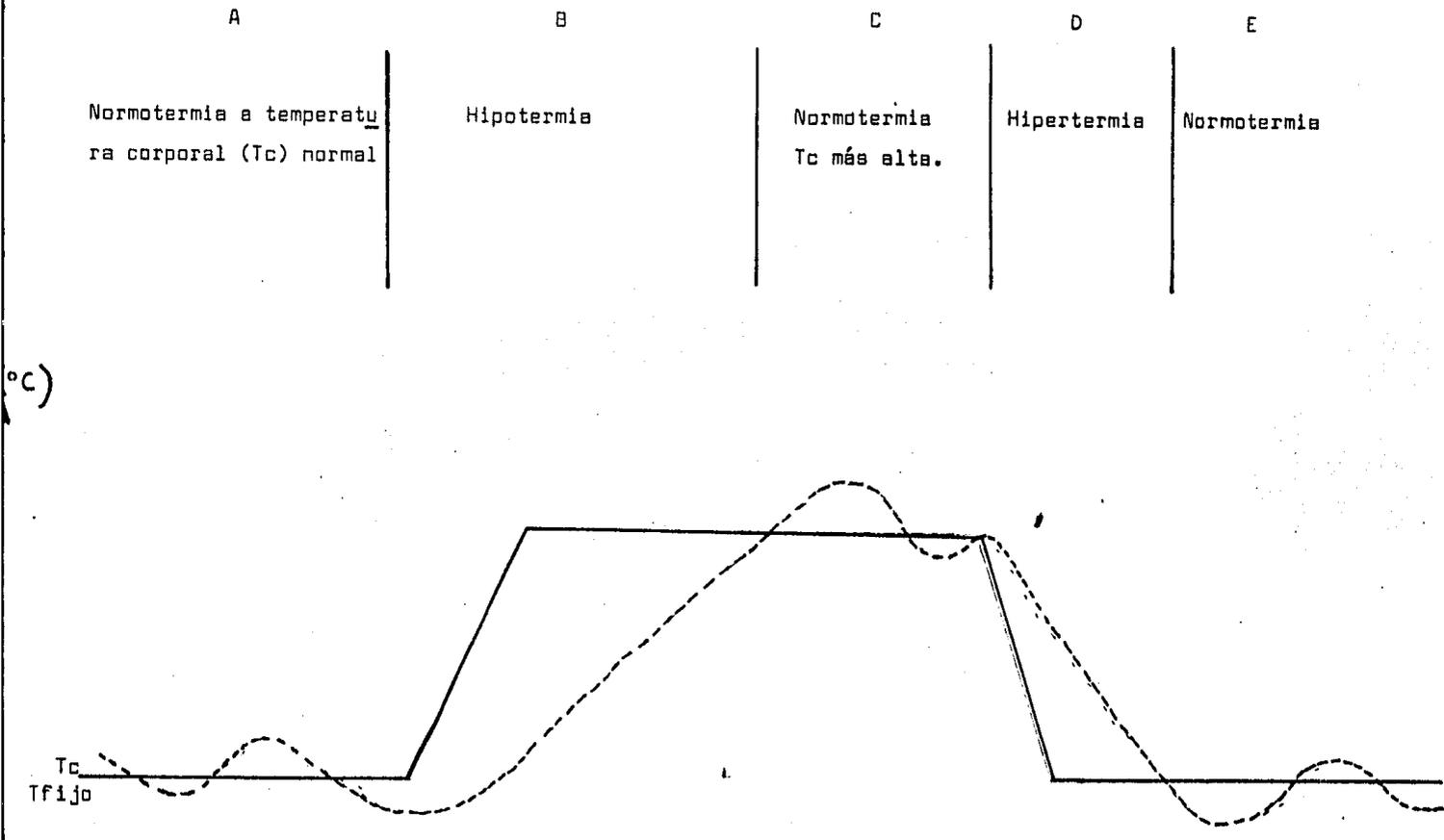


Fig.1: Desarrollo de la fiebre según la Teoría del Nivel Fijo

ta hipotermia, iniciará una serie de mensajes que modificarán los mecanismos involucrados en la regulación de la temperatura corporal, de manera que ésta se incremente. Disminución del sudor, vasoconstricción periférica, aumento en el catabolismo de grasas y escalofríos, son algunas de las respuestas a la hipotermia. En el caso contrario, cuando la temperatura corporal se halla por encima del nivel-fijo, el organismo iniciará una serie de respuestas tendientes a bajarla. Es obvio que, cuando hay fiebre, el organismo está regulando su temperatura alrededor de un nivel-fijo más alto y que la secuencia de eventos involucra, primero, una elevación del nivel-fijo y después de una elevación de la temperatura corporal. Este hecho es interesante, ya que, al principio del fenómeno, cuando el nivel-fijo se eleva, se puede considerar que el organismo se encuentra en un estado hipotérmico, mientras que, una vez que la temperatura se ha elevado al estado de fiebre, el individuo se encuentra en un estado normotérmico (fig.1).

2.1 AGENTES ACTIVADORES DE FIEBRE:

La fiebre ocurre naturalmente como resultado de infecciones bacterianas o virales o de cualquier reacción antígeno-anticuerpo, que cause inflamación severa.

El presente historia del conocimiento de los agentes activadores de fiebre ha sido largo. A finales del siglo XIX

se demostró que el agua destilada, soluciones salinas y toxinas bacterianas pueden producir fiebre y otras reacciones tóxicas en el hombre y animales, cuando se inyecta por vía intravenosa o muscular.

En 1879, Sir John Burden Sanderson, introdujo el término "pirógeno" para designar al compuesto responsable de la fiebre, que se presentaba comunmente después de una transfusión de sangre.

Por muchos años, se definió a los pirógenos de forma operacional:

"Substancia de naturaleza desconocida, probablemente -
protéica, que se encuentra en el agua destilada que se
usa en la preparación de sustituyentes sanguíneos y res-
ponsable de la elevación ocasional de la temperatura
corporal, después de la transfusión de sangre o de --
otros fluidos por vía intravenosa" (Kluger, 1979).

En 1884, Centani aisló un pirógeno de cultivos de bacte--
rias y determinó su naturaleza no protéica. Otro descubri--
miento importante es la alta correlación que existe entre --
los efectos pirogénicos de las bacterias pirogénicas y las -
gramnegativas.

Seibert (1923), mediante un trabajo muy cuidadoso, demos-

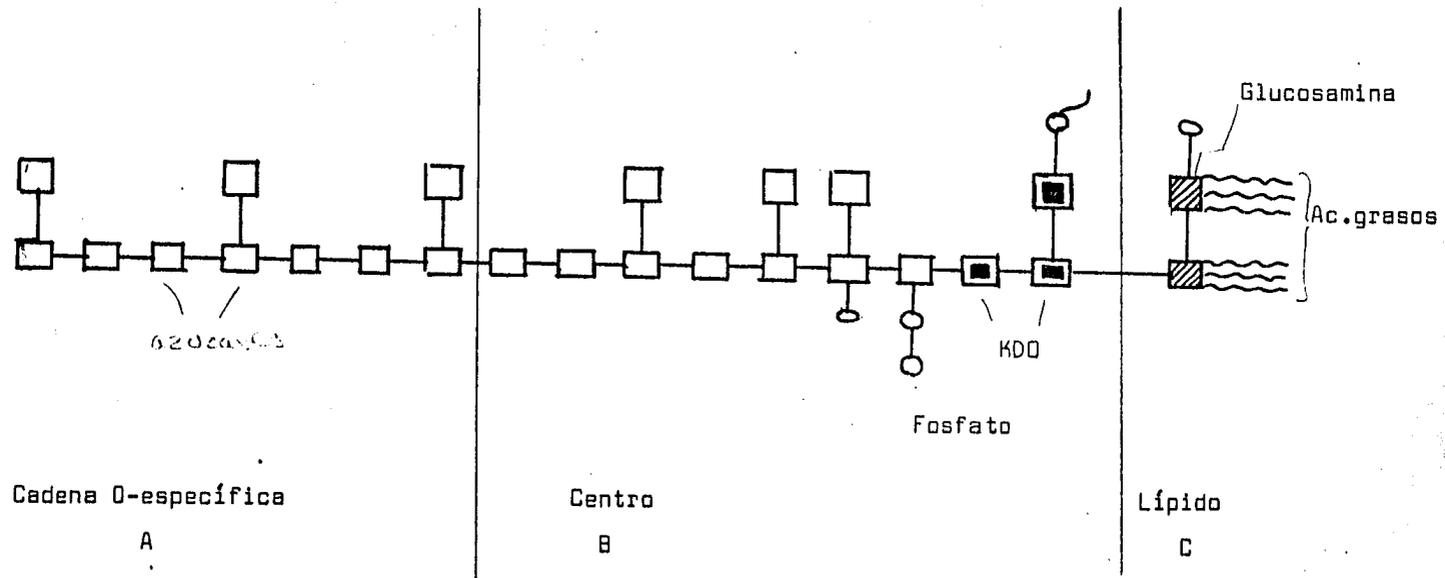


Fig.2: Molécula de lipopolisacarido.

tró conclusivamente que muchas fiebres atribuibles a otras causas, son, de hecho, el resultado de la acción de un producto termoestable y que su principal fuente es el agua que se usa como diluyente en la preparación de medicamentos.

En la actualidad, este producto es el causante de fiebre más estudiado. El término moderno de "endotoxina" se utiliza para designarlo, aún cuando el término pirógeno se sigue usando para designar a los causantes de fiebre, y es un concepto, de alguna manera más amplio que el de endotoxina, puesto que no todos los agentes activadores de fiebre -- son endotoxinas.

La endotoxina es un componente natural de la membrana externa de la pared celular bacteriana, junto con fosfolípidos y proteínas. En la figura 2, se muestra esquemáticamente la molécula de lipopolisacárido, que constituye la endotoxina. Como puede verse, esta molécula está compuesta de tres partes: 1) la cadena O-específica, 2) la parte central y -- c) el lípido A. Las dos primeras son sacáridas y la última es un lípido. Se sabe que esta última parte es la responsable de el disparo de la respuesta febril (Good y Lane, 1977). La molécula lipopolisacárida de endotoxina es muy estable y resistente al calor. Su capacidad para producir fiebre subsiste, aún cuando provenga de porciones de pared celular de bacterias muertas. Debido a que contiene regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, la molécula de lipopolisacárido puede

existir en diferentes formas agregadas, con estructuras determinadas por la composición de la solución, como vesículas, bicapas o micelas, que pueden extraerse, aunque no totalmente, mediante filtros de diferentes medidas.

Los efectos de la administración de endotoxinas sobre un organismo, varían con la especie del animal que recibe la inyección. Se han descrito más de treinta efectos distintos de la endotoxina sobre el huésped (Newtony, 1969), entre los que se encuentran: Reducción del número de leucocitos circulantes seguida de una producción de leucocitos nuevos, reducción de niveles de hierro en suero, disminución de la presión sanguínea, hiperglicemia, necrosis hemorrágica de tumores, hiperreactividad vascular, fiebre, y en dosis pequeñas se presenta un reforzamiento de la resistencia inmunológica no específica.

Cuando se inyecta a un organismo con endotoxina o bacterias gramnegativas vivas o muertas, se desarrolla un proceso de fiebre después de un período de latencia que varía según la especie del organismo. En el conejo de laboratorio es de 15 a 30 minutos, en el ser humano es de aproximadamente una hora y en los pájaros puede ser de tres horas o más (Good y Lane, op. cit).

En todos los casos, después de inyecciones repetidas de endotoxina, el organismo desarrolla tolerancia.

2.1.1. PIROGENOS ENDOGENOS.

La explicación para el período de latencia reside en que la endotoxina no es el agente directo de la fiebre. Cuando la endotoxina entra en circulación sanguínea, es fagocitada por diferentes tipos de células del sistema inmunológico. Esta fagocitosis activa, en estas células, la producción de -- una sustancia endógena (pirógeno endógeno) que será la que actúe sobre integrador del Sistema Nervioso Central (Kluger, op.cit.; Good y Lane, op.cit.).

Los pirógenos endógenos, a diferencia de las endotoxinas, son proteínas de peso molecular bajo, que como proteínas, se desnaturalizan rápidamente o se inactivan a altas temperaturas. Cuando se inyecta pirógeno endógeno a un organismo, el período de latencia es sensiblemente menor que para las endotoxinas y el animal desarrolla poca tolerancia a la inyección repetida (Kluger, op.cit.; Good y Lane, op.cit.). Se ha demostrado que las células tales como granulocitos polimorfonucleares, monocitos, células de Kupffer en el hígado y macrófagos del bazo, pulmones y nódulos linfáticos, producen pirógenos endógenos cuando se incuban in vitro con diferentes tipos de agentes activadores. La estructura del pirógeno endógeno varía según el tipo de célula que lo produce, igual que el producido por el mismo tipo de células en diferentes especies, pero todos producen fiebre (Bornstein y Woods, --

1969; Kluger, 1977; Atkins, 1966; Bodel et al, 1973; Dinarello, et al, 1974).

La mayor parte de las investigaciones que se han hecho sobre pirógenos endógenos han sido estudios que involucran -- granulocitos polimorfonucleares (Kluger, 1979). Se ha demostrado que la producción de pirógeno endógeno es un proceso dependiente de la síntesis de proteínas (Moore et al, 1970; Nordlund and Root, 1970; Bodel, 1970), y de la temperatura, y que tiene lugar durante varias horas (Atkins, 1966).

El pirógeno endógeno es sintetizado a partir de un precursor no funcional, después de la activación de la célula por la fagocitosis de endotoxina (Kluger, 1974).

La tolerancia a la endotoxina está relacionada con el reforzamiento de la remoción de endotoxina de la sangre después de inyecciones repetidas de endotoxina. Besson (1974) encontró que el sistema retículo endotelial (los varios tipos de células que tienen la función fagocítica) es extremadamente importante en la remoción de endotoxina de la sangre. Estas células, que forran los pasajes vasculares y linfáticos, se encuentran también en tejidos tales como la médula ósea, el bazo, el hígado y los nódulos linfáticos. La tasa de remoción de endotoxina está también relacionada con el nivel de anticuerpos en el suero, sobre todo las opsoninas que facilitan

tan la fagocitosis (Jenkin y Rowley, 1961).

2.2 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y LA FIEBRE:

Existe una considerable evidencia de que el SNC está involucrado en el desarrollo de la fiebre (Kluger, 1979). Esto puede parecer trivial, pero es necesario diferenciar entre lo que podría considerarse hipertermia, que puede ser efecto de distintas causas, y lo que se considera fiebre, que involucra la elevación del nivel-fijo en el integrador del SNC, como resultado de la acción pirogénica.

La principal evidencia que existe de la actividad pirogénica sobre el cerebro, la proporcionaron Cooper et al. en 1967, al inyectar pirógeno endógeno en diferentes áreas del SNC, y provocar una disminución en el período de latencia y un incremento en la magnitud y duración de la fiebre. Sin embargo, ha sido mucho más difícil demostrar qué parte específica del SNC interviene en la producción de fiebre. Solamente la inyección de pirógenos endógenos en pequeñas cantidades de pirógeno endógeno en la región del POAH produjeron fiebre, en el experimento de Cooper et al. Por otro lado, Rosendorf y Mooney, en 1971, demostraron esta misma actividad, pero disminuída, en el tallo cerebral.

Sin embargo, a pesar de que el POAH es un área térmicamente sensible, que responde a los pirógenos y está implica

da en la integración de la información térmica, su extracción o lesión tiene un efecto mínimo sobre la producción de fiebre (Veale y Cooper, 1975; Anderson et al, 1965; Lipton y Trzcinka, 1976). Esta es una paradoja que hasta el momento no tiene explicación, como no sea que el POAH no es el único centro integrador, y que, por ejemplo, el tallo cerebral cumple con la misma función.

3. LA RESPUESTA FEBRIL EN CONEJOS COMO PRUEBA OFICIAL PARA DETECTAR CONTAMINACION EN MEDICAMENTOS PARENTERALES.

Actualmente, y como una de sus principales aplicaciones, se utiliza la respuesta febril en conejos para detectar contaminación endotóxica en medicamentos parenterales.

Los medicamentos parenterales son aquellos que se administran por vías no digestivas, como la intramuscular, intravenosa, hipodérmica y oftálmica.

Las ventajas de la administración parenteral de drogas no pueden exagerarse y son bien reconocidas por los médicos actuales. La inyección intravenosa, por ejemplo, es el medio más eficaz para la administración de agentes terapéuticos y para la reposición de fluidos orgánicos, electrólitos o nutrientes. La administración de medicamentos por vía parenteral permite también, obtener una respuesta biológica inmediata; administrar drogas que no son efectivas por vía digestiva, o que son destruidas por las secreciones digestivas; administrar medicamentos a pacientes que se encuentran inconscientes; obtener un efecto local de la droga; alimentar a pacientes que se encuentran imposibilitados para ingerir alimentos; en fin, se puede decir que un alto porcentaje de medicamentos administrados en hospitales, se hace por vía intravenosa.

En la mayoría de los países avanzados, en los que se en---

cuentran compañías públicas y privadas productoras de medicamentos parenterales, como Francia, Hungría, Gran Bretaña y - Estados Unidos, las farmacopeias oficiales requieren que, para que un lote de medicamento parenteral sea liberado al mercado, éste pase la prueba de pirógeno en conejos. Uno podría preguntarse ¿Por qué, a pesar de que existen variaciones entre las pruebas prescritas por estas farmacopeias, el protocolo general es el mismo para todas? Este hecho tiene mucho que ver con la forma en que se ha desarrollado el conocimiento de estos medicamentos y también el de sus contaminantes.

Desde 1840, la medicación parenteral es una práctica médica común; en aquella época los médicos usaban jeringas semejantes a las modernas y la solución a inyectar se disolvía calentándola justo antes de inyectarla, sin ninguna contribución mayor a la esterilidad de la inyección.

Ya en la década de 1890's, la literatura médica daba nota de la importancia de la esterilización de la jeringa y las soluciones a inyectar. En esta misma década se comenzó a hablar de lo que se llamó "reacción pirogénica" y que consistía en el desarrollo de un estado de fiebre después de la administración de algún medicamento por vía parenteral. Se pensaba en alguna substancia proteínica proveniente del material utilizado en la inyección, como causante de esta reacción. En 1894, Cetani aisló un pirógeno de un cultivo de --

bacterias y determinó su naturaleza no proteínica, y poco después se estableció la relación entre pirógenos y las bacterias gramnegativas.

En 1923, mediante un trabajo muy cuidadoso, Florence Seibert demostró el origen bacteriano de la substancia responsable de la reacción pirogénica y además, que el agua de solución es la principal fuente de esta substancia. Se comenzó entonces a ver la necesidad de un control eficaz de la contaminación de endotoxina en los medicamentos parenterales, más aún, conociéndose los efectos de las endotoxinas más profundamente, y que fueron descritos en la sección anterior.

Fue el trabajo mismo de Seibert, el que dió la pauta para el protocolo oficial de la prueba de pirógenos, que utiliza al conejo como sujeto, y que fue aprobado por la farmacopeia de Estados Unidos en 1942 y por los demás países alrededor de estas mismas fechas. De esta manera, todos los fabricantes de medicamentos parenterales deben someter sus productos a la modalidad oficial que les corresponda, de la prueba de pirógenos en conejos. Todos los medicamentos que se administran por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa, como las inmunoglobulinas, vacunas, soluciones salinas y de glucosa, etc., y sobre todo, el agua que se utiliza en solución, deben pasar por esta prueba.

La importancia de la prueba, entonces, radica no solamente

te en el número tan grande de veces que ésta se lleva a cabo en el mundo, por las diferentes compañías productoras de medicamentos parenterales, si no además y principalmente, por las consecuencias graves que tendría liberar al mercado un lote de medicamento parenteral contaminado con endotoxina.

3.1 VENTAJAS DE CONEJO COMO SUJETO DE LA PRUEBA:

Hasta hace poco, el modo más sensitivo para determinar si una solución estaba contaminada o no con endotoxina, era inyectar la solución a un animal y observar si se desarrollaba fiebre. Se han observado respuestas pirogénicas en una variedad de animales, incluyendo conejos, cuyos, perros, gatos, monos y caballos.

El uso del conejo de laboratorio para la prueba de pirógenos se debe probablemente al trabajo de Seibert, quién, en el proceso de investigar las causas de la fiebre, hizo miles de observaciones de la respuesta febril de este animal. Es, en realidad, un excelente animal para probar la pirogenicidad de soluciones contaminadas, porque es muy manejable, cuesta relativamente poco mantenerlo y responde a dosis muy bajas de endotoxina.

3.2. RECOMENDACIONES PARA LA PRUEBA.

La seguridad de que los productos farmacéuticos están libres de pirógenos depende de que las pruebas que se realizan en estos productos sean confiables en la detección de pirógenos.

Por más de treinta años, las compañías farmacéuticas han hecho un uso extensivo de la prueba de pirógenos en conejos. Numerosos autores e instituciones, incluyendo las farmacopeias de Francia, la RDA, Rumania, Gran Bretaña y la USP (United - States Pharmacopeia) recomiendan o prescriben esta prueba.

Por otro lado, la teoría experimental (Van Noordwijk, de Jong, 1977), sostiene que todas las pruebas se caracterizan por los parámetros de:

- 1) Sensibilidad o habilidad de la prueba para dar resultados positivos en presencia de la substancia que se está probando.
- 2) Reproductibilidad (precisión y repetibilidad) e intervalo de variación del resultado.
- 3) Especificidad o habilidad de la prueba para dar resultados positivos solamente con la substancia que se está detectando.
- 4) Adecuidad o determinación de cierta substancia, que se está probando.

Según estos parámetros, la determinación de la pirogenicidad por la respuesta febril, debe indicar solamente la presencia de toxinas, sin la interferencia de otros factores --

inductores de fiebre. Para ello, se debe tener conciencia de que estos inductores pueden tener su origen en diversas causas, tales como las características del animal, el medio ambiente en el que éste se desenvuelve, las condiciones en las que se realiza la prueba, etc. Por lo tanto, es deseable estandarizar tanto como sea posible todos estos factores.

3.2.1 CARACTERISTICAS DEL ANIMAL.

La respuesta de los conejos a la endotoxina bacteriana -- puede estar relacionada con algunas características del animal, como la raza, la edad, el peso y el sexo.

Respecto a la raza, P. van Dijk y H. van Coorde (1977) demostraron experimentalmente que la raza Holland presenta una mayor sensibilidad a los pirógenos que las razas New Zealand -- (albinos) y Dendremonde. Sin embargo, casi siempre se usan conejos New Zealand, por su tamaño adecuado y porque tienen las venas de la oreja muy prominentes, lo que facilita la inyección. De cualquier manera, casi ninguna farmacopeia exige una raza en especial. El énfasis se hace más bien sobre el peso (entre 1.5 y 3kg.), porque tiene una gran influencia en la dosis a inyectar, y en la edad: casi siempre se recomienda que se usen conejos maduros, porque los conejos inmaduros son -- significativamente más resistentes a la actividad pirogénica de las endotoxinas.

En cuanto al sexo, no se ha observado ninguna diferencia entre los dos sexos. (Kunhold, 1977). Sin embargo, se prefieren las hembras, porque tienden a ser más fáciles de manejar. Además, los machos orinan con un chorro a gran presión, lo que produce problemas de sanidad.

3.2.2. CARACTERISTICAS DEL MEDIO AMBIENTE.

En cuanto al medio ambiente, en el que se desenvuelve el animal que estará sujeto a la prueba, hay una gran variedad de recomendaciones, no siempre oficiales, que van desde las condiciones ambientales como el espacio mínimo que requiere el animal, hasta las condiciones que deben tenerse en la colonia de conejos.

El tipo de colonia que se requiere, depende de la naturaleza del material que se va a probar. Para la mayoría de los productos parenterales, se puede permitir la utilización repetida de conejos cada tercer día, a menos que el animal haya recibido una muestra que se juzgue pirogénica, en cuyo caso, debe descansar por dos semanas antes de volver a usarse. Además, las fluctuaciones de temperaturas ajenas a la respuesta pirogénica, van disminuyendo conforme el animal se acostumbra al manejo, con lo cual se aumenta la precisión de la prueba.

Las sustancias antigénicas, como las fracciones proteí-

nicas del plasma, por otro lado, no pueden ser inyectadas repetidamente a los conejos, sin causar una reacción anafiláctica; los conejos, en este caso, se pueden usar hasta tres veces en un período no menor de siete días, siempre que no se observe pirogenicidad en ninguno de los productos probados. En una colonia de este tipo, la utilización repetida de los conejos es muy limitada.

La incidencia más común de resultados positivos falsos se encuentra en conejos nuevos y no probados (Weary y Baker, 1977); conejos que entraron a la colonia recientemente. Por esta razón, cuando se introduce un animal nuevo a la colonia debe mantenerse en cuarentena por dos semanas cuando menos. En este período se le aplica una solución contra parásitos, sobre todo en las orejas, y se aplica un tatuaje con un número asignado previamente, en la oreja. Solamente los conejos que se muestran saludables después de la cuarentena, se transfieren a la colonia.

Ya en la colonia, se les mantiene en jaulas adecuadas, con alimentación standard y agua ad libitum, y se les pesa periódicamente (cada dos o tres días). Una pérdida abrupta y considerable de peso puede indicar condiciones de enfermedad, por lo que esta práctica es muy importante.

El diseño de las instalaciones donde se mantiene a los -

conejos es muy importante, y tiene mucho que ver con el objetivo de este trabajo. La localización, la ventilación, la temperatura y humedad relativa del ambiente, el ruido, la sanidad, el espacio, son factores que tienen influencia sobre los resultados de la prueba. Existe mucho material de consulta sobre este diseño, y en general, casi todos coinciden en sus recomendaciones, pero en realidad, las instalaciones pueden diferir mucho en sus facilidades, de un bioterio a otro. Por ejemplo, en muy pocos se controla la temperatura y en menos la humedad relativa. A pesar de que las facilidades sanitarias y de espacio se describen cuidadosamente en la literatura sobre este tema, éstas están, en realidad, supeeditadas a las necesidades económicas y de espacio de las compañías productoras. Lo que se observó, de manera directa en las compañías que se visitaron, en general, fué un espacio aproximado de 50 cm² de piso por conejo, que es un espacio muy reducido, comparado con lo que teóricamente se recomienda.

Un requisito en el que se hace mucho énfasis, es el espacio donde se mantiene al animal poco antes de la prueba y durante ésta. Generalmente las compañías tienen un espacio para estos fines, muy aislado, en donde se controla la temperatura (entre 20^o y 22^oC.) y la humedad relativa (entre 60 y 70%), el ruido y las visitas.

3.3 PROTOCOLO DE LA PRUEBA.

Antes de que los conejos puedan usarse en una prueba de pirógenos, se recomienda registrar su temperatura periódicamente (cada dos o tres horas), desde el día anterior o dos días antes. Si un conejo muestra temperaturas rectales extremas, por debajo de 38.5 o por encima de 39.8, se le excluye de la prueba.

El día de la prueba, se conserva a los conejos en ayuno, y la prueba se debe llevar a cabo a una hora determinada, siempre la misma, por la mañana, porque los conejos tienden a ser más sensibles o a responder con mayor intensidad en las tardes (Hess, 1971). Debe tenerse cuidado de no excitar a los conejos con ruidos poco usuales o con un manejo tosco al transferirlos de un lugar a otro.

Por la mañana, se les transfiere a una presala para esperar la prueba, aislada de ruidos y visitantes. Justo antes de empezar la prueba, se les pesa, para calcular la dosis a inyectar y se les transfiere a otro cuarto para colocarlos en cepos (fig.3), que restringen los movimientos bruscos. La temperatura rectal de los conejos se puede determinar de varias maneras. El aparato más simple y preciso es el termómetro clínico, lubricado con petrolato e inserto en el recto del conejo, a una profundidad no menor de 7.5cm. El termómetro se mantiene en su lugar hasta que la temperatura indicada se estabiliza. Durante el proceso, el

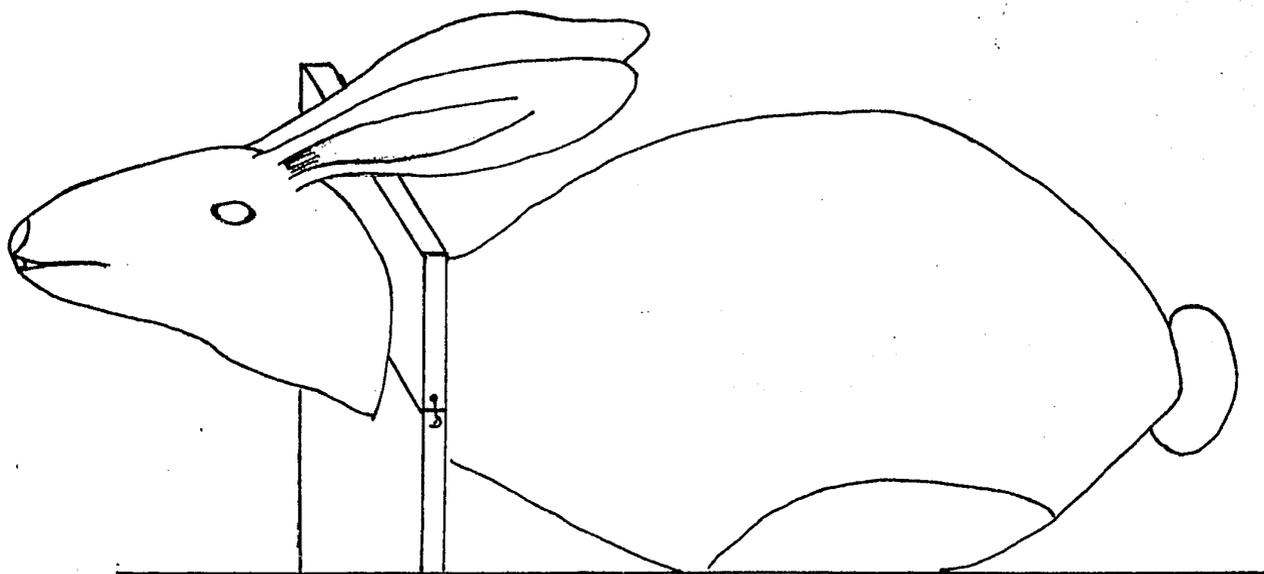


Fig. 3: Conejo en el cepo.

conejo se encuentra sobre las piernas del operador. Este procedimiento se lleva mucho tiempo y es práctico solamente cuando se necesita un número limitado de pruebas.

Cuando se requiere realizar pruebas a mayor escala, se puede usar un termómetro transistorizado, con salidas termosensibles pares. El registro de los cambios de temperatura se basa en las variaciones en la resistencia eléctrica de los metales con los cambios de temperatura. La temperatura registrada se despliega en una pantalla graduada. La sensibilidad del aparato es de un décimo de grado centígrado, y alcanza hasta 42 C; el registro es rápido y se estabiliza en 5 segundos.

Cuando los conejos están colocados en los cepos, se les inserta en el recto una de las salidas del termopar, lubricada con petrolato; se permite un período de estabilización de treinta minutos y se registra la primera temperatura, que será la temperatura control o base para la computación de incrementos subsecuentes. Una variación de 1°C. en las temperaturas iniciales del conjunto de los conejos sometidos a la prueba es inaceptable. Asimismo, los conejos que muestran temperaturas por encima de 39.8°C. se descartan.

La temperatura se registra cada media hora, durante las siguientes tres horas, asegurándose de que las salidas o termopares se mantengan en su lugar.

3.1.2. ADMINISTRACION DEL PIROGENO.

El material problema que se va a probar, debe administrarse dentro de cuarenta minutos después de registrar la temperatura control. Todos los instrumentos utilizados deben estar libres de contaminantes.

Se inyecta un volumen de 10ml/kg de peso, de la solución problema, por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja. Siempre se inyecta la solución lentamente, cuidando de no dañar las venas de la oreja. Si ocurre daño, el conejo debe descansar por una o dos semanas antes de someterse a otra prueba.

En algunos laboratorios, antes de que un conejo se someta a la prueba, se le somete a un simulacro de prueba, donde se registra la temperatura exactamente como se hace en la prueba real, pero sin que se administre ninguna inyección. Algunos laboratorios realizan hasta tres simulacros. En el primero se coloca al conejo en el cepo, durante tres horas, sin realizar ninguna otra operación. En el segundo, se coloca en el cepo y se le introduce el termopar por tres horas, y en la tercera, además se le inyecta una solución salina inocua y se registra su temperatura durante tres horas. Estas prácticas tienen dos objetivos: el de familiarizar al conejo con el procedimiento, y el de excluir a los conejos

que muestran un incremento significativo en la temperatura, sin ninguna razón para ello. Incluso algunas farmacopeias, como la de Francia, la de la RDA, y la rumana, han introducido un pretratamiento de conejos, donde se les inyecta -- una preparación standard de pirógeno y prescriben la exclusión del experimento a los conejos con sensibilidad insuficiente

3.1.3 REGISTRO DE RESULTADOS.

Es una práctica común en los laboratorios en donde se realiza esta prueba, asignar a cada conejo en el bioterio, una tarjeta, en donde se anota minuciosamente, el desarrollo y la actuación del conejo durante su estancia en el bioterio, y principalmente los registros de temperatura que se observan durante las prepruebas y la pruebas reales.

Durante la prueba, se toma la temperatura inicial inmediatamente antes de la inyección, cada media hora, durante tres horas. La temperatura inicial se toma como la temperatura base para calcular incrementos subsecuentes, y se toma en cuenta para los resultados, el incremento máximo registrado o la diferencia más grande entre la temperatura inicial y los registros posteriores.

3.1.4. INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Cuando se inyecta a un conejo con una dosis alta de pi-

rógenos, ocurre una curva de incremento de temperatura, con dos clímax; el primero, que es el más alto, ocurre aproximadamente una hora después de la inyección, el segundo, menor, después de tres o cuatro horas. La intensidad de la respuesta está relacionada con la cantidad de pirógenos que se inyecta, es decir, con la dosis y con la patogenicidad de la especie que sirvió como fuente de pirógenos; en este último sentido, se ha observado, incluso, un efecto sinérgico entre especies distintas (Lucken, Adlam, Knight, - 1977).

Es esta capacidad de respuesta la que nos proporciona la oportunidad de utilizar al conejo para detectar contaminación de pirógenos en medicamentos parenterales. Sin embargo, la prueba conlleva en sí misma, de forma intrínseca, su propia problemática.

Si observamos la figura 4, nos daremos cuenta de que la prueba perfecta en conejos nos llevaría a aceptar todas las muestras que no contienen pirógenos, y a rechazar todas las que sí contienen pirógenos. Sin embargo, existe la posibilidad (y se han dado muchos casos) de rechazar -- muestras no contaminadas, lo que significa un desperdicio de material, o de aceptar muestras contaminadas, lo que -- constituye un riesgo médico. La figura muestra, asimismo, cómo éstas dos fuentes de error, están relacionadas con la

especificidad y con la sensibilidad de la prueba.

		Pirógenos	
		Ausentes	Presentes
Resultado	Aceptado	Correcto	Negativo falso
	Rechazado	Positivo falso	Correcto

ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD
$\frac{\text{Correcto A}}{\text{Correcto A} + \text{Falso C}}$	$\frac{\text{Correcto D}}{\text{Correcto D} + \text{Falso B}}$

Fig. 4

La sensibilidad de la prueba es uno de los puntos de mayor discrepancia, resultado del hecho de que la prueba no detecta cantidades exactas de pirógenos, sino que, según las propias prescripciones de las farmacopeias, detecta un cierto nivel, más o menos impreciso, de concentración de pirógenos en la solución, lo que contrasta, de alguna manera, con el hecho de que el resultado es interpretado como aceptado-rechazado. La combinación de estas dos condiciones presenta grandes problemas; por ejemplo, se menciona a menudo en la literatura al respecto, cuán difícil es tomar una decisión entre aceptado y rechazado, cuando los resultados se encuentran alrededor de los límites prescritos.

Para ilustrar un poco más esta problemática, revisemos las prescripciones que las farmacopeias de Hungría y de Estados Unidos, que se encuentran entre las más importantes, hacen con respecto a esta prueba, en el caso particular de

los medicamentos hemoderivados

El protocolo de la farmacopea húngara (Haegedus y Benko, 1977), prescribe que, al probar lotes de albúmina o de inmunoglobulina, se inyecten tres conejos con soluciones al 5%, en dosis de 5ml./kg, y con soluciones al 10% en dosis de 1.5m./kg, por vía intravenosa. El lote es aprobado cuando ningún conejo muestra un incremento mayor de 0,5 C. y la suma de los incrementos de la temperatura de los tres conejos es menor de 1.2°C. Si el incremento promedio de temperatura está entre 0.6 y 1.1°C., el lote se puede probar en veinte personas, con la misma dosis - prescrita. En esta última prueba, cuando el incremento promedio en las veinte personas es menor de 1°C, y todos los incrementos individuales están por debajo de 0.6°C., el producto - puede liberarse.

El protocolo de la farmacopea estadounidense (Marcus, Nelson, 1977) prescribe que se inyecte una dosis de 3ml/kg. de peso del lote a probar, o una dosis semejante a la que se administre en seres humanos, según el medicamento, a tres conejos - adultos, sanos, por vía intravenosa. Si uno o más de los tres conejos muestra un incremento de temperatura de 0.6°C. o más, o si la suma de los tres incrementos excede de 1.5°C. la prueba se repite en cinco conejos. En este caso, si no más de tres conejos del total de ocho, muestran incrementos de 0.6°C. o más, y si la suma de los

ocho incrementos no excede de 3.7°C el producto se libera.

Como puede verse, aparte de las distintas opiniones sobre cuantos mililitros deben ser inyectados a los conejos, tampoco hay unanimidad respecto a la interpretación de los resultados, ya que se permiten valores de incrementos de temperatura que varían de 0.6 a 1.1°C.

La discrepancia en estos puntos se ve reforzada por distintos reportes científicos que se contradicen entre si, incluso en el volumen de la inyección. (Cooper, Pearson, 1977; Gardi y Arpagus, 1977; Zimmerman, 1977).

4. CORRELACION EN LA INTENSIDAD DE LA RESPUESTA FEBRIL EN CONEJOS Y EN HUMANOS.

Demostrar, en términos indiscutibles, una correlación significativa entre la respuesta febril de los conejos y la del ser humano, representa una tarea difícil; la principal fuente de información en este sentido es la práctica misma, es decir, el comportamiento que demuestran medicamentos que fueron liberados al mercado, habiendo pasado la prueba oficial en conejos, cuando se administran a pacientes humanos.

Según Marcus y Nelson (1977), la sensibilidad de la prueba, tal y como se codifica en las distintas farmacopeas, está basada en la observación clínica, en la experien-

cia de qué elevaciones en la temperatura del conejo de aproximadamente 0.6°C ., tienen un nivel satisfactorio de reacción febril en los pacientes humanos. Además, "no existe una demostración inequívoca de casos de respuesta pirogénica en humanos a preparaciones que hayan pasado la prueba de pirógenos en conejos (Marcus y Nelson, op. cit).

Sin embargo, Noordwijk y Jong (1977) afirma que, en el curso de control práctico de soluciones de inmunoglobulina "...se han encontrado muchos lotes cuya pirogenicidad positiva no pudo ser determinada sin ambigüedades, en los conejos. La confiabilidad de los resultados obtenidos se ha visto disminuída a menudo por la contradicción de los resultados en distintos grupos de conejos". Y Hegedus y Benko (1977) reportan que "... en base a los datos disponibles, no se ha encontrado una correlación confiable entre la prueba de pirógenos en conejos y el incremento de temperatura en el hombre. La misma preparación que pasa la prueba de pirógenos en conejos prueba ser pirogénica en pacientes humanos".

Otra fuente de información en el sentido que nos ocupa, proviene de las prácticas de control interno de calidad de las compañías productoras de medicamentos parenterales, especialmente en Hungría, donde la farmacopeia permite, tal como se describió anteriormente, una segunda rectificación o ratificación en humanos (es de aclarar que, según la información

obtenida, este permiso se dá solamente cuando se trata de inmunoglobulinas, cuya producción es muy cara, y cuando el lote en cuestión reúne todos los demás requisitos).

En los datos obtenidos por estas pruebas durante varios años, Hegedius y Benko (1977), no pudieron encontrar una correlación confiable entre la prueba de conejos y la elevación de temperatura en el hombre.

Dare y Mogy, por otro lado, reportaron un experimento -- que involucró a nueve humanos y más de 200 conejos; se basaron en los resultados obtenidos para concluir que la sensibilidad del pirógeno de Pseudomonas en conejos era de 1/3 a -- siete veces la demostrada por humanos.

La mayor parte de la literatura sobre el tema, publicada en los últimos años, menciona el trabajo de Greissman y -- Hernick (1959) como fundamental en esta cuestión. Estos autores realizaron un estudio comparativo de la reactividad pirógenica entre conejos maduros albinos y hombre adultos sanos, y reportaron los siguientes resultados:

"En una base de dosis por kilogramo de peso, el conejo y el hombre son aproximadamente igual de reactivos a cantidades umbrales de endotoxina; cuando se usan dosis altas, la relación dosis-respuesta se vuelve mucho más --

aguda en el hombre.

En una base de dosis total, los conejos requieren cantidades más pequeñas de endotoxina, para lograr dosis_umbrales febriles, pero conforme la dosis total de endotoxina aumenta, la respuesta febril en el ser humano sobrepasa rápidamente a la del conejo".

P A R T E I I

CONTRIBUCION PRACTICA

INTRODUCCION.

El postulado del que partimos para realizar este trabajo, es el de que la prueba oficial de conejos es una prueba de tipo biológico, en la que se ven involucrados múltiples factores, como en cualquier prueba de este tipo. La intensidad de la respuesta febril, puede considerarse, en última instancia, como una variable poblacional, tanto en los conejos como en los seres humanos. De esta manera, siempre se pueden presentar casos de individuos hipo o hipersensibles. Este postulado se ve reforzado por el hecho de que aproximadamente entre un 2 y un 5% de los conejos que participan en esta prueba, no responden a la acción endotóxica, es decir, dan una reacción negativa falsa (Kinheld, 1977). Incluso, algunas farmacopeias recomiendan una preprueba para descartar a los conejos hiper o hiposensibles.

La distribución en la población de una variable poblacional normalmente se ve reflejada en un bajo porcentaje de la población que presenta valores extremos, en este caso -- los individuos hipo o hipersensibles. Por otro lado, el hecho de que hasta la fecha no se haya encontrado una dosis umbral de endotoxina, es decir, una dosis mínima de endotoxina que produzca fiebre en el conejo, nos indica de la distribución de los valores "medios" de la variable en la población.

Un segundo postulado que proponemos, es el de que la -- sensibilidad del conejo a la endotoxina, es también una variable individual; es decir, la sensibilidad no es un factor que se mantenga constante en el tiempo, en un mismo individuo, y hay una diversidad de factores que pueden hacerla variar. Por ejemplo, Hegedus y Benke (1977), afirman -- que la hora del día puede significar variaciones en los incrementos de $Q_{.35}^{0}C$. Por otro lado, Marcus y Nelson (1977) reportan que:

".... los resultados se volvieron absurdos en una ocasión en que un empleado del bioterio vecino, - que despedía olores característicos de los animales que cuidaba, se quedó a platicar mientras se_ inyectaba a los conejos".

y Dressl (1977) reporta que los animales en su laboratorio_ se muestran muy inquietos con los cambios de presión atmosférica y tienden a elevar la sensibilidad de la prueba.

HIPOTESIS:

Basándonos en los postulados anteriores, y en las consideraciones enunciadas, estamos proponiendo como hipótesis, - para esta parte práctica, que existe una variación estacional en la intensidad de la respuesta febril, a lo -- largo de un año.

En el intento de probar esta hipótesis, hemos utilizado cuatro tipos de datos. Por esta razón, hemos dividido esta segunda parte en cuatro etapas, que iremos describiendo con oportunidad.

PRIMERA ETAPA:

Esta etapa representa realmente nuestra aportación experimental a la tesis, por lo que haremos una descripción detallada del método seguido para la obtención de los datos que en ella presentamos.

MATERIAL:

- 1) Ocho conejos hembras de la raza albina New Zealand.
- 2) Facilidades de estancia en bioterio, como jaulas, alimento standard, agua, servidores de esta, etc.
- 3) Cuarto de estancia pre-prueba.
- 4) Cuarto de prueba .
- 5) Ambas habitaciones (3 y 4) con controles de temperatura y humedad, y con restricción a visitas.

- 6) Termómetro manual rectal con graduación hasta de medias centésimas.
- 7) Jeringas desechables.
- 8) Solución salina inocua.
- 9) Tarjetas de registro.

METODOLOGIA

- 1) Se tomaron ocho conejos de la granja que surte a la compañía Industrias Biológicas Mexicanas para sus pruebas de control interno.
- 2) Durante un año se inyectó periódicamente a cada uno de estos conejos.
- 3) Por cada inyección se administró una dosis de 10ml. /kg. de peso, de solución salina inocua.
- 4) Para la inyección se utilizó la metodología descrita en la primera parte de este trabajo.
- 5) Durante el transcurso de las pruebas, se mantuvo la temperatura en $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, y la humedad relativa al $50 \pm 10\%$, en el cuarto de prueba y en el de pre-prueba.
- 6) Los resultados obtenidos se registraron cuidadosamente en tarjetas de registro especiales.

Los resultados obtenidos en este proceso se detallan en forma individual, es decir, por conejo, por fecha, en la tabla 1 del apéndice de datos. En la tabla 2, se muestran estos mismos resultados, pero en forma agrupada, por mes. En esta misma tabla se dan las medias y desviaciones estandard obtenidas por mes, y totales, y las frecuencias absolutas y relativas de los incrementos de temperatura.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Durante el año en que se llevó a cabo el experimento, se aplicaron 338 inyecciones en 8 conejos, y estamos asumiendo que esta cifra es estadísticamente significativa para llegar a interpretaciones confiables. Puesto que la población que interviene en toda esta parte práctica es infinita, ya que incluye a todos los conejos probados y probables en la prueba, de aquí en adelante nos referiremos a cada muestra como una población de datos.

En base a lo anterior, dimos un tratamiento estadístico a los datos obtenidos, intentando probar que existe una variación en la respuesta de los conejos a lo largo del año, y que esta variación está influenciada por la estación del año. Cabe aclarar que en este caso, con el término "estación" nos estamos refiriendo a un período relativamente largo del año, pero que no necesariamente coincide con la división común de las cuatro estaciones del año.

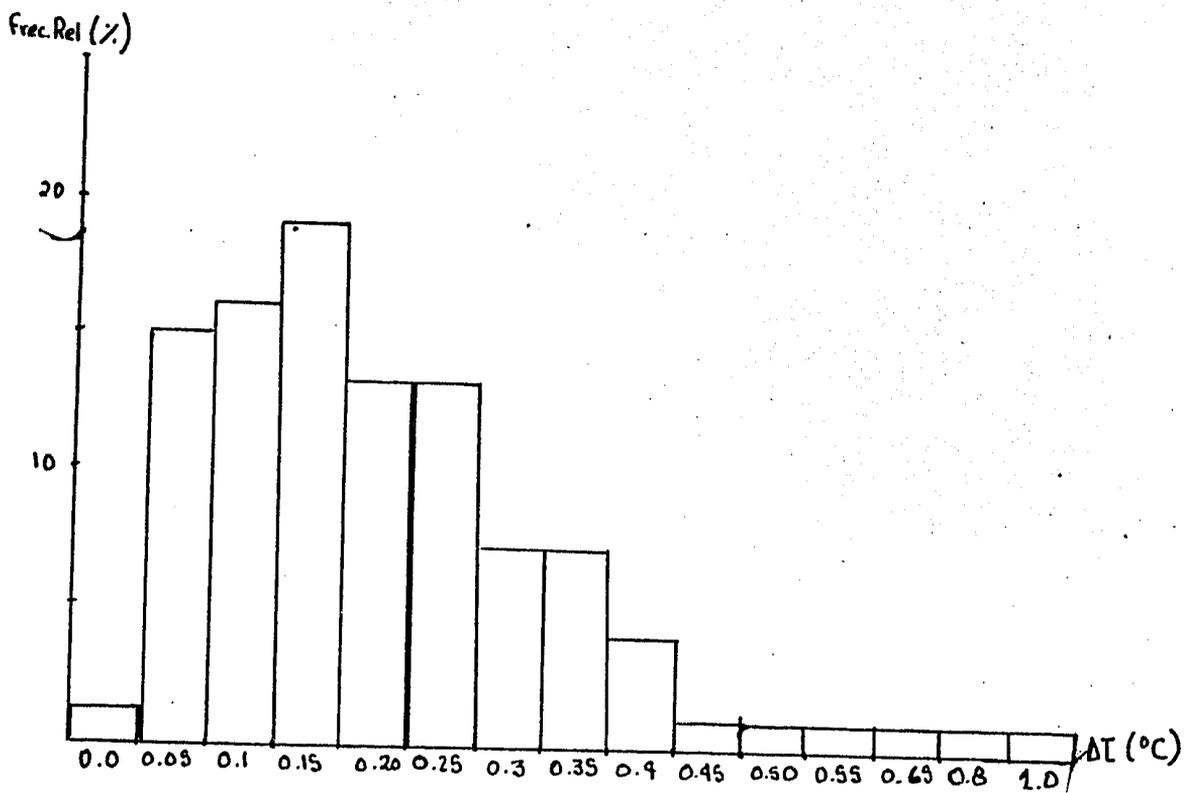
En la Gráfica 1, presentamos un histograma de frecuencias relativas de la respuesta térmica para la primera etapa. En este histograma se puede observar que existe una respuesta - térmica, consistente en un incremento leve, de aproximadamente dos décimas de centígrado como máximo, que puede considerarse debida al estres, y que esta respuesta se comporta como una variable poblacional.

La media de las 338 respuestas obtenidas es de 0.197°C , y la desviación estandard de 0.125. que es muy alta, indicando una gran dispersión de la población.

El comportamiento de cada conejo a lo largo del año, se ilustra mediante ocho gráficas, una grafica por conejo, construidas cada una con doce puntos, que corresponden a los doce meses del año, y con la media de las respuestas del conejo en ese mes (Gráficas 2-0).

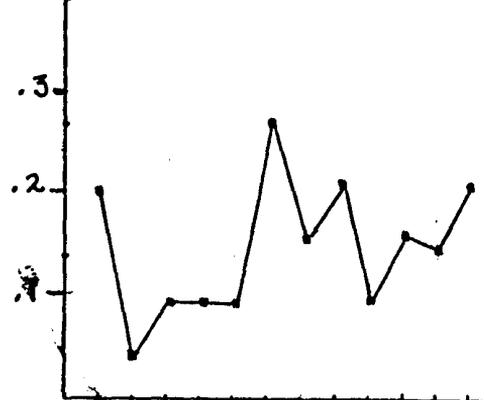
Al observar estas gráficas cuidadosamente, se puede detectar una variación pequeña que produce curvas con dos máximos y dos mínimos. Es decir, casi todas las curvas presentan un punto máximo entre mayo, junio y julio, y otro entre noviembre, diciembre y enero.

Esta tendencia en las curvas individuales se ve acentuada cuando se construye una gráfica con las medias de todas las respuestas obtenidas por mes, a lo largo del año. La gra-

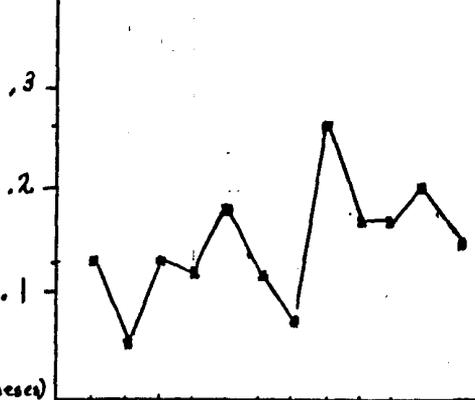


Gráfica +: Histograma de frecuencias relativas de incrementos de temperatura.

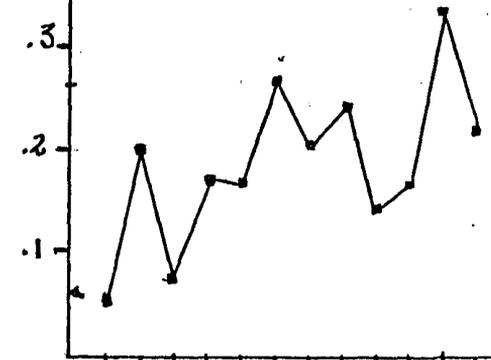
$\Delta T(^{\circ}C)$ E F M A M J J A S O N D



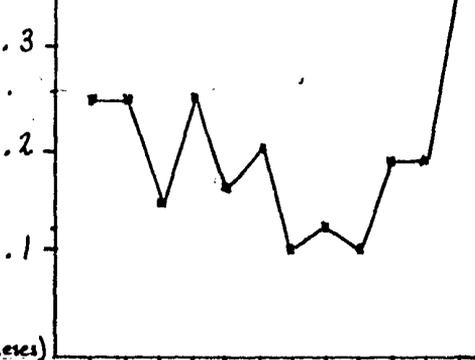
$\Delta T(^{\circ}C)$ E F M A M J J A S O N D



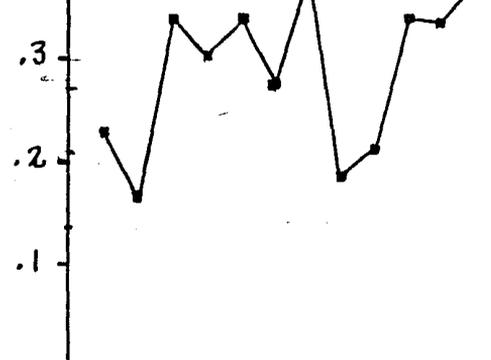
$\Delta T(^{\circ}C)$



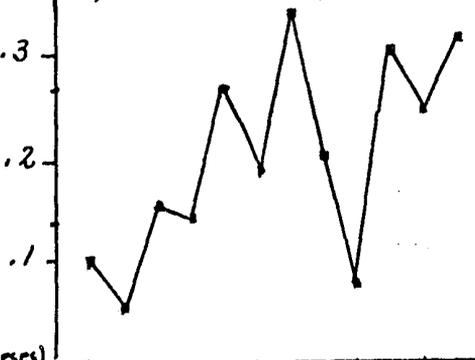
$\Delta t(^{\circ}C)$



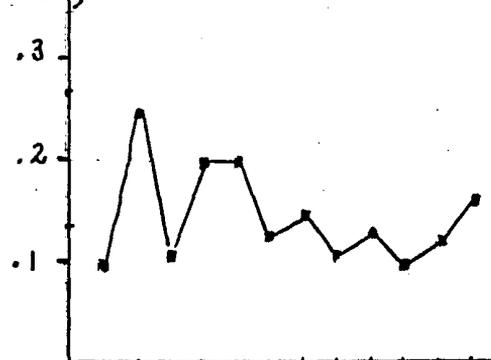
$\Delta T(^{\circ}C)$



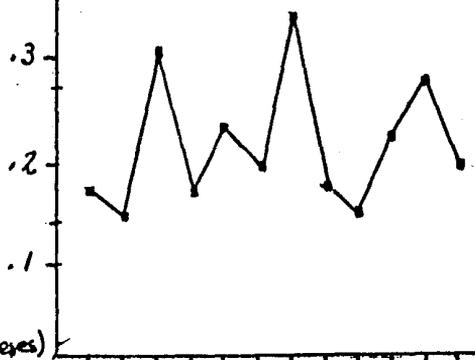
$\Delta T(^{\circ}C)$



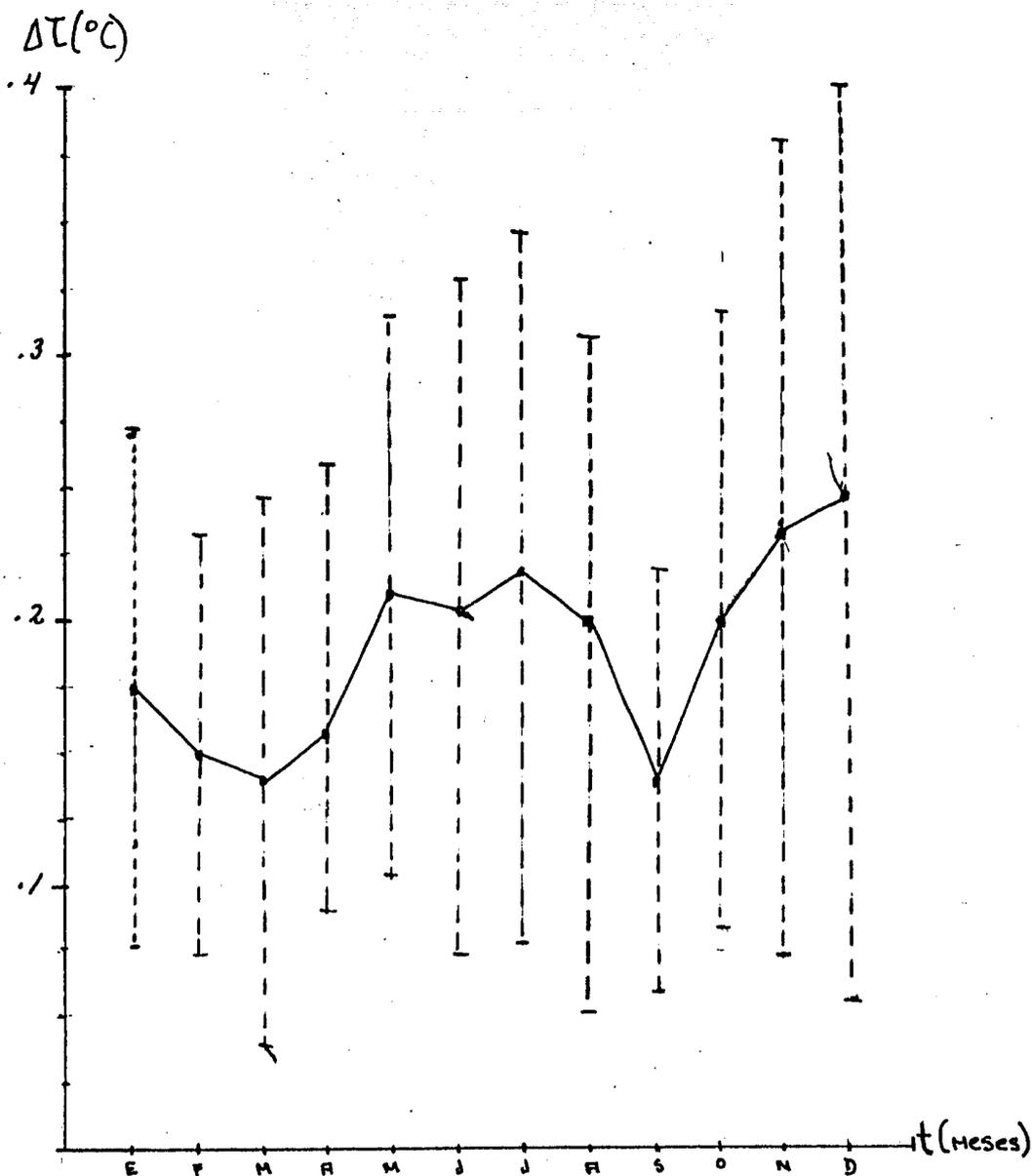
$\Delta T(^{\circ}C)$



$\Delta T(^{\circ}C)$



Graficas 2-9:



Gráfica 10: Medias de las respuestas de los ocho conejos, por mes.

----- Desviación Estándar.

fica 10 fué construida de esta manera, y en ella se muestran también las desviaciones estandard para cada media.

En esta gráfica se ven claramente definidas cuatro fases a lo largo del año. Dos altas (mayo, junio y julio; y noviembre, diciembre y enero), y dos bajas (febrero, marzo, y abril; abril; y agosto, septiembre y octubre).

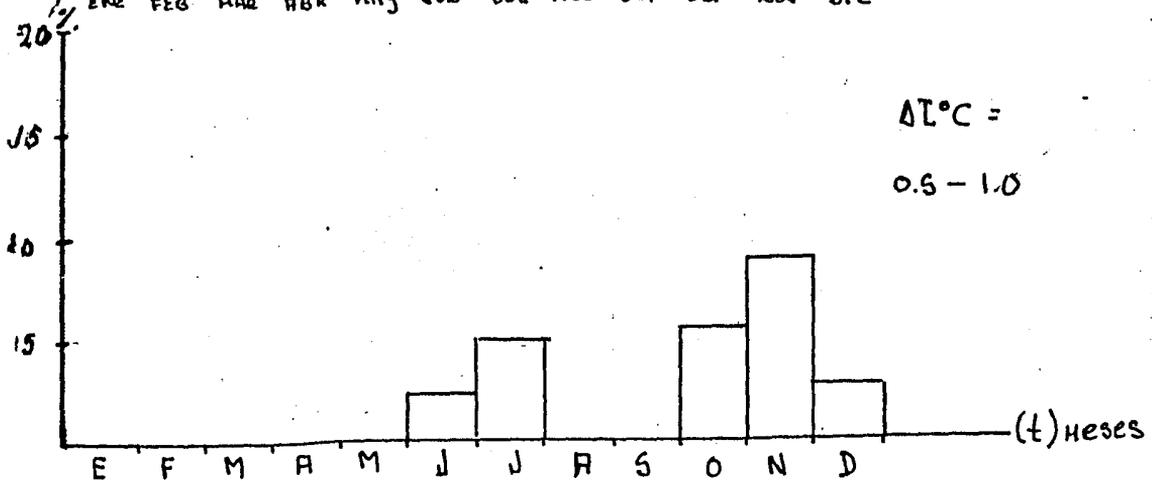
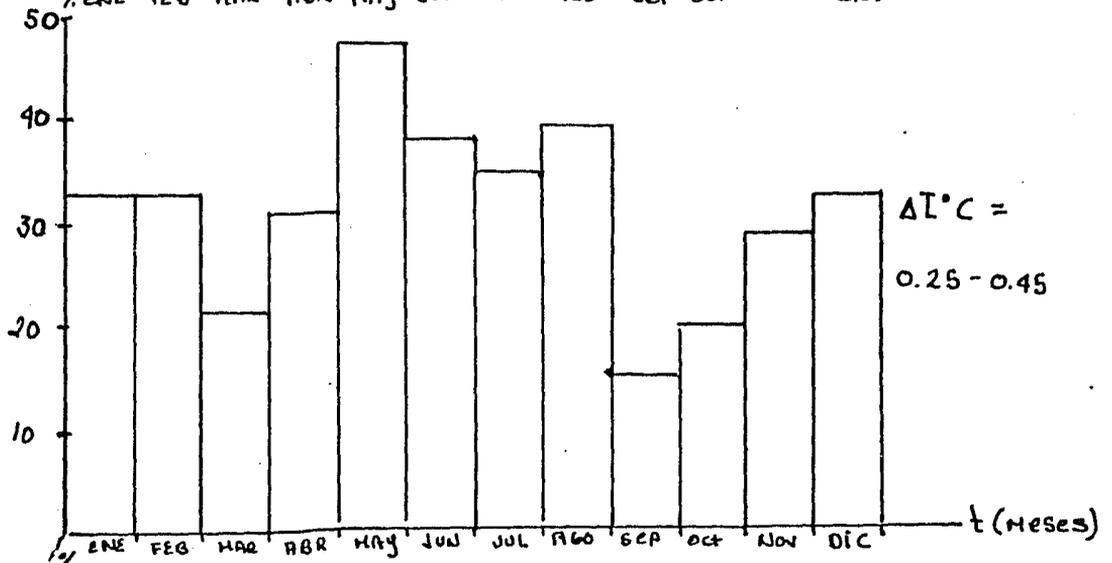
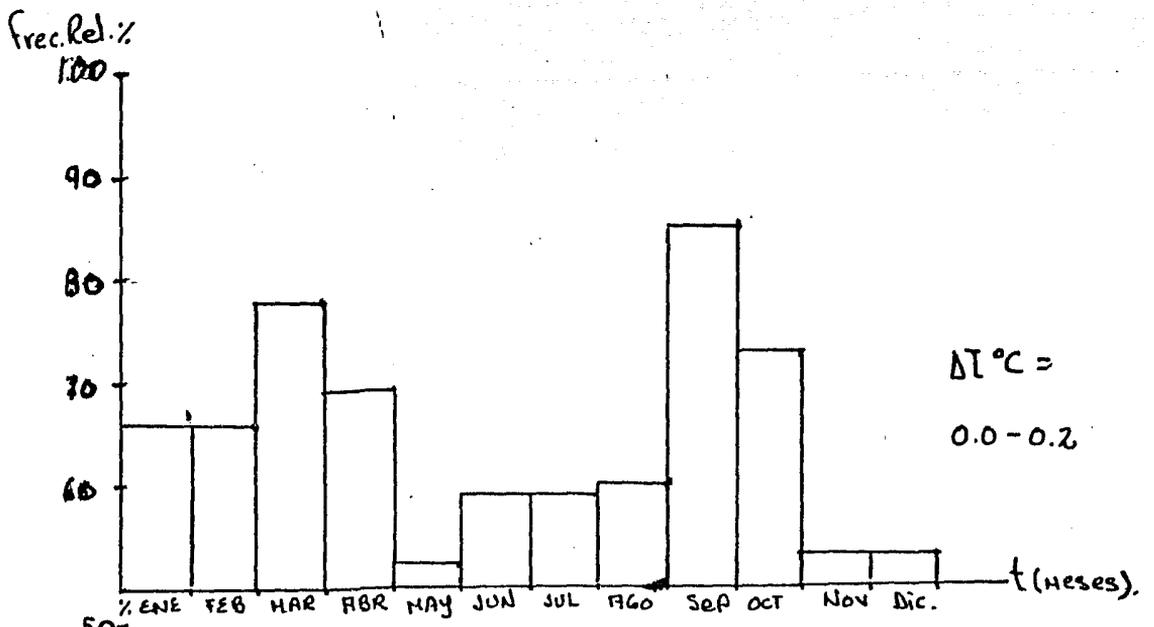
Esta observación nos lleva a dos interrogantes:

- 1) ¿Qué parte de la población está contribuyendo a la formación de una curva con estas características?
- 2) ¿Qué tratamiento estadístico podríamos utilizar para establecer el grado de confiabilidad que tiene esta división de la curva en cuatro períodos?

Para contestar la primera pregunta, dividimos el intervalo en el que se presentan las distintas respuestas en tres grupos:

- 1) de 0.0 a 0.2
- 2) de 0.25 a 0.45
- 3) de 0.5 en adelante.

Aunque a primera vista esta puede parecer una división arbitraria, no deja de reflejar una división natural. Podría ser un equivalente a clasificar a los conejos como "hiposensibles", "sensibles", e "hipersensibles". Esta clasificación se ve reforzada por el hecho de que un incremento de 0.6°C . o mayor en la prueba, según la prescripción oficial, se considera positivo, y de que incrementos de 0.3°C y 0.4°C . contribuyen con frecuencia a dar resultados positivos, en pruebas reales.



Gráficas 11-13: Comportamiento de los tres intervalos de respuesta a lo largo de un año.

De cualquier modo, esta división tiene la oportunidad de probar ser bondadosa en el curso de los cálculos.

En las tablas 3 y 4, en el apéndice, se muestran las frecuencias absolutas y relativas, correspondientes a cada uno de los intervalos, a lo largo de los meses del año. Con la frecuencia relativa de cada intervalo, se construyeron las gráficas 12, 13 y 14, que demuestran que la división de las tres categorías propuestas refleja, en realidad, una proporción sistemática de las respuestas.

Por otro lado, la distribución de las frecuencias relativas de los intervalos de respuesta, nos proporciona una visión sobre la parte de la población que está contribuyendo a las variaciones periódicas de las respuestas.

Un incremento en la media de las respuestas de la población puede deberse a dos situaciones: En la primera, una proporción baja de la población responde con incrementos muy altos, hipersensibles, y en la segunda, una proporción relativamente alta de la población, responde con incrementos medios. Cada uno de estos eventos se ve reflejado de inmediato en la desviación estándar.

Al observar los datos de frecuencias relativas, veremos que en los meses "bajos", la frecuencia del intervalo de 0.25 a 0.45, va de 20 a 39%, mientras que en los meses "altos", su frecuencia oscila entre 33 y 46%.

Las frecuencias del intervalo de respuesta hipersensible

(de 0.5 en adelante), siguen este mismo patrón con cuatro fases, pero son mucho más bajas.

El comportamiento de dos climax mostrado por la curva de medias, está determinado, entonces, por una proporción relativamente alta de la población respondiendo con incrementos medios, y una proporción baja de la población respondiendo con incrementos altos.

Este hecho explica también el comportamiento de la desviación estandar, que es más alta en los meses "altos" en donde las respuestas se alejan de la media, y más baja en los meses "bajos", donde las respuestas se acercan a la media.

Existe, además, un instrumento estadístico que puede decirnos algo más acerca de la periodicidad en la variación de las respuestas. Este instrumento es la prueba de "ji cuadrada", χ^2 , un índice de diferencia entre poblaciones y de relación entre dos factores, basado primordialmente en la probabilidad de que una respuesta se presente en una población.

El índice de χ^2 , entonces, se obtiene para apoyar una de dos alternativas: La primera, llamada hipótesis nula, es que no existe ninguna relación entre dos factores de una población, es decir, que estos dos factores son independientes; y la segunda, llamada hipótesis alternativa, que estos dos factores se comportan de forma dependiente en la población.

En nuestro caso, estos dos factores serían, por un lado, el incremento en la temperatura, y por el otro, el tiempo, en un lapso de un año. En los términos del índice de χ^2 la hipótesis nula es que no existe ninguna relación entre la respuesta y la estación del año, y la hipótesis alternativa es que sí existe una relación.

Comparemos entonces, cuatro partes de la población, una por estación, para determinar si hay una diferencia sistemática en las frecuencias de los tres intervalos de respuesta planteados anteriormente. De no existir una relación sistemática entre estos dos factores, las frecuencias deben distribuirse en forma asaroz a través de los cuatro intervalos de tiempo. Si esta relación existe, las proporciones variarán sistemáticamente a través de los cuatro intervalos de tiempo.

Para calcular el valor de χ^2 , construimos una tabla de contingencia, como la que se muestra en la figura 5, con las frecuencias observadas de cada intervalo de incremento de temperatura, en cada estación del año; La estación 1 corresponde a los meses de febrero, marzo y abril; mayo, junio y julio a agosto, septiembre y octubre a la 3 y noviembre, diciembre y enero a la 4.

Con los datos de esta tabla calculamos las frecuencias esperadas, con las que construimos otra tabla de contingencia. A partir de estas dos tablas, obtenemos el valor de χ^2 mediante la fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

donde O es la frecuencia observada en cada intervalo de temperatura, en cada estación del año, y E es la frecuencia esperada de ese mismo evento.

El cálculo para este índice se muestra en la tabla 5 del apéndice, y resulta ser de 10.397.

Este valor debe compararse con el valor crítico, obtenido de tablas especiales, como la que se muestra en el apéndice como tabla 8. En nuestro caso, para seis grados de libertad y con una confiabilidad del 90%, este valor es de 10.6.

El valor obtenido resulta estar cerca del valor crítico, lo que nos indica una diferencia sistemática de estos cuatro grupos.

Comparemos, además, con este mismo índice, las dos poblaciones de las estaciones altas, por un lado, y las dos de las estaciones bajas, por otro. El cálculo de estos valores se muestra en la tabla 7 del apéndice. Los valores obtenidos

para χ^2 en estos dos cálculos, son:

- a) 2-4 (Nov-dic-ene, mayo-jun-jul) ----- $\chi^2 = 1.13$
 b) 1-3 (Feb-mar-abr, ago-sep-oct) ----- $\chi^2 = 0.56$

El valor crítico de χ^2 en este caso, para dos grados de libertad, con una confiabilidad del 90%, es de 4.605. En ambos casos, este valor es mucho más alto que el vaor obtenido, lo que nos indica una diferencia muy baja en la distribución de las frecuencias de las respuestas, entre las dos poblaciones.

Si seguimos el mismo porcedimiento, comparando poblaciones contrarias, es decir, una alta y una baja, individualmente, obtenemos los siguientes valores para χ^2 :

- 4-2 (nov-dic-ene, feb-mar-abr) ----- $\chi^2 = 4.32$
 1-2 (feb-mar-abr, mayo-jun-jul) ----- $\chi^2 = 5.64$
 2-3 (may-jun-jul, ago-sep-oct) ----- $\chi^2 = 5.12$

Así, cuando se están comparando las frecuencias de las respuestas en estaciones "contrarias", los valores de χ^2 obtenidos son más altos.

Estamos, entonces, en posición de concluir que esta primera etapa nos proporciona evidencia de que en la intensidad de la respuesta térmica interviene, como un factor consistente, la estación del año.

Sin embargo, hay que tener presente que estos datos provienen de ocho conejos solamente. Tendríamos que repetir este experimento muchas veces, de forma que llegáramos a tener una muestra más representativa, lo que resultaría un proceso muy costoso. Sin embargo, la industria farmacéutica puede proporcionarnos datos mucho más amplios.

SEGUNDA ETAPA:

Los productores de medicamentos parenterales son los principales interesados en un trabajo de este tipo, porque representa un progreso en sus controles internos de calidad, que en muchos casos involucran la prueba oficial en conejos para la detección de pirógenos.

Varias de estas compañías productoras de medicamentos nos permitieron analizar los datos de sus archivos. Entre ellas está la compañía Cutter de México, S.A.

El primer conjunto de datos que analizaremos, de esta compañía, proviene de una muestra de 553 conejos, que fueron inyectados con una solución salina inocua, como parte de la preprueba de selección que se realiza rutinariamente en la compañía mencionada.

La diferencia entre esta etapa y la anterior, radica en que, en la primera, ocho conejos fueron inyectados un número de veces a lo largo de un año, mientras que ahora estaremos analizando datos de 553 conejos que fueron inyectados una sola vez, en 26 fechas del año.

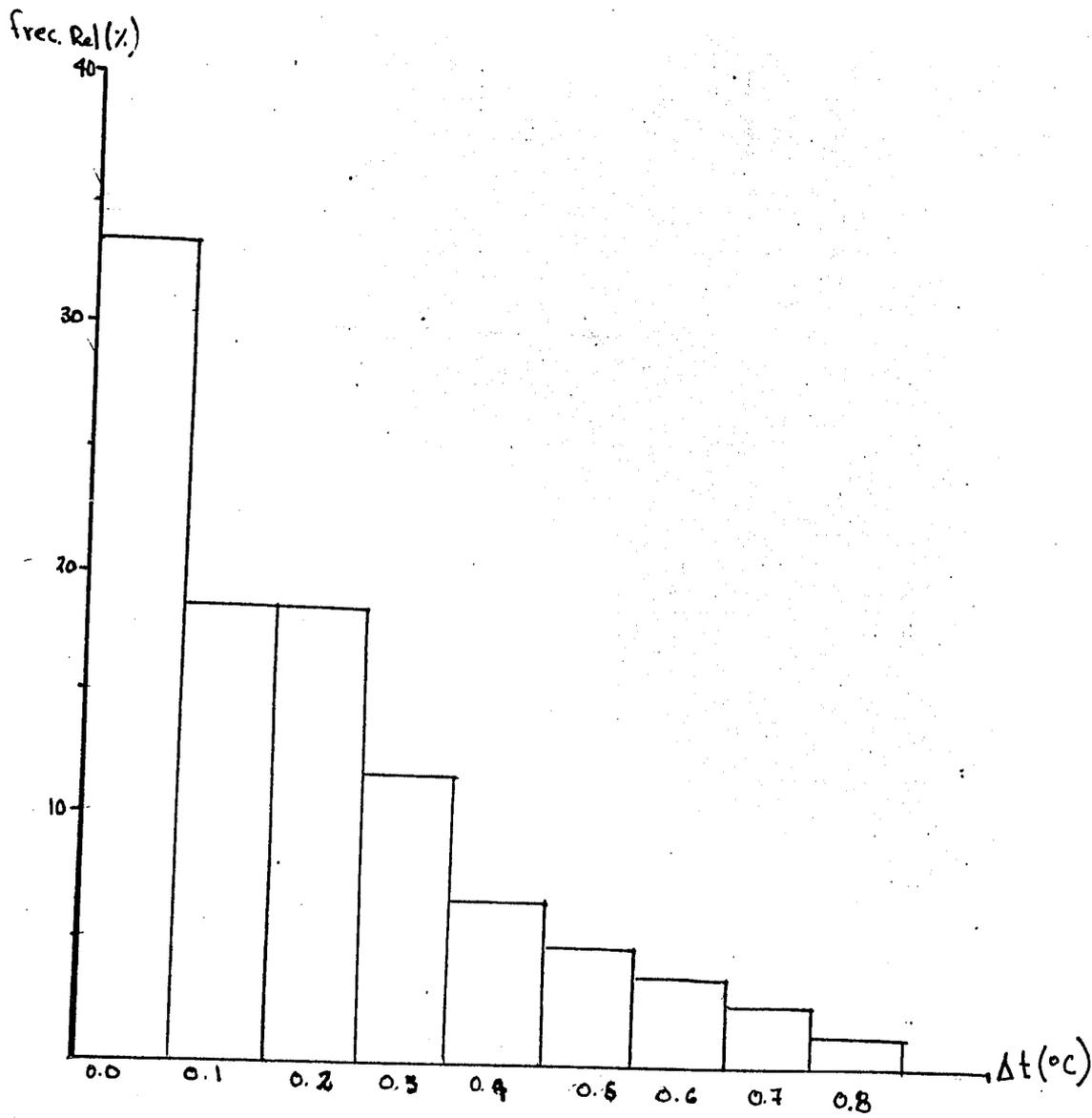
Los datos de esta etapa se presentan en forma agrupada en la tabla 9 del apéndice de datos, en donde también se incluye la media de los incrementos para cada fecha, con su respectiva desviación estandard, y las frecuencias absolutas y relativas de cada incremento.

Con las frecuencias relativas, construimos el histograma que se muestra en la gráfica 14, y con las medias y las desviaciones estandard en cada fecha, construimos la gráfica 15 que aparecen en la siguiente hoja.

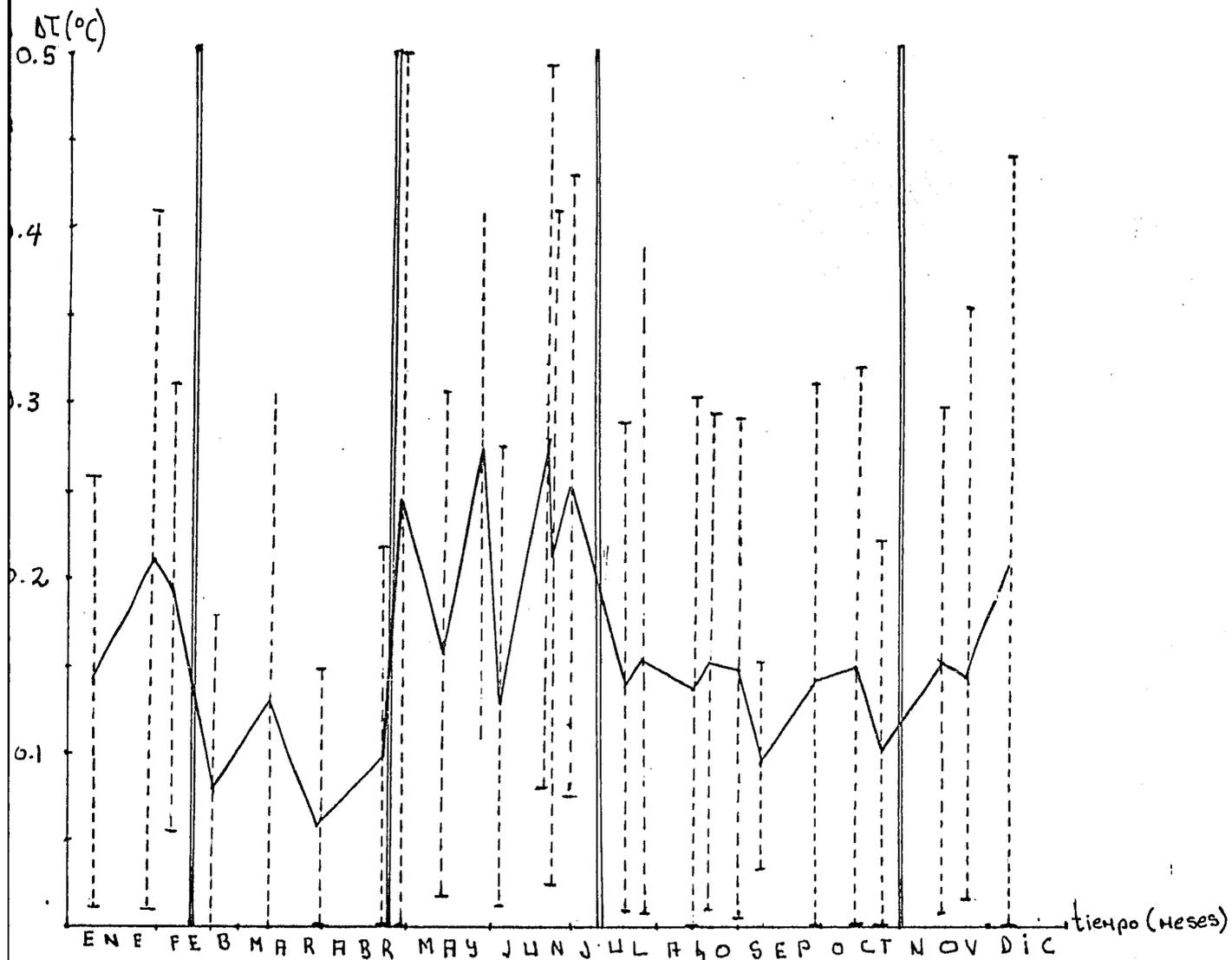
A pesar de que en esta etapa el comportamiento de la curva es menos estable (tal vez porque tenemos más puntos), aún pueden diferenciarse los cuatro períodos o estaciones detectados en la primera etapa. Dos estaciones altas, de mediados de abril a fines de julio, y de mediados de octubre a fin de enero, y dos estaciones bajas, de principios de febrero a mediados de abril, y de principios de agosto a mediados de octubre.

Agrupamos, entonces, las respuestas en tres categorías, de la misma forma que lo hicimos en la etapa anterior: "hiposensible" de 0.0 a 0.2°C ; "media" de 0.3 a 0.5°C ; y "Hipersensible", de 0.6°C , en adelante, y calculamos las frecuencias absolutas y relativas de cada grupo, para saber la proporción de la población que interviene en la forma de la curva de medias obtenida arriba.

Los valores obtenidos de estas frecuencias se muestran en la tabla 10 del apéndice de datos, y con ellos construimos los histogramas que se presentan en las gráficas 16, 17, y 18.

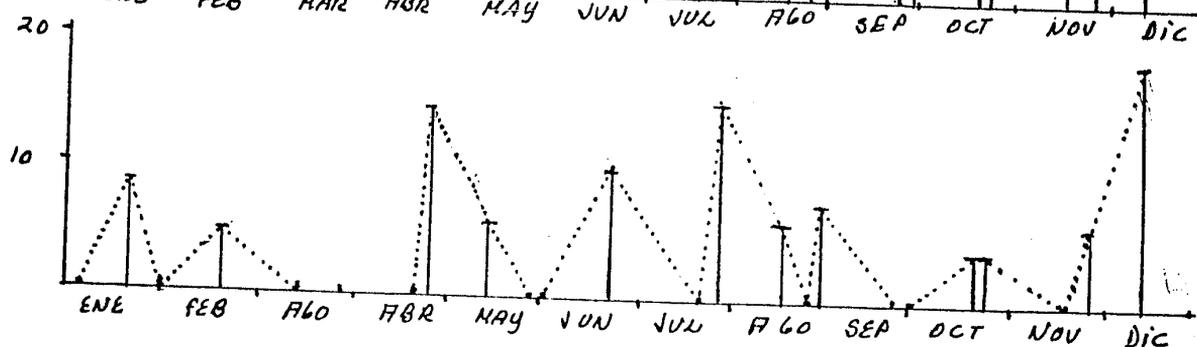
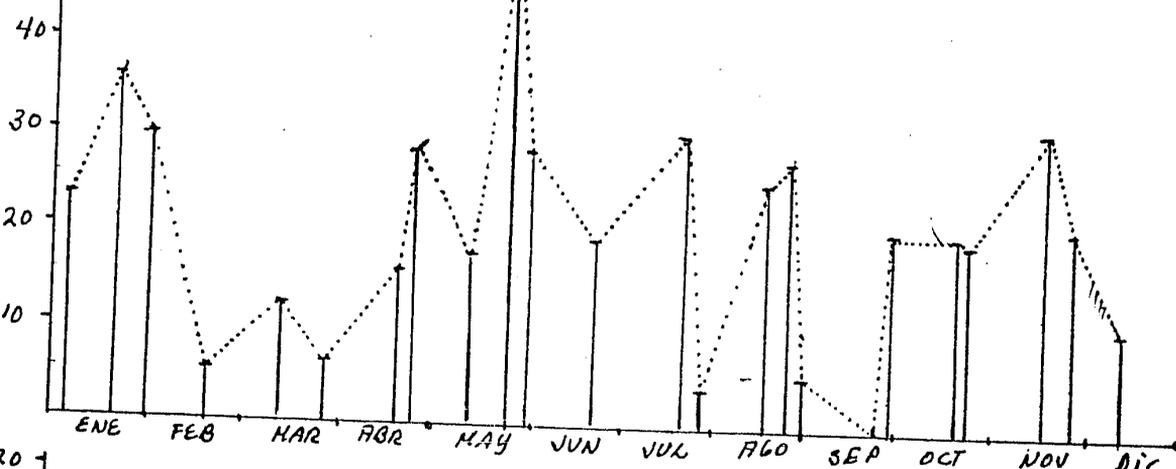
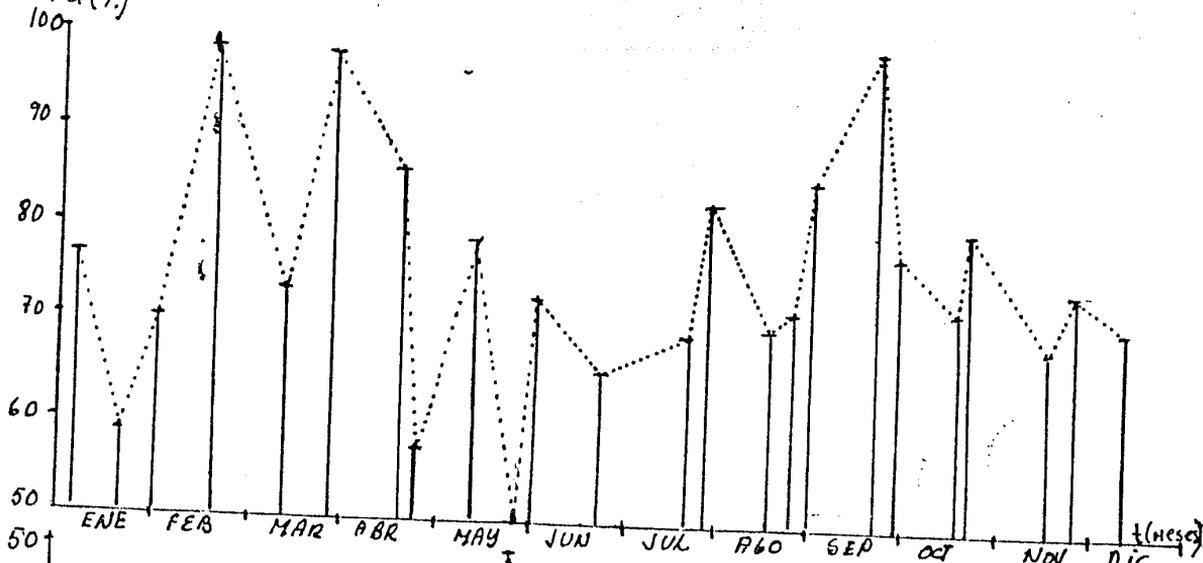


Gráfica 14: Histograma de Frecuencias Relativas de los incrementos de temperatura en la segunda etapa.



Gráfica 15: Curva de medias (y desviaciones estándar) de incremento de temperatura en la segunda etapa.

Frec. Rel (%)



Gráficas 16-18: Histogramas de frecuencia relativa de los tres intervalos de respuesta a lo largo del año, en la segunda etapa.

en donde puede verse que en este caso, los incrementos en -- las medias son debidos a incrementos en las dos categorías - "baja" y "media", aún cuando la categoría "media" interviene con mayor proporción, lo que sigue apoyando la hipótesis de_ que la variación estacional en la intensidad de la respuesta febril alcanza a una proporción relativamente grande de la- población..

Para asegurarnos de que el efecto observado es estadísti_ camente significativo, aplicamos, igual que en la etapa ante_ rior, una prueba de χ^2 con la que comparamos las cuatro po_ blaciones indicadas en la gráfica de medias. El cálculo del valor de χ^2 se muestra en la tabla 11 del apéndice. El va_ lor crítico de χ es el mismo que en la etpa anterior, para - seis grados de libertad y una confiabilidad de 90% es de - - 10.6

El valor obtenido, 26.98, está muy por encima del valor_ crítico, lo que nos indica una dependencia entre el incremen_ to de temperatura y la estación del año.

De la misma manera que en la etapa anterior, hacemos -- una comparación entre las poblaciones "altas", por un lado, y las "bajas" por el otro. El cálculo de estos valores se --- muestra en la tabla 12 del apéndice. Los valores obtenidos_ para son los siguientes:

a) 1-3 (nov.-dic.-ene., mayo-jun.-jul.) ----- $\chi^2 = 2.112$

b) 2-4 (feb.-mar.-abr., ago.-sept.-oct.) ---- $\chi^2 = 4.31$

De la misma forma que en la etapa anterior, estos valores resultan estar muy por debajo del nivel crítico, que es de 4.6 para dos grados de confiabilidad, y una confiabilidad de 90%, lo que nos indica un alto grado de homogeneidad entre las dos poblaciones comparadas.

Por otro lado, cuando comparamos poblaciones "contrarias" este índice se presenta mucho más alto, el cálculo de estos valores se presenta en la tabla 13 del apéndice, y son los siguientes:

a) 1-2 (Nov.-dic.-ene., feb.-mar.-abr.) ----- $\chi^2 = 11.89$

b) 2-3 (Feb.-mar.-abr., mayo-jun.-jul.) ----- $\chi^2 = 20.8$

c) 3-4 (mayo-jun.-jul., ago.-sept.-oct.)----- $\chi^2 = 12.26$

Estos valores se encuentran por encima del nivel crítico de χ^2 lo que nos indica que estamos tratando con poblaciones distintas respecto del factor tiempo. En especial cabe observar que la diferencia mayor se presenta entre la estación "baja" de feb.-mar.-abr. y la estación "alta" de mayo-jun.-jul.

Hasta ahora, entonces, hemos intentado demostrar que -- existe una variación en la intensidad de la respuesta térmi

ca con respecto a la estación del año. Sin embargo, estos dos conjuntos de datos se obtuvieron, no en pruebas reales, sino en pruebas en donde se inyectó solución salina inocua, es decir, que se sabe que no contiene sustancias pirogénicas. Los resultados anteriormente expuestos, nos ilustran entonces, sobre una respuesta térmica no relacionada con endotoxinas, es decir, con la pirogenicidad de la sustancia inyectada.

La siguiente interrogante que nos planteamos es en qué medida esta variación podría influenciar los resultados de las pruebas reales?

TERCERA ETAPA:

Todos los conejos que fueron sometidos a la preprueba de la etapa anterior, en donde se les inyectó solución salina inocua, y no resultaron ser hipersensibles, se usaron para pruebas reales, es decir, para probar lotes de medicamentos parenterales hemoderivados, y detectar contaminación endotóxica en ellos.

Los resultados obtenidos en estas pruebas, nos fueron proporcionados por la misma compañía. Estos datos se muestran en forma agrupada en la tabla 14 del apéndice. En esta tabla se agruparon los datos por incrementos de temperatura en cinco categorías:

a) de 0.0 a 0.2

b) de 0.3 a 0.5

c) de 0.6 a 0.7

d) de 0.8 a 0.9

e) de 1.0 en adelante,

y por meses del año, respecto del ~~factor~~ tiempo. La subdivisión de los incrementos más allá de 0.6°C . en tres intervalos se hizo con el propósito de detectar frecuencias en niveles de "respuesta pirogénica baja", "respuesta pirogénica media" y "respuesta pirogénica alta".

También en la tabla MA se muestran las frecuencias absolutas y relativas totales de los diferentes intervalos de incremento de temperatura, que dan un total de 1,121 inyecciones en el año. Además, se proporciona el número de inyecciones por mes, y el incremento medio mostrado por los conejos, por mes también.

En esta misma tabla se proporciona otro cuadro con las frecuencias relativas de cada uno de los intervalos de incremento de temperatura, por mes, a lo largo del año.

Con estos datos construimos el histograma que se muestra a continuación:

Frec. Rel (%)

100

80

60

40

20

0.0-0.2

0.3-0.5

0.6-0.7

0.8-0.9

1.0 →

ΔT (°C)

Gráfica 19: Histograma de frecuencias relativas de los incrementos de temperatura en la tercera etapa.

ΔT (°C)

0.5

0.4

0.3

0.2

0.1

E

F

M

A

M

J

J

A

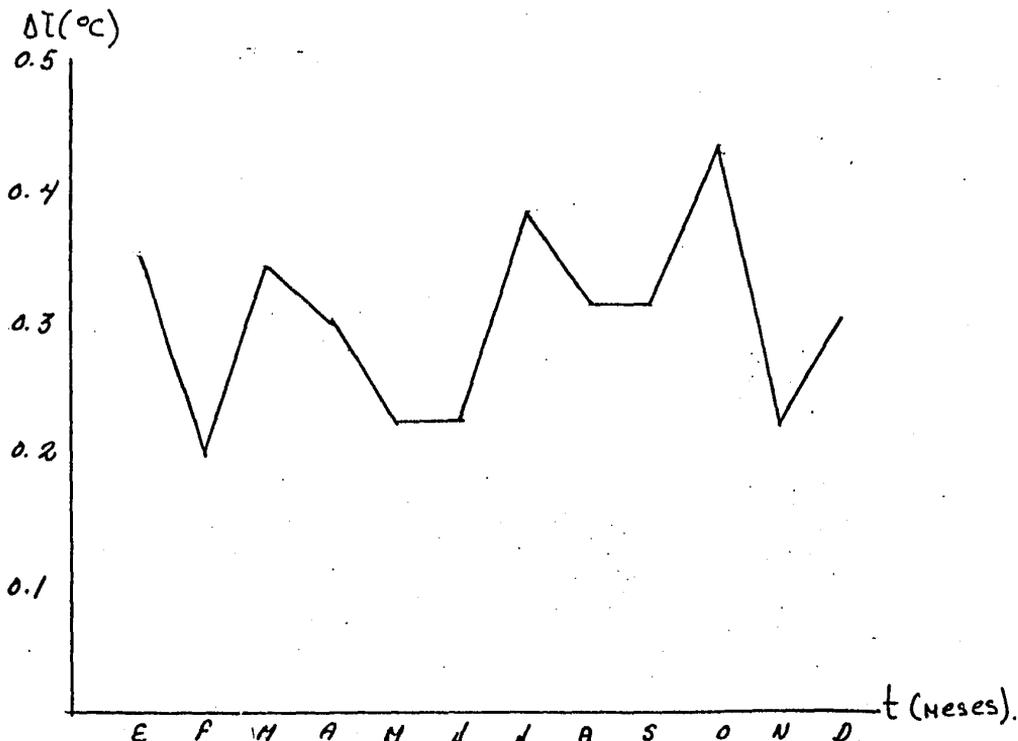
S

O

N

D

t (meses)



Gráfica 20: Medias de los incrementos de temperatura por mes en la tercera etapa.

Este histograma tiene una forma bastante semejante a los contruidos con las frecuencias de las poblaciones anteriores, excepto porque presenta una frecuencia mayor en incrementos altos, lo que es coherente con el hecho de que estos datos incluyen respuestas pirogénicas reales.

De aquí que nos vemos forzados a considerar, en este caso, el hecho de que las respuestas pirogénicas pueden deberse, por un lado, a una contaminación real de la solución, o, por otro, a una hipersensibilidad del conejo.

El primer factor, es decir, la contaminación real de la solución que se está probando, es un factor fuera de control, azaroso, para los términos de la prueba. Este hecho se ve reflejado en la curva que presentamos en la gráfica 20, construida con las medias de las respuestas por meses, a lo largo de doce meses, y sus desviaciones estándar.

Esta curva se nos presenta en una forma tal, que el efecto detectado en las dos etapas anteriores, ha desaparecido por completo, resultado de que la pirogenicidad de la solución es un factor azaroso, que se sobrepone al factor "estacional" en los incrementos de temperatura.

En un intento para detectar una variación estacional en esta etapa, trazamos las gráficas 21-26, con las frecuencias

01

cada intervalo de incremento; los datos para estas gráficas se muestran en la tabla 14 del apéndice de datos.

Sin embargo, en estas gráficas, tampoco nos es posible detectar una variación estacional como la que se detectó en etapas anteriores.

Debemos concluir, entonces, que con los datos de esta etapa, nos ha sido imposible detectar en qué medida esta variación estacional en la intensidad de la respuesta térmica, influye en los resultados de la prueba real.

Sin embargo, esta etapa nos sirve para plantearnos una problemática que se refiere en concreto a los datos, es decir, para plantearnos ¿qué tipo de datos tendríamos que utilizar para controlar, de alguna manera, el factor de pirogenicidad. La posibilidad existe, ya que hay en el mercado soluciones standard de endotoxina, pero resulta estar fuera de nuestro alcance, por su costo, y por el tiempo que requeriría obtener este tipo de datos.

CUARTA ETAPA:

Pero existe una posibilidad alternativa para obtener ciertos datos que podrían servirnos para los fines descritos arriba.

La situación que nos proporciona esta posibilidad implica, en primer lugar, el control del medio ambiente en el -- que se desarrollan los conejos, es decir, las condiciones

de control ambiental en el bioterio. Dentro de estas condiciones podemos incluir la temperatura ambiental, la humedad relativa del ambiente, el fotoperíodo, la libertad de movimiento, el grado de encierro del bioterio, etc.

La implicación que estas condiciones tienen sobre los objetivos del presente trabajo, son claras. La "estación" del año es un concepto, de alguna manera subjetivo, que podría definirse como la variación periódica sistemática, de ciertos componentes del clima, a lo largo del año.

En cierta medida, en un nivel más particular, lo que estamos intentando probar en este trabajo, es que esta variación periódica y sistemática del clima afecta a los seres vivos de forma que estos "adoptan" o se adaptan a estos patrones, respondiendo a ciertos estímulos de manera distinta en cada época o estación del año, en este caso particular, estamos considerando la respuesta térmica.

La interrogante que nos estamos planteando en esta etapa, es en consecuencia, qué sucede con la respuesta térmica de los conejos, cuando una población de estos se ve sujeta a un control de las condiciones ambientales tal, que éstas dejan de mostrar una variación periódica a lo largo del año.

La compañía Hyland Laboratories, Inc., Travenol Division,

tiene en sus laboratorios de Los Angeles, California, un bioterio con una población muy grande de conejos, en donde se controla muy estrictamente las diversas condiciones en las que esta población de conejos se desarrolla. En particular, la temperatura del bioterio se mantiene en los $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$., la humedad relativa se mantiene en un nivel de $50 \pm 10\%$, e incluso el fotoperíodo es de 12 hrs.luz, 12 oscuridad, a lo largo del año. Es decir, que efectivamente, tenemos una población de conejos que no está sometida a las variaciones ambientales estacionales del año.

Los conejos de este bioterio se utilizan para detectar contaminación endotóxica en lotes de medicamentos parenterales, producidos por la misma compañía, es decir en pruebas reales.

La compañía mencionada, tiene dos filiales: Travenol, N.V. en Bruselas, Bélgica, y Laboratorios Dr. Zapata, S.A., en México, que tienen sus propios bioterios, con sus condiciones particulares, y producen sus propios conejos, con los que realizan sus pruebas de contaminación endotóxica. El hecho importante es que en los tres laboratorios se prueban los mismos lotes de medicamentos. De modo que tenemos tres tipos de resultados, para cada lote.

El bioterio de Travenol, N.V., en Bélgica, está menos con

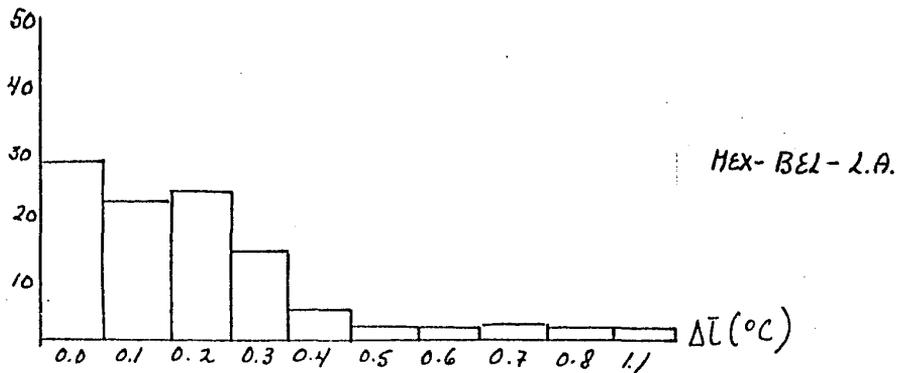
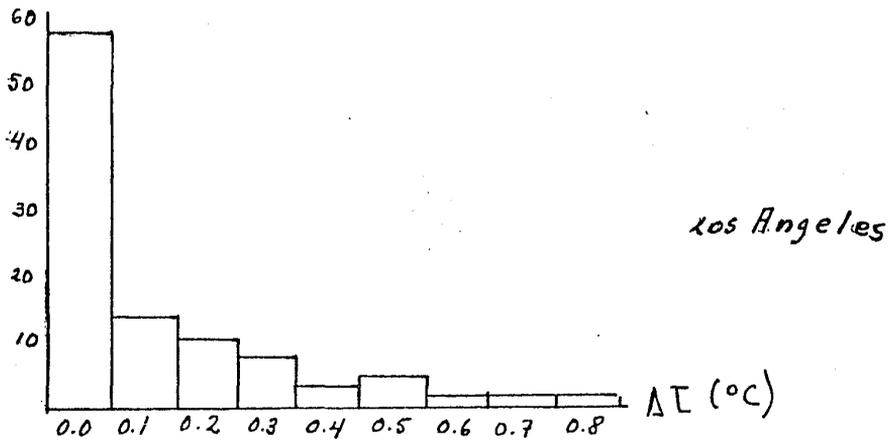
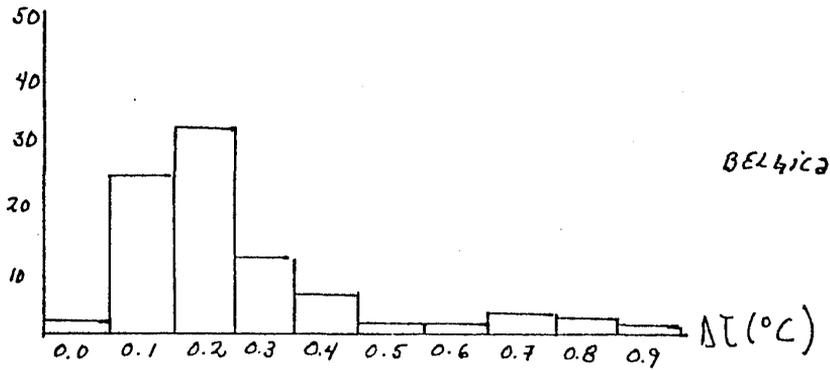
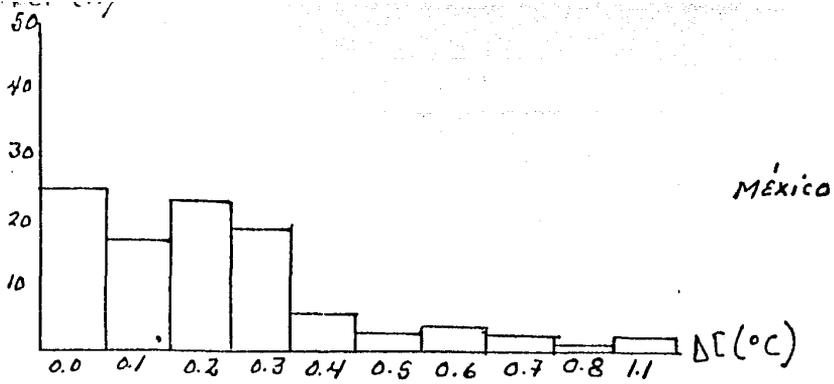
trolado que el de Los Angeles. Sin embargo, se debe tener un control más o menos estricto de la temperatura, que en este país puede llegar a ser muy baja. El bioterio cuenta, por esto, con un sistema de calefacción, pero no tiene un control muy riguroso sobre la temperatura ambiental en el bioterio.

El bioterio de los laboratorios Dr. Zapata, en México, es el que menos tiene control sobre las condiciones ambientales, de los tres, tal vez debido al hecho de que México tiene condiciones climáticas mucho menos adversas, y no se hace necesario un control de la temperatura o de la humedad relativa.

En resumen, pues, tenemos un conjunto de datos reales, que provienen de lotes de medicamentos parenterales probados en tres poblaciones de conejos que se encuentran bajo condiciones ambientales distintas, y, en cierta medida, graduadas.

Los datos obtenidos de esta manera, se muestran en la tabla 15 del apéndice.

En estos datos se puede observar de inmediato una frecuencia de temperaturas bajas mucho más acentuada en el laboratorio de Los Angeles, que en los otros dos. Este efecto puede observarse más claramente cuando construimos los histogramas respectivos a los tres grupos, que se muestran en seguida, con



Gráficas 27-30: Histogramas de frecuencias relativas de los incrementos de temperatura en las poblaciones de la 4a. etapa/

el histograma general para los tres grupos.

En estos histogramas se representan las frecuencias de los distintos incrementos de temperatura obtenidos. Curiosamente, el histograma que proviene de los datos del laboratorio en México, es el que más se asemeja a la distribución general de frecuencias. Esto nos indica, de alguna manera, que la población de conejos en México adopta una distribución de frecuencias más "natural" que las otras dos. Por otro lado, el histograma construido con los datos del laboratorio de Bélgica, presenta una distribución en donde el modo se ve desplazado más hacia la media, es decir, en donde la frecuencia más alta se presenta en 0.1°C . de incremento de temperatura.

Y, en tercer lugar, tenemos el histograma construido con los datos del laboratorio de Los Angeles, en donde el modo se ha visto fuertemente desplazado hacia la izquierda, con una frecuencia altísima en 0.0°C . de incremento de temperatura, y con una casilla menos de ancho. Este efecto sobrepasa con mucho nuestras predicciones y fué una gran sorpresa observarlo tan claramente; la implicación es obvia: estos conejos, que se desarrollan bajo condiciones tan controladas como las descritas para el laboratorio de Los Angeles, muestran en cierta medida, una capacidad más baja de respuesta térmica.

Para asegurarnos de que esta diferencia no es debida exclusivamente al azar, sino que el medio ambiente en el que se desarrollan los conejos es un factor que influye consistentemente en las distintas poblaciones, comparamos los tres grupos de datos por medio de la prueba de χ^2 . El cálculo de

este valor se muestra en la tabla 20 y es de 31.16. El valor crítico de χ^2 para 8 grados de libertad y 90% de confiabilidad es de 13.4. No hay duda, pues, de que existe una diferencia sistemática entre las tres poblaciones. Cabe entonces, - averiguar cual de estas tres poblaciones es la que está contribuyendo en mayor grado a esta gran diferencia. Para ello, formamos tres pares de grupos que comparamos con el índice de χ^2 , México-Bélgica; México-Los Angeles, y Bélgica-Los Angeles.

El valor crítico para χ^2 , en los tres casos es el mismo, - para cuatro grados de libertad, con una confiabilidad de 90%, el valor de χ^2 es de 7.78.

El cálculo de χ^2 obtenido para estos tres valores se muestra en la tabla 21 y fue de:

México-Bélgica	-----	χ^2	= 2.81
México-Los Angeles	-----	χ^2	= 17.82
Bélgica-Los Angeles	-----	χ^2	= 28.27

De estos valores se deduce que las poblaciones de México y -- Bélgica, no presentan una diferencia sistemática significativa, mientras que la población de Los Angeles es mucho muy distinta. Lo que nos confirma el postulado anterior de que la diferencia es debida a las distintas condiciones ambientales en - las que se desarrollan los tres grupos de conejos.

Cabe aclarar que estos datos no son todo lo representativo

que hubieseamos deseado, principalmente por la irregularidad - de los períodos en que se realizaron las pruebas, mientras que no se realizó ninguna prueba en julio, se realizaron seis en mayo.

Sin embargo, intentaremos hacer una interpretación, hasta cierto punto, subjetiva, de los resultados una vez que hemos podido sejar sentada una baja capacidad en términos generales, de los conejos de Los Ángeles para responder térmicamente.

En primer lugar, de los 26 lotes probados, hay solamente un caso en el que se puede afirmar con seguridad, que el lote estaba contaminado con pirógenos y éste es el lote 26, probado en el mes de diciembre.

Al referirnos a los resultados correspondientes a este lote, veremos que, aun cuando la pirogenicidad de este lote es evidente, la respuesta febril de los conejos de Los Angeles - fue mucho más baja que la de los conejos de los otros dos laboratorios. La media de las 25 respuestas obtenidas para este lote, considerando los tres laboratorios en conjunto, y por laboratorio, se muestra en la tabla 19, junto con estos cálculos para todos los lotes considerados en esta etapa, y las varianzas para cada media.

Los valores obtenidos para las medias son:

México-Bélgica-Los Angeles ----- 0.63

México	-----	0.63
Bélgica	-----	0.77
Los Angeles	-----	0.35

Las varianzas (s^2) para estas medias son las más altas obtenidas de todos los lotes. Para la media de las tres poblaciones es de 0.117, lo que corresponde a una desviación standard (s) de 0.342.

Este lote fue probado en diciembre, más quedó considerado dentro de la época "alta" de invierno, en las etapas anteriores. Si los conejos de Los Angeles no están sujetos a una variación estacional, y los conejos de Bélgica y México si lo están, podemos decir que la variación estacional contribuye aproximadamente con 0.2 a 0.3 C. en el incremento de temperatura de la respuesta térmica, que está de acuerdo con las etapas anteriores, y con la desviación standard que se presenta en este grupo de respuestas; aunque es necesario tener en cuenta que este parámetro resume también la variación individual en la intensidad de la respuesta.

Consideremos ahora el lote 8, probado a finales de abril. Este lote se probó en 19 conejos; 8 en México, 3 en Bélgica y 8 en Los Angeles.

En un principio, parecería que estos datos contradicen --

nuestras proposiciones anteriores. El lote probó estar contaminado solo en México y en Los Angeles. Sin embargo, los valores de las varianzas obtenidas, combinando los tres paires de poblaciones que ya hemos combinado antes:

	\bar{X}	s^2		\bar{X}	s^2
México -----	0.33	0.022	Mex.-Bel.	0.28	0.021
Bélgica -----	0.18	0.007	Mex.-L.A.	0.29	0.041
Los Angeles	0.25	0.062	Bel.-L.A.	0.23	0.041

muestran que las varianzas siguen siendo mayores cuando se incluyen los resultados de Los Angeles, y menores cuando se compara a México con Bélgica.

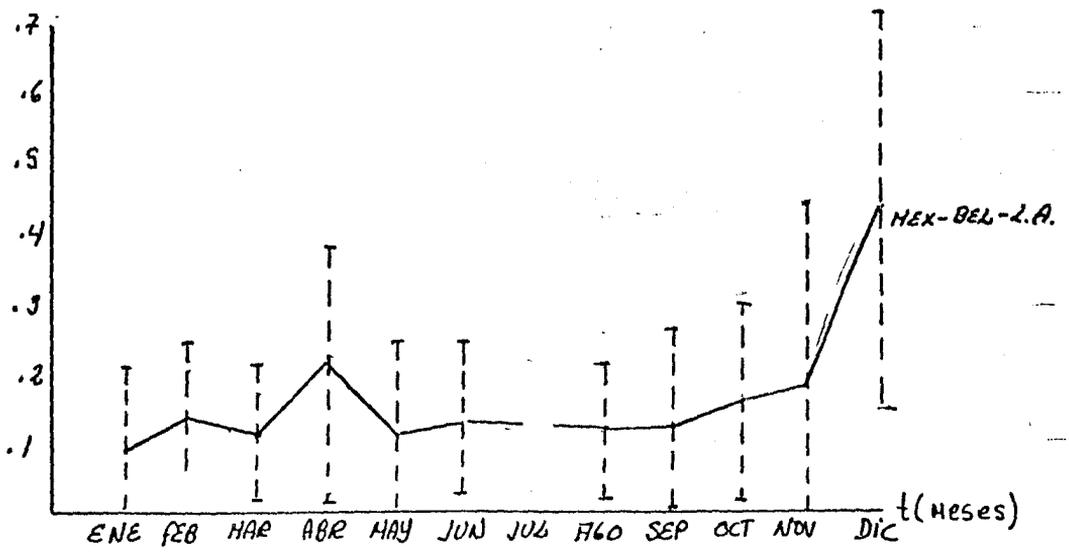
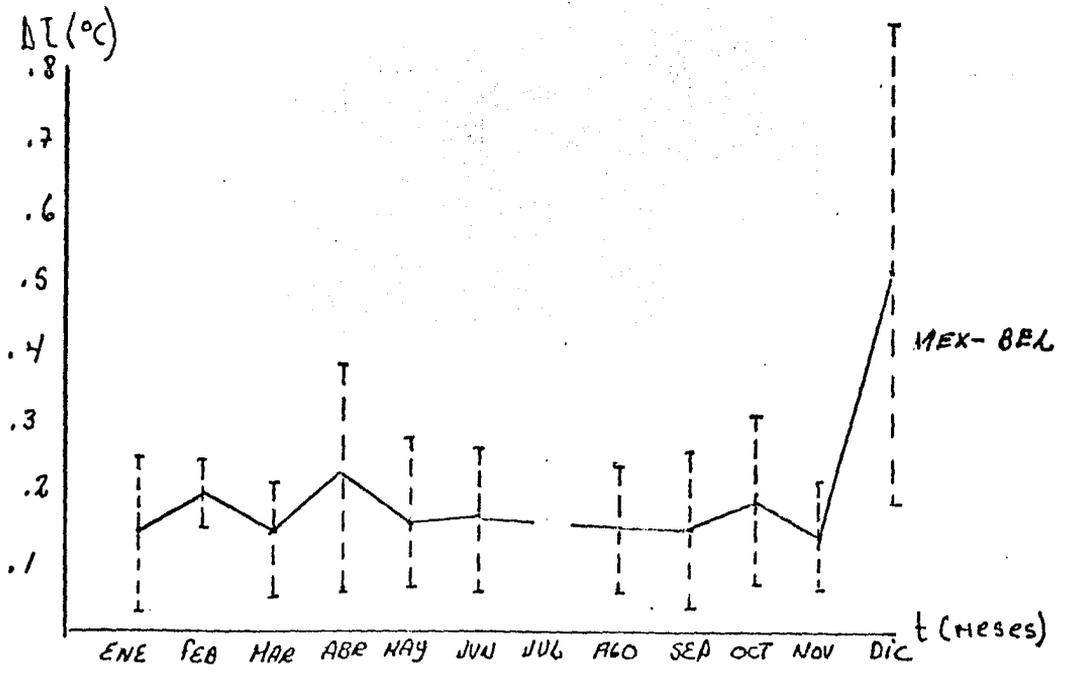
La fecha en la que se probó este lote, finales de abril, también se encuentra dentro de el período "alto" de verano, descrito en las etapas anteriores. Incluso, en la segunda etapa, la media de los incrementos de temperatura, el 23 de abril, fue de 0.242 C. después de inyectar a 14 conejos con solución salina inocua, es decir, no pirogénica. Hay que -- añadir a esto, el hecho de que las respuestas en general son altas, pero no pirogénicas. Es decir, solamente 3 de los 19 conejos respondieron por encima del nivel crítico que han fijado la mayor parte de las farmacopeias. Digamos que un laboratorista se vería en serios problemas para aprobar o rechazar este lote.

Todos los demás lotes pasaron la prueba sin problemas implicando la inyección de 227 conejos, sin contar los que se

usaron para probar los lotes 8 y 26. De estos 227 conejos, solamente cinco mostraron incrementos inopinados de 0.5 C.o más, que representa el 2.2% de la población y que puede explicarse con la variación individual en la sensibilidad de los conejos, de la que hablamos al principio de esta segunda parte. Construimos, entonces, las gráficas que se muestran en la siguiente hoja, con las medias de los incrementos obtenidos con los dos lotes problemáticos, descritos anteriormente.

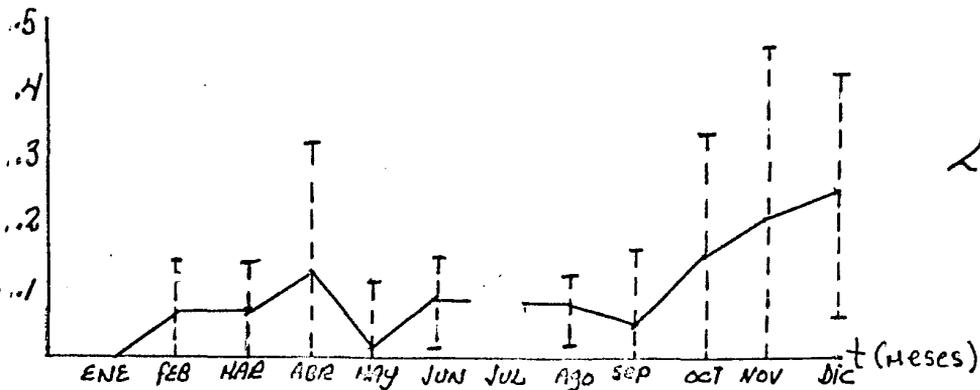
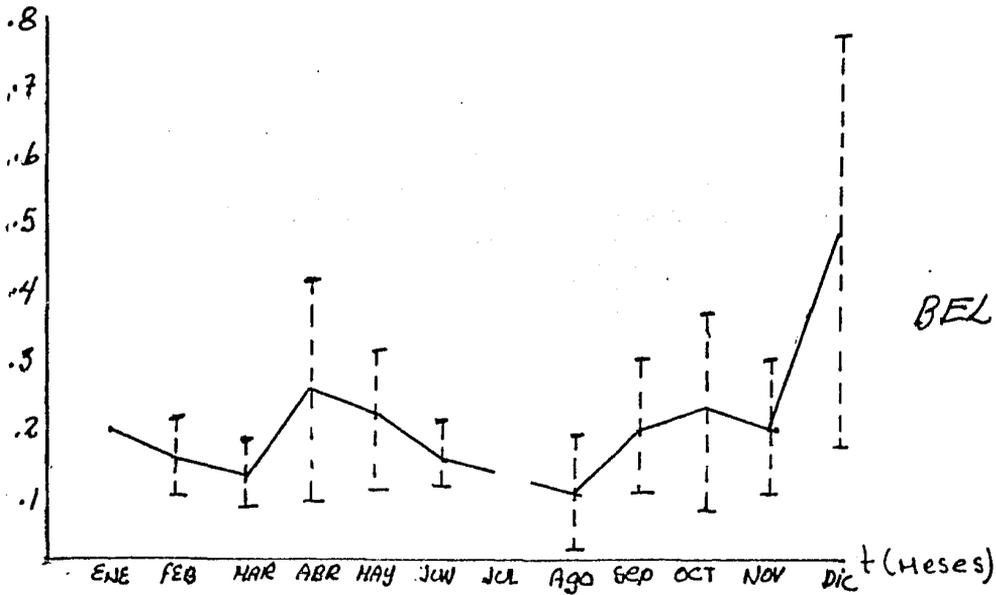
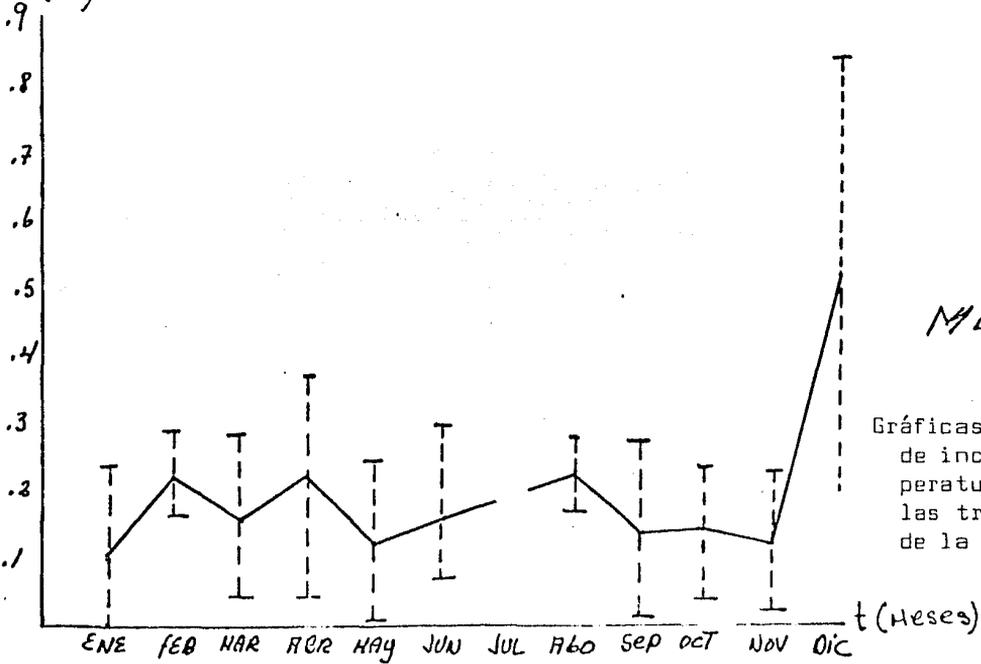
En la primera y segunda gráfica, se muestra el comportamiento de las medias por mes, a lo largo del año, para los datos de México y Bélgica, respectivamente, y en las que se detectan las dos fases altas y las dos bajas, como sucedió en las dos primeras etapas; un hecho importante es que estas fases no coinciden en las dos gráficas, lo que interpretamos como una demostración de que este ritmo anual bifásico en la intensidad de la respuesta, no viene fijado al nacimiento, sino que es producto de variaciones particulares en el medio ambiente, que fácilmente pueden no ser las mismas en México y en Bélgica.

La curva obtenida para los datos de Los Angeles, ilustra todavía más la poca capacidad de respuesta de los conejos de este laboratorio y la ausencia de una periodicidad en la intensidad de esta respuesta. No creemos que este fenómeno --



Gráficas 34 y 35: Medias de incrementos de temperatura por mes, combinando las poblaciones de la cuarta etapa.

$\Delta T(^{\circ}C)$



pueda demostrarse más claramente. Las dos curvas que siguen, fueron construidas, la primera, con los datos de los tres laboratorios en conjunto, y la segunda con los datos de los laboratorios de México y Bélgica en conjunto.

En primer lugar, se puede ver que la inclusión de los datos de Los Angeles, solo tiene el efecto de "bajar" la curva un poco en el cuadrante. Por lo demás, las dos curvas son - muy semejantes.

En segundo lugar, se puede ver que, al combinarse los datos de México y Bélgica, el efecto de periodicidad se anula; esto es debido al hecho de que las fases no son sincrónicas, como ya dijimos antes.

DISCUSION.

En estas cuatro etapas de trabajo práctico y de gabinete, los hechos generales fueron:

- 1) La intensidad de la respuesta térmica en los grupos se -- comporta como una variable poblacional, con una gran parte de la población respondiendo con incrementos de 0.0 a 0.2 C. y una parte cada vez más pequeña de la población respondiendo con incrementos más altos.
- 2) Existe una variación en la intensidad de la respuesta tér-

mica en un mismo individuo, a través del tiempo que está determinada, entre otros factores, por la estación del año.

3) La variación estacional en la intensidad de la respuesta térmica es de aproximadamente 0.2 a 0.3^oC.

4) Este efecto se ve anulado cuando los conejos se ven sometidos en su desarrollo, a condiciones ambientales en donde no se permite una variación estacional.

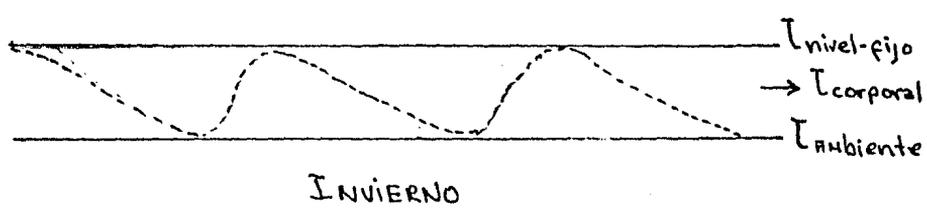
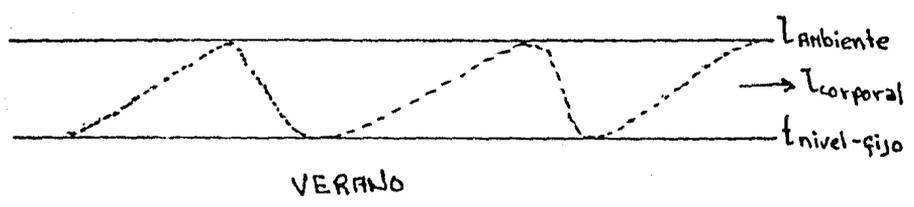
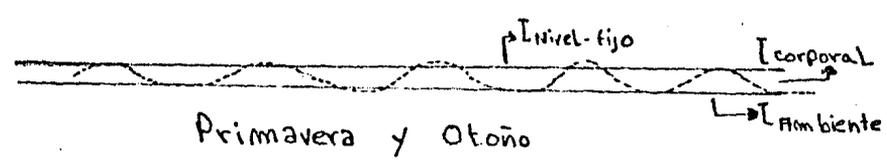
Si nuestras observaciones son aceptables, cabría preguntarse cómo es que la variación periódica de condiciones ambientales, particularmente la temperatura, se traduce en una variación periódica en la intensidad de la respuesta térmica de los conejos.

Es de notarse que los períodos altos, es decir, cuando los conejos se comportan de manera, por así decirlo, hipersensible, corresponden más o menos con el verano y el invierno del año, y es claro que en estas estaciones del año, normalmente la temperatura ambiental es menos favorable que en primavera y en otoño. Por lo tanto, en verano y en invierno, la maquinaria termoreguladora de un organismo endotérmico, está más activa.

Este hecho puede explicarse más claramente utilizando la teoría del Nivel-Fijo, expuesta en la primera parte de este trabajo. Consideremos que, cuando la temperatura ambiental coincide o está cercana a la temperatura del Nivel-Fijo, el organismo no tiene que realizar gran esfuerzo para controlar su temperatura corporal y las oscilaciones de la temperatura corporal son muy pequeñas y amplias. Mientras más se aleja la temperatura ambiental de la del Nivel-Fijo, mayor es la longitud de las oscila-

ciones de la temperatura corporal, y menor su amplitud.

En la figura se muestra esquemáticamente este fenómeno, es decir, cómo las oscilaciones de temperatura son más notorias en invierno y en verano, que en primavera y en otoño.



Este fenómeno puede muy bien explicar el hecho de que el conejo esté más "dispuesto" a responder más intensamente en Verano y - en Invierno, que en Primavera y Otoño. Incluso el efecto estacional es mayor en Verano, como se demostró en las dos primeras etapas, ya que el organismo, aparte de tener su mecanismo termo regulador activo, este se encuentra intentando bajar la temperatura, que es alta en el ambiente. Podemos decir incluso, que - los conejos que viven en el bioterio del laboratorio de Los Angeles, viven en una especie de Primavera eterna y perfecta, y por lo tanto, su disposición para responder térmicamente se ha visto muy reducida. ¿Como están implicados estos juicios con la práctica oficial para la detección de pirógenos?.

Es un hecho que la prueba, tal y como se prescribe, es una prueba de tipo biológico, con todas las desventajas que esto representa.

Las compañías farmacéuticas y las farmacopeias se han esforzado mucho para standarizar el protocolo de forma que se controle el mayor número de variables: el alimento, la dosis, el peso, el sexo, la hora del día, las visitas, la temperatura, y - la humedad durante la prueba, etc. Sin embargo, cabe preguntarse si un control tan estricto de las condiciones del medio ambiente, como el que se realiza en el bioterio de Los Angeles, no será más bien contraproducente, ya que, de alguna manera, reduce la capacidad de respuesta de los conejos. Por otro lado, de

no ejercer ese control tan estricto, hemos visto que entonces el conejo puede producir una respuesta positiva o negativa -- falsa, debido a la variación estacional en las condiciones -- del ambiente a las que se ve sometido.

Tendríamos que recapacitar mucho, también, sobre el hecho de que la prueba tiene la misma validez, aún cuando se realiza en conejos que se desarrollan en condiciones tan distintas_ en el ambiente.

APENDICE

TABLA 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRIMERA ETAPA
EXPRESADOS EN INCREMENTO DE TEMPERATURA (°C) POR FECHA, POR CONEJO

		C O N E J O							
F E C H A		1	2	3	4	5	6	7	8
E	11					0.25	0.35		
	12			0.15				0.10	0.25
N	15				0.10				
	17					0.05	0.30		
E	18			0.30				0.10	0.10
	26					0.10	0.10		
R	29			0.35				0.10	
	30		0.05						
D	31	0.20		0.15					
		0.20	0.05	0.22	0.10	0.13	0.25	0.10	0.175
F	3					0.05			
	13						0.25		
E	14		0.25	0.20					
	22	0.05	0.15	0.15	0.25		0.25	0.05	0.15
B	27					0.05			
		0.05	0.10	0.15	0.25	0.05	0.25	0.05	0.15
M	1					0.15	0.20		
	2	0.10	0.05	0.30	0.10			0.10	0.25
	14					0.20	0.10	0.20	
	15								0.35
A	19	0.10	0.15		0.15				
	28					0.05	0.15		
R	29	0.10	0.05	0.40				0.20	0.35
	30				0.10				
		0.10	0.05	0.35	0.10	0.05	0.15	0.16	0.316
A	5					0.15	0.25		
	6			0.25				0.20	0.05
B	10	0.15	0.25						
	11				0.15				
	20								
	24	0.05	0.10		0.25				
R	25			0.35		0.10		0.10	0.30
		0.10	0.15	0.35	0.25	0.125	0.25	0.15	0.175
M	4	0.05							
	7						0.15		
	8			0.35		0.15		0.25	0.25
	9		0.05		0.35				
A	18					0.10	0.25	0.10	0.25
	19	0.15	0.25		0.25				
	20			0.35					
	23	0.20	0.30		0.05	0.35	0.15	0.35	0.35
Y	26					0.15	0.15		
	28	0.15	0.10		0.15			0.40	0.30
	31			0.40		0.15	0.10		0.05
		0.12	0.15	0.36	0.20	0.18	0.16	0.275	0.24

C O N E J O

F E C H A		1	2	3	4	5	6	7	8
J	1	0.25	0.10		0.10				
	3		0.10				0.35		
	4								0.35
	5	0.35		0.30	0.15				
	6							0.25	
	9			0.20		0.05	0.15	0.15	0.05
U	11	0.05	0.25		0.05				
	18			0.35		0.20	0.05	0.20	0.25
	19	0.45	0.65		0.35				
	23				0.10	0.15		0.20	0.30
	25			0.15		0.10		0.10	
	26								0.05
N	27				0.05		0.25		
	29			0.40		0.10		0.25	

.275 .295 .28 .13 .12 .2 .191 .2

J	2								0.35
	5	0.30	0.40				0.05	0.40	
	6			0.55		0.05			0.35
	9				0.15				0.35
	11						0.10		
	12	0.15	0.20		0.10				
U	18	0.10	0.15		0.15		0.10		
	21						0.15		
	23			0.25		0.15		0.35	0.20
	24	0.20	0.25		0.25				
	25						0.10		
	26					0.05		0.40	0.55
L	27	0.05	0.05		0.05				
	31							0.30	

.16 .21 .4 .14 .083 .1 .362 .36

A	1	0.45	0.30	0.20	0.10	0.25	0.25		
	3							0.10	
	6			0.10		0.40	0.05		0.15
	7		0.35		0.05				
	8	0.05							
G	9						0.05		
	10			0.35				0.25	
	15					0.30			0.10
	16		0.20		0.15				
	21	0.15		0.15				0.30	
D	22				0.15	0.15	0.15		0.30
	23		0.15						
	28							0.30	
	31			0.15		0.25			0.20

.216 .25 .19 .112 .027 .125 .212 .187

C O N E J O

F F C H A		1	2	3	4	5	6	7	8
S	3	0.15	0.15						
	4						0.20		
	5								0.05
	7	0.10	0.15	0.35	0.05	0.20			
	13						0.05		
	14			0.15		0.20		0.10	0.15
	17	0.15	0.25		0.10				
E	19			0.05		0.10	0.05	0.00	0.10
	20	0.05	0.05		0.15				
	26						0.20		
P	27	0.05	0.20	0.30	0.25	0.20		0.05	0.30
		.11	.16	.212	.137	.175	.1	.087	.15
O	5			0.15		0.20	0.25	0.20	0.20
	8	0.20	0.20		0.05				
	15						0.25		
	16			0.40		0.20		0.20	
	18	0.05	0.20		0.15				0.30
C	24	0.30	0.15	0.55	0.05	0.15	0.05	0.55	0.15
	29						0.20		
	30	0.10	0.15		0.15	0.15			0.30
		.112	.175	.26	.1	.125	.187	.316	.237
N	1			0.15					
	2					0.20			0.25
	3		0.10						
	5	0.10			0.20				
	7					0.15	0.25	0.15	
	8	0.30		0.40	0.20				0.25
	13		0.80			0.30	0.10	0.10	0.30
	14	0.10			0.10				
	15			0.40					
	23	0.05		0.35	0.05	0.10	0.25	0.25	0.30
V	28						0.15		
	29	0.15		0.50	0.05	0.25		0.50	0.30
	30		0.15						
		.114	.25	.36	.12	.2	.187	.25	.28
D	1					0.20			
	3						0.35		0.20
	4		0.10		0.40				
	5	0.25							
	6								0.25
	7		0.25	0.40	0.05	0.15	0.20		
	8	0.10							
	10								0.05
	13	0.35	0.30		0.20	0.10	1.00	0.25	
	19	0.20	0.25		0.10	0.10		0.40	0.25
C	28	0.10			0.05	0.15			0.25
		.2	.225	.4	.16	.14	.516	.325	.2

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	F.A.	F.R.
0.00									1				1	
0.05	2	4	3	2	4	7	6	4	9	4	3	3	51	
0.10	7		7	4	4	7	5	4	5	1	7	6	57	
0.15	2	3	4	4	9	5	6	9	7	8	6	2	65	
0.20	1	1	4	1	1	4	3	3	6	9	3	5	41	
0.25	2	4	1	3	6	6	3	4	2	2	6	7	46	
0.30	2		1	1	2	2	2	5	2	3	5	1	26	
0.35	2		2	1	6	6	4	2	1		1	2	26	
0.40			1		2	2	3	1		1	2	3	14	
0.45								1					2	
0.50											2		2	
0.55							2			2			4	
0.65						1							1	
0.80											1		1	
1.00												1	1	
n	18	12	23	16	34	39	34	33	33	30	36	30	338	
X	.172	.154	.169	.175	.210	.203	.216	.200	.140	.200	.230	.233	.197	
s	.098	.082	.098	.086	.108	.131	.140	.104	.085	.120	.151	.176	.125	

TABLA 2

RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA, AGRUPADOS POR MES.

FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE CADA INCREMENTO DE TEMPERATURA

X Y s POR MES Y TOTALES.

TABLA 3
 FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INTERVALOS DE INCREMENTO DE TEMPERATURA
 PRIMERA ETAPA

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	Total
0.0-0.2	12	8	18	11	18	23	20	20	28	22	19	16	215
0.25-0.45	6	4	5	6	16	15	12	13	5	6	14	12	114
0.5-1.0						1	2			2	3	1	9
n	18	12	23	16	34	39	34	33	33	30	36	30	338

TABLA 4
 FRECUENCIAS RELATIVAS DE INTERVALOS DE INCREMENTO DE TEMPERATURA
 PRIMERA ETAPA

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
0.0-0.2	66	66	78	68	52	58	58	60	86	73	53	53
0.25-0.45	33	33	21	31	47	38	35	39	15	20	38	43
0.5-1.0						2	5			6	8	3

TABLA 5
 CALCULO DE χ^2 PARA COMPARAR LAS CUATRO SUB-POBLACIONES DE LA
 PRIMERA ETAPA

	1	2	3	4			1	2	3	4
0.0 - 0.2	37	61	70	47	215	0.0 - 0.2	32.4	68.0	61.0	53.4
0.25-0.45	15	43	24	32	114	0.25-0.45	17.2	36.0	32.3	28.3
0.5 - 1.0	0	3	2	4	9	0.5 - 1.0	1.3	2.8	2.5	2.2
	52	107	96	83	338					

	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
0.0 - 0.2	37	32.44	4.56	20.79	0.640
0.0 - 0.2	61	68.06	-7.06	49.84	0.732
0.0 - 0.2	70	61.06	8.94	79.92	1.308
0.0 - 0.2	47	53.46	-6.43	41.34	0.773
0.25-0.45	15	17.20	-3.20	10.24	0.595
0.25-0.45	43	36.08	6.92	47.88	1.327
0.25-0.45	24	32.37	8.37	70.05	2.154
0.25-0.45	32	28.33	1.67	2.78	0.769
0.5 - 1.0	0	1.35	-1.35	1.84	1.356
0.5 - 1.0	3	2.84	0.15	0.02	0.007
0.5 - 1.0	2	2.55	-0.55	0.30	0.120
0.5 - 1.0	4	2.23	1.14	1.37	0.616

$$\chi^2 = \underline{\underline{10.397}}$$

TABLA 6

CALCULO DE χ^2 PARA POBLACIONES "CONTRARIAS" O CONTIGUAS DE LA PRIMERA ETAPA

	1	2		1	2		2	3		2	3		3	4		3	4
0.0 - 0.2	37	61	98	31.6	66.3	0.0 - 0.2	61	70	131	60.0	61.9	0.0 - 0.2	70	47	117	62.4	54.6
0.25-0.45	15	43	57	18.3	38.6	0.25-0.45	43	24	67	35.3	31.6	0.25-0.45	24	32	57	30.4	26.6
0.50-1.0	0	3	3	0.9	2.0	0.50-1.0	3	2	5	2.6	2.3	0.50-1.0	2	4	6	3.2	2.8
	52	107	159				107	96	203				96	83	179		

	O	E	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E		O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E		O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
0.0 - 0.2	37	31.6	5.3	28.8	0.911	0.0-0.2	61	69.0	-8.0	64.6	0.936	0.0 - 0.2	47	52.2	-5.2	27.6	0.529
0.0 - 0.2	61	66.3	-5.3	28.7	0.532	0.0-0.2	70	61.9	8.1	65.6	1.059	0.0 - 0.2	37	31.7	5.2	17.7	0.875
0.25-0.45	15	18.3	-4.3	19.2	1.047	0.25-0.45	43	35.3	7.7	59.2	1.679	0.25-0.45	32	29.2	3.7	14.1	0.483
0.25-0.45	43	38.6	4.4	19.3	0.501	0.25-0.45	24	31.6	-7.6	58.9	1.861	0.25-0.45	14	17.7	-3.7	13.6	0.773
0.5-1.0	0	0.9	-0.9	0.9	0.968	0.5-1.0	3	2.6	0.4	0.13	0.052	0.50-1.0	4	2.4	1.5	2.3	0.931
0.5-1.0	3	2.0	0.9	0.9	0.463	0.5-1.0	2	2.3	-0.3	0.12	0.052	0.50-1.0	0	1.5	-1.5	2.3	1.529
				4.322						5.641						5.120	

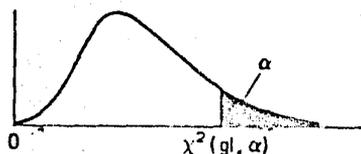
TABLA 7

CALCULO DE χ^2 COMPARANDO DOS POBLACIONES "ALTERNAS" O SEMEJANTES DE LA PRIMERA ETAPA

	1	3		1	3		1	3		1	3	
0.0 - 0.2	37	70	107	37.1	69.8		0.0 - 0.2	61	47	108	60.5	47.4
0.25-0.45	15	24	38	13.1	24.8		0.25-0.45	43	32	76	42.5	33.4
0.5 - 1.0	0	2	2	0.6	1.3		0.5 - 1.0	3	4	7	3.9	3.0
	52	96	148					107	83	190		

	O	E	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E		O	E	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
0.0 - 0.2	37	37.1	-0.12	0.014	0.0003	0.0 - 0.2	61	60.5	0.5	0.25	0.004
0.0 - 0.2	70	69.8	0.13	0.016	0.0002	0.0 - 0.2	47	47.4	-0.4	0.16	0.003
0.25-0.45	15	13.1	0.82	0.672	0.0510	0.25-0.45	43	42.5	0.5	0.25	0.005
0.25-0.45	24	24.8	-0.80	0.640	0.0260	0.25-0.45	32	33.4	-0.6	0.36	0.010
0.5 - 1.0	0	0.6	-0.60	0.470	0.6810	0.5 - 1.0	3	3.9	-0.9	0.84	0.210
0.5 - 1.0	2	1.3	0.70	0.490	0.3760	0.5 - 1.0	4	3.0	1.0	1.0	0.320
				<u>1.134</u>						<u>0.562</u>	

TABLA 8

Valores críticos de la distribución χ^2 

Las entradas de la tabla son los valores críticos de ji cuadrada para los cuales el área a la derecha de la curva es igual a α .

df	0.995	0.990	0.975	0.950	0.900	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005
1	0.0000393	0.000157	0.000982	0.00393	0.0158	2.71	3.84	5.02	6.64	7.88
2	0.0100	0.0201	0.0506	0.103	0.211	4.61	6.00	7.38	9.21	10.6
3	0.0717	0.115	0.216	0.352	0.584	6.25	7.82	9.35	11.4	12.9
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.0636	7.78	9.50	11.1	13.3	14.9
5	0.412	0.554	0.831	1.15	1.61	9.24	11.1	12.8	15.1	16.8
6	0.676	0.872	1.24	1.64	2.20	10.6	12.6	14.5	16.8	18.6
7	0.990	1.24	1.65	2.17	2.83	12.0	14.1	16.0	18.5	20.3
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	13.4	15.5	17.5	20.1	22.0
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	14.7	17.0	19.0	21.7	23.6
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	16.0	18.3	20.5	23.2	25.2
11	2.60	3.05	3.82	4.58	5.58	17.2	19.7	21.9	24.7	26.8
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	18.6	21.0	23.3	26.2	28.3
13	3.57	4.11	5.01	5.90	7.04	19.8	22.4	24.7	27.7	29.8
14	4.07	4.66	5.63	6.57	7.79	21.1	23.7	26.1	29.1	31.3
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	22.3	25.0	27.5	30.6	32.8
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	23.5	26.3	28.9	32.0	34.3
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.1	24.8	27.6	30.2	33.4	35.7
18	6.26	7.01	8.23	9.39	10.9	26.0	28.9	31.5	34.8	37.2
19	6.84	7.63	8.91	10.1	11.7	27.2	30.1	32.9	36.2	38.6
20	7.43	8.26	9.59	10.9	12.4	28.4	31.4	34.2	37.6	40.0
21	8.03	8.90	10.3	11.6	13.2	29.6	32.7	35.5	39.0	41.4
22	8.64	9.54	11.0	12.3	14.0	30.8	33.9	36.8	40.3	42.8
23	9.26	10.2	11.0	13.1	14.9	32.0	35.2	38.1	41.6	44.2
24	9.89	10.9	12.4	13.9	15.7	33.2	36.4	39.4	43.0	45.6
25	10.5	11.5	13.1	14.6	16.5	34.4	37.7	40.7	44.3	46.9
26	11.2	12.2	13.8	15.4	17.3	35.6	38.9	41.9	45.6	48.3
27	11.8	12.9	14.6	16.2	18.1	36.7	40.1	43.2	47.0	49.7
28	12.5	13.6	15.3	16.9	18.9	37.9	41.3	44.5	48.3	51.0
29	13.1	14.3	16.1	17.7	19.8	39.1	42.6	45.7	49.6	52.3
30	13.8	15.0	16.8	18.5	20.6	40.3	43.8	47.0	50.9	53.7
40	20.7	22.2	24.4	26.5	29.1	51.8	55.8	59.3	63.7	68.8
50	28.0	29.7	32.4	34.8	37.7	63.2	67.5	71.4	76.2	79.5
60	35.5	37.5	40.5	43.2	46.5	74.4	79.1	83.3	88.4	92.0
70	43.3	45.4	48.8	51.8	55.3	85.5	90.5	95.0	100.0	104.0
80	51.2	53.5	57.2	60.4	64.3	96.6	102.0	107.0	112.0	116.0
90	59.2	61.8	65.7	69.1	73.3	108.0	113.0	118.0	124.0	128.0
00	67.3	70.1	74.2	77.9	82.4	114.0	124.0	130.0	136.0	140.0

Adaptada de la obra de E. S. Pearson y H. O. Hartley, *Biometrika Tables for Statisticians*, vol. I (1962), págs. 130-131. Se reimprime con la autorización de los *Biometrika Trustees*.

FECHA	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	n	X	s
15-XI	10	4	6	5	4					29	0.162	.144
23-XI	13	2	6	2	2	2	1			28	0.157	.181
10-XII	10	6	4	2		1	3	1	1	28	0.207	.243
7-I	7	5	5	4	1					22	0.140	.122
29-I	9	2	4	4	2	3	2			26	0.219	.203
1-II	3	8	5	4	2	1				23	0.186	.132
17-II	15	9	4			1				30	0.075	.106
11-III	6	1	1	1	1	1				11	0.135	.174
28-III	19	5	4	2						30	0.063	.094
19-IV	8	1	3	1	1					14	0.100	.130
23-IV	5	2	1	2	2				2	14	0.242	.269
10-V	6	8	9	4		1	1			29	0.168	.141
28-V	1	2	4	2	3	2				14	0.271	.148
1-VI	5	4	2	3	1					15	0.140	.130
18-VI	5	3	7	5	4	1	3	2		30	0.283	.207
21-VI	4	3	7	3	2	1			1	21	0.223	.187
30-VI	2	3	1	5	1	1		1		14	0.257	.187
19-VII	5	1	3	3	1					13	0.153	.131
27-VII	13	5	6		1		1	3		29	0.165	.225
17-VIII	11	6	2	5	1	1	1			27	0.148	.168
23-VIII	4	4	3	2	2					15	0.160	.135
1-IX	3	6	4	1			1			15	0.153	.145
12-IX	3	8	4							15	0.103	.063
28-IX	12	4	7	3	2	1	1			30	0.153	.164
15-X	5	4	2	3				1		15	0.160	.173
18-X	8	3	2	2	1					16	0.106	.129
F.A.	192	109	106	68	34	17	14	8	5	553	0.167	.179
F.R.	34	19	19	12	6	4	3	2	1			

TABLA 9

RESULTADOS AGRUPADOS EN FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INCREMENTOS DE TEMPERATURA, POR FECHA DE PRUEBA, EN LA SEGUNDA ETAPA.

FRECUENCIAS RELATIVAS DE LOS INCREMENTOS DE TEMPERATURA, X Y s

TABLA 10

FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE LOS INTERVALOS DE INCREMENTO DE TEMPERATURA

POR FECHA DE PRUEBA.

(SEGUNDA ETAPA).

	15 Nov	23 Nov	10 Dic	7 Ene	24 Ene	1 Feb	17 Feb	11 Mar	28 Mar	19 Abr	23 Abr	10 May	28 May	1 Jun	18 Jun	21 Jun	30 Jun	19 Jul	27 Jul	17 Ago	23 Ago	1 Sep	20 Sep	28 Sep	15 Oct	18 Oct	Total
0.0-0.2	20	21	20	17	15	16	28	8	28	12	8	23	7	11	15	14	6	9	24	19	11	13	15	23	11	13	407
0.3-0.5	9	6	3	5	9	7	1	3	2	2	4	5	7	4	10	6	7	4	1	7	4	1	0	6	3	3	119
0.6-0.8		1	5		2		1				2	1			5	1	1		4	1		1		1	1		27
	28	28	28	22	26	23	30	11	30	14	14	29	14	15	30	21	14	13	29	27	15	15	15	30	15	16	553

	15 Nov	23 Nov	10 Dic	7 Ene	24 Ene	1 Feb	17 Feb	11 Mar	28 Mar	19 Abr	23 Abr	10 May	28 May	1 Jun	18 Jun	21 Jun	30 Jun	19 Jul	27 Jul	17 Ago	23 Ago	1 Sep	20 Sep	28 Sep	15 Oct	18 Oct
0.0-0.2	69	75	71	77	58	70	93	73	93	86	57	79	50	73	50	67	43	69	83	70	73	87	100	77	73	81
0.3-0.5	31	21	11	23	35	30	4	28	7	14	29	17	50	27	33	19	30	31	3	26	27	6		20	20	19
0.6-0.8		4	18		8		4				14	4			17	5	7		14	4		7			3	3

TABLA 11

CALCULO DE χ^2 PARA LAS CUATRO POBLACIONES DE LA
SEGUNDA ETAPA

	1	2	3	4		1	2	3	4	
0.0-0.2	109	76	93	129	407	0.0-0.2	114.8	62.5	110.4	119.2
0.3-0.5	39	8	47	25	119	0.3-0.5	33.6	18.3	32.2	34.9
0.6-0.8	8	1	10	8	27	0.6-0.8	7.5	4.1	7.3	7.9
	156	85	150	162						

	O	E	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
0.0-0.2	109	114.81	-5.81	33.75	0.29
0.0-0.2	76	62.55	13.45	180.9	2.89
0.0-0.2	93	110.39	-17.39	302.41	2.73
0.0-0.2	129	119.22	9.78	95.64	0.80
0.3-0.5	39	33.55	5.45	29.70	0.88
0.3-0.5	8	18.29	-10.90	118.81	6.49
0.3-0.5	47	32.27	14.73	216.97	6.73
0.3-0.5	25	34.86	-9.86	97.21	2.78
0.6-0.8	8	7.53	0.47	0.22	0.02
0.6-0.8	1	4.15	-3.15	9.92	2.39
0.6-0.8-	10	7.32	2.68	7.18	0.98
0.6-0.8	8	7.9	0.10	0.01	0.00

$$\chi^2 = 26.98$$

TABLA 12

CALCULO DE χ^2 PARA POBLACIONES ALTERNAS O SEMEJANTES. (SEGUNDA ETAPA).

	1	3		1	3
0.0-0.2	109	93	202	102.9	99.0
0.3-0.5	39	47	86	43.8	42.15
0.6-0.8	8	10	18	9.1	8.8
	156	150	306		

	2	4	
0.0-0.2	76	129	205
0.3-0.5	8	25	33
0.6-0.8	1	8	9
	85	162	247

	2	4
	70.5	134.4
	11.3	21.6
	3.0	5.9

	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /N
0.0-0.2	109	102.9	6.02	36.24	0.351
0.0-0.2	93	99.0	-6.01	36.12	0.364
0.3-0.5	39	43.8	-4.84	23.42	0.534
0.3-0.5	47	42.1	4.85	23.52	0.558
0.6-0.8	8	9.1	-1.17	1.36	0.148
0.6-0.8	10	8.8	1.18	1.39	0.157

$\chi^2 = 2.112$

	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
0.0-0.2	76	70.5	5.46	29.8	0.422
0.0-0.2	129	134.4	-5.45	29.7	0.220
0.3-0.5	8	11.35	-3.35	11.2	0.988
0.3-0.5	25	21.64	3.36	11.2	0.521
0.6-0.8	1	3.09	-2.09	4.3	1.413
0.6-0.8	8	5.90	2.1	4.4	0.747

$\chi^2 = 4.311$

TABLA 13

CALCULO DE χ^2 PARA LAS TRES POBLACIONES "CONTIGUAS" O CONTRARIAS DE LA PRIMERA ETAPA

	1	2		1	2		2	3		2	3		3	4		3	4	
0.0-0.2	109	76	185	119.7	65.2		0.0-0.2	76	93	169	61.1	107.8	0.0-0.2	93	129	222	106.7	115.2
0.3-0.5	39	8	47	30.4	16.5		0.3-0.5	8	47	55	19.8	35.1	0.3-0.5	47	25	72	34.6	37.3
0.6-0.8	8	1	9	5.8	3.1		0.6-0.8	1	10	11	3.9	7.0	0.6-0.8	10	8	18	8.6	9.3
	156	85	241					85	150	235				150	162	312		

O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E			
0.0-0.2	109	119.7	-10.7	115.5	0.965	0.0-0.2	76	61.1	14.8	221.4	3.62	0.0-0.2	93	106.7	-13.7	188.5	1.76
0.0-0.2	76	65.2	10.7	115.7	1.774	0.0-0.2	93	107.8	-14.8	221.1	2.04	0.0-0.2	129	115.2	13.7	188.7	1.63
0.3-0.5	39	30.4	8.5	73.6	2.420	0.3-0.5	8	19.8	-11.9	141.6	7.10	0.3-0.5	47	34.6	12.2	151.0	4.36
0.3-0.5	8	16.5	-8.5	73.6	4.432	0.3-0.5	47	35.1	11.9	141.6	4.03	0.3-0.5	25	37.3	-12.3	153.2	4.1
0.6-0.8	8	5.8	2.18	4.7	0.816	0.6-0.8	1	3.9	-2.9	8.7	2.20	0.6-0.8	10	8.6	1.3	1.8	0.2
0.6-0.8	1	3.1	-2.17	4.7	1.485	0.6-0.8	10	7.0	2.9	8.8	1.26	0.6-0.8	8	9.3	-1.3	1.7	0.19
				<u>11.89</u>					<u>20.28</u>					<u>12.26</u>			

TABLA 14

FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS TOTALES Y POR MES; POR INTERVALO DE INCREMENTO.

TERCERA ETAPA.

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	Total	Frec. Rel
0.0-0.2	36	109	33	59	72	87	32	64	53	35	72	36	688	61.3
0.3-0.5	13	17	14	17	11	21	25	14	21	19	24	17	213	19.0
0.6-0.7	9	8	2	5	6	2	10	10	6	20	5	5	88	7.8
0.8-0.9	3	0	5	1	8	4	3	2	8	11	2	4	51	4.5
1.0----	8	5	7	12	1	5	8	13	7	10	2	3	81	7.2
n	69	139	61	94	98	119	78	103	95	95	105	65	1121	
\bar{X}	0.36	0.20	0.34	0.30	0.22	0.22	0.38	0.32	0.32	0.44	0.22	0.30		

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
0.0-0.2	52.1	78.4	54.0	62.7	73.4	73.1	41.0	62.1	55.7	36.8	68.5	55.3
0.3-0.5	18.8	12.2	22.9	18.0	11.2	17.6	32.0	13.5	22.1	20.0	22.8	26.1
0.6-0.7	13.0	5.7	3.2	5.3	6.1	1.6	12.8	9.7	4.7	21.0	4.7	7.6
0.8-0.9	4.3	0.0	8.1	1.0	8.1	3.3	3.8	1.9	8.4	11.5	1.9	6.1
1.0----	11.5	3.5	11.4	12.7	1.0	4.2	10.2	12.6	7.3	10.5	1.9	4.6

TABLA 15
 RESULTADOS OBTENIDOS POR LOTE, POR MES, DE LOS
 TRES LABORATORIOS DESCRITOS EN LA
 CUARTA ETAPA

MES	LOTE	MEXICO	BELGICA	LOS ANGELES		
E	1	0.0	0.2	0.0		
N		0.0	0.2	0.0		
E		0.3	0.2	0.0		
F	2	0.3	0.1	0.2		
E		0.2	0.2	0.0		
B		0.2	0.2	0.0		
M	3	0.2	0.2	0.0		
A		0.3	0.2	0.2		
R		0.0	0.2	0.0		
	4	0.2	0.0	0.1	0.2	
		0.2	0.8 ⁺	0.0	0.0	
		0.0	0.3	0.3	0.0	
A	5	0.5 ⁺	0.3	0.0		
		0.2	0.4	0.0		
		0.2	0.2	0.3		
B	6	0.0	0.3	0.0		
		0.0	0.3	0.0		
		0.1	0.4	0.3		
R	7	0.1	0.2	0.0		
		0.0	0.2	0.1		
		0.1	0.3	0.0		
	8	0.5	0.1	0.1	0.6	0.2
		0.6	0.3	0.3	0.7	0.1
		0.3	0.2	0.1	0.3	0.0
		0.4	0.3		0.0	0.1

MES LOTE MEXICO BELGICA LOS ANGELES

	9	0.0		0.2		0.0
		0.0		0.1		0.0
		0.0		0.0		0.0
M	10	0.1		0.2		0.0
		0.2		0.1		0.0
		0.2		0.1		0.0
A	11	0.3		0.3		0.0
		0.1		0.3		0.0
		0.0		0.4		0.0
Y	12	0.0		0.2		0.0
		0.1		0.2		0.0
		0.2		0.2		0.0
	13	0.1		0.4		0.0
		0.2		0.2		0.3
14	0.1		0.1		0.1	
	0.3		0.3		0.0	
	0.0		0.1		0.0	
		0.4		0.2		0.0

J	15	0.3		0.2		0.0
		0.3		0.1		0.2
		0.2		0.2		0.0
U	16	0.1	0.4	0.2		0.2
N		0.0	0.0	0.2		0.0
0.0		0.2	0.1		0.0	

A	17	0.2		0.1		0.1
G		0.2		0.2		0.1
O		0.3		0.0		0.0

S	18	0.2	0.0	0.2		0.0
		0.3	0.3	0.1		0.3
		0.0	0.0	0.2		0.0
		0.1	0.0			
		0.0				
E	19	0.3		0.1		0.0
P		0.3		0.4		0.0
0.3			0.2		0.0	

MES	LOTE	MEXICO	BELGICA	LOS ANGELES			
O	20	0.1	0.2	0.3			
		0.0	0.1	0.0			
		0.1	0.2	0.1			
C	21	0.2	0.5 ⁺	0.0			
		0.2	0.3	0.5 ⁺			
T		0.3	0.0	0.0			
N	22	0.2	0.2	0.0			
		0.1	0.2	0.0			
		0.3	0.2	0.0			
O	23	0.0	0.1	0.1			
		0.2	0.1	0.8 ⁺			
V		0.0	0.4	0.3			
D	24	0.1	0.1	0.1			
		0.1	0.2	0.0			
		0.2	0.4	0.2			
I	25	0.3	0.1	0.0			
		0.4	0.3	0.0			
		0.2	0.2	0.1			
C	26	0.8	0.6	0.0	0.6		
		0.6	1.6	1.1	0.7	0.1	0.4
		0.7	0.7	0.8	0.7	0.4	0.2
		1.1	1.1			0.3	0.6
						0.4	0.6
				0.3			

TABLA 16

FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE INCREMENTOS DE TEMPERATURA, POR MES, DE LOS TRES LABORATORIOS DES CRITOS EN LA CUARTA ETAPA.

MEXICO

	E	F	M	A	M	J	A	S	O	N	D	F. Abs.	F. Rel.
0.0	2		1	4	6	3		5	1	2		24	24.7
0.1				4	5	1		1	2	1	2	17	17.5
0.2		2	1	5	4	2	2	1	2	2	2	23	23.7
0.3	1	1	1	3	2	2	1	5	1	1	1	19	19.5
0.4				1	1	1					1	4	4.1
0.5				2								2	2.0
0.6				1							2	3	3.0
0.7											2	2	2.0
0.8											1	1	1.0
1.1											2	2	2.0

97

BELGICA

0.0				1			1					2	2.3
0.1		1	2	4	6	2	1	2	2	2	2	24	28.5
0.2	3	2	1	3	7	4	1	3	2	3	2	31	36.9
0.3				7	3				1		1	12	14.2
0.4				2	2			1		1	1	7	8.33
0.5									1			1	1.1
0.6											1	1	1.1
0.7											3	3	3.5
0.8				1							1	2	2.3
1.1											1	1	1.1

84

LOS ANGELES

	E	F	M	A	M	J	A	S	O	N	D	F. Ab.	F. Rel.
0.0	3	2	2	10	15	4	1	5	3	3	4	52	57.1
0.1				3	1		2		1	1	3	11	12.2
0.2		1	1	2	1	2					2	9	10.0
0.3				2	1			1	1	1	2	8	8.8
0.4											3	3	3.3
0.5									1		3	4	4.4
0.6				1								1	1.1
0.7				1								1	1.1
0.8										1		1	1.1

M E S		M E X I C O	B E L G I C A	L. A N G E L E S
ENE	X	.100	.200	.000
	s	.141	.000	.000
FEB	X	.233	.166	.066
	s	.047	.047	.094
MAR	X	.166	.133	.066
	s	.129	.047	.094
ABR	X	.215	.261	.136
	s	.173	.170	.203
MAY	X	.127	.205	.053
	s	.119	.097	.081
JUN	X	.166	.166	.065
	s	.141	.047	.094
JUL	X			
	s			
AGO	X	.233	.100	.066
	s	.047	.081	.047
SEP	X	.150	.200	.050
	s	.138	.100	.111
OCT	X	.150	.233	.150
	s	.095	.137	.189
NOV	X	.133	.200	.200
	s	.110	.100	.286
DIC.	X	.523	.491	.235
	s	.321	.307	.184

TABLA 18 A

MEDIAS DE INCREMENTO DE TEMPERATURA Y DESVIACIONES
ESTANDARD, POR MES, POR LABORATORIO.

(CUARTA ETAPA).

TABLA 18 B
 MEDIAS DE INCREMENTO DE TEMPERATURA Y DESVIACIONES
 ESTANDARD, POR MES, COMBINANDO LAS POBLACIONES.
 CUARTA ETAPA.

MES		M E X - B E L	M E X - B E L - L. A.
ENE	X	.150	.100
	S	.118	.115
FEB.	X	.200	.155
	S	.057	.095
MAR.	X	.150	.122
	S	.095	.103
ABR.	X	.236	.203
	S	.173	.190
MAY	X	.166	.122
	S	.115	.122
JUN	X	.166	.138
	S	.115	.117
JUL	X		
	S		
AGO	X	.160	.133
	S	.094	.094
SEP	X	.160	.137
	S	.129	.134
OCT	X	.191	.177
	S	.125	.151
NOV	X	.145	.194
	S	.089	.248
DIC	X	.512	.440
	S	.321	.287

TABIA 17
 FRECUENCIAS ABSOLUTAS DE INCREMENTOS DE TEMPERATURA
 POR LABORATORIO Y FRECUENCIAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS
 TOTALES
 (CUARTA ETAPA)

	MEX	BEL	L.A.	Fr. Abs.	Fr. Rel
0.0	24	2	52	78	28.7
0.1	17	24	11	52	19.1
0.2	23	31	9	63	23.2
0.3	19	12	8	39	14.3
0.4	4	7	3	14	5.1
0.5	2	1	4	7	2.5
0.6	3	1	1	5	1.8
0.7	2	3	1	6	2.2
0.8	1	2	1	4	1.4
1.1	2	1		3	1.1

TABLA 19

MEDIAS Y VARIANZAS POR LOTE; COMBINANDO LOS DISTINTOS LABORATORIOS DESCRITOS EN LA CUARTA ETAPA.

	M-B-IA	Mex-Bel	Mex-L.A.	Bel-L.A.	Mexico	Belgica	Los Angeles								
	X	X	X	X	X	X	X								
	S ²														
ENERO	1	0.10	0.013	0.15	0.012	0.05	0.010	0.10	0.010	0.10	0.020	0.20	0.000	0.00	0.000
FEBRERO	2	0.16	0.008	0.20	0.008	0.18	0.008	0.12	0.008	0.23	0.002	0.18	0.000	0.06	0.008
MARZO	3	0.13	0.011	0.16	0.009	0.11	0.014	0.11	0.008	0.16	0.015	0.16	0.007	0.06	0.008
ABRIL	4	0.19	0.053	0.30	0.061	0.10	0.010	0.21	0.066	0.13	0.008	0.28	0.079	0.06	0.008
ABRIL	5	0.26	0.027	0.32	0.018	0.20	0.030	0.22	0.028	0.30	0.020	0.35	0.006	0.10	0.020
ABRIL	6	0.13	0.022	0.18	0.024	0.03	0.006	0.18	0.024	0.03	0.002	0.33	0.002	0.10	0.008
ABRIL	7	0.12	0.012	0.11	0.011	0.05	0.002	0.15	0.015	0.06	0.002	0.26	0.000	0.03	0.002
ABRIL	8	0.27	0.040	0.28	0.025	0.29	0.043	0.23	0.048	0.33	0.022	0.18	0.007	0.25	0.062
MAYO	9	0.04	0.005	0.06	0.006	0.00	0.000	0.06	0.006	0.00	0.000	0.13	0.003	0.00	0.000
MAYO	10	0.11	0.002	0.16	0.001	0.11	0.008	0.08	0.007	0.16	0.002	0.16	0.000	0.00	0.000
MAYO	11	0.18	0.024	0.25	0.021	0.10	0.013	0.21	0.027	0.13	0.015	0.36	0.000	0.06	0.008
MAYO	12	0.10	0.012	0.15	0.007	0.05	0.005	0.10	0.012	0.10	0.006	0.18	0.000	0.00	0.000
MAYO	13	0.17	0.015	0.20	0.014	0.13	0.008	0.20	0.020	0.13	0.002	0.26	0.17	0.13	0.015
MAYO	14	0.15	0.022	0.22	0.016	0.11	0.028	0.10	0.013	0.23	0.028	0.21	0.003	0.00	0.000
JUNIO	15	0.17	0.011	0.23	0.003	0.17	0.016	0.12	0.008	0.28	0.000	0.18	0.000	0.06	0.008
JUNIO	16	0.12	0.016	0.15	0.017	0.10	0.017	0.17	0.007	0.11	0.021	0.21	0.002	0.06	0.008

MES	LOTE	M-B-LA		Mex-Bel		Mex-L.A.		Bel-L.A.		Mexico		Belgica		Los Angeles	
		X	S ²	X	S ²	X	S ²	X	S ²	X	S ²	X	S ²	X	S ²
AGOSTO	17	0.14	0.009	0.18	0.008	0.15	0.009	0.10	0.007	0.28	0.004	0.13	0.010	0.06	0.002
SEPTIEMBRE	18	0.13	0.017	0.14	0.016	0.11	0.018	0.15	0.014	0.17	0.029	0.21	0.002	0.10	0.002
SEPTIEMBRE	19	0.18	0.021	0.27	0.000	0.15	0.022	0.12	0.021	0.30	0.000	0.25	0.011	0.00	0.000
OCTUBRE	20	0.12	0.008	0.11	0.004	0.10	0.010	0.15	0.009	0.06	0.002	0.16	0.002	0.13	0.015
OCTUBRE	21	0.23	0.036	0.26	0.023	0.20	0.30	0.23	0.053	0.23	0.002	0.30	0.040	0.16	0.055
NOVIEMBRE	22	0.13	0.011	0.20	0.003	0.10	0.013	0.10	0.010	0.20	0.006	0.20	0.000	0.00	0.000
NOVIEMBRE	23	0.23	0.051	0.15	0.003	0.28	0.070	0.32	0.058	0.06	0.008	0.25	0.020	0.40	0.080
DICIEMBRE	24	0.16	0.012	0.19	0.012	0.16	0.004	0.17	0.016	0.13	0.002	0.25	0.015	0.10	0.006
DICIEMBRE	25	0.17	0.017	0.25	0.009	0.28	0.021	0.11	0.011	0.30	0.006	0.20	0.006	0.03	0.002
DICIEMBRE	26	0.63	0.117	0.91	0.134	0.60	0.154	0.49	0.078	0.90	0.105	0.77	0.024	0.35	0.037

TABLA 20
 CALCULO DE χ^2 PARA LAS TRES POBLACIONES DE
 LA CUARTA ETAPA

	Frec. Observadas				Frec. Esperadas		
	Max.	Bel.	L.A.				
0.0-0.1	41	26	63	130	46.5	40.2	43.1
0.2-0.3	42	43	17	102	36.5	31.6	33.8
0.4-0.5	6	8	7	21	7.5	6.5	6.9
0.6-0.7	5	4	2	11	3.9	3.4	3.6
0.8-1.0	3	3	1	7	2.5	2.1	2.3
	97	84	90	271			

	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
0.0-0.1	41	46.5	-5.5	30.25	0.73
0.0-0.1	26	40.2	-14.2	201.64	5.01
0.0-0.1	63	43.1	19.9	396.01	9.18
0.2-0.3	42	36.5	5.5	30.25	0.82
0.2-0.3	43	31.6	11.4	129.9	4.10
0.2-0.3	17	33.8	-16.8	282.24	8.35
0.4-0.5	6	7.5	-1.5	2.25	0.30
0.4-0.5	8	6.5	1.5	2.25	0.34
0.4-0.5	7	6.9	0.1	0.01	0.00
0.6-0.7	5	3.9	1.1	1.21	0.31
0.6-0.7	4	3.4	0.6	0.30	0.10
0.6-0.7	2	3.6	-1.6	2.56	0.71
0.8-1.0	3	2.5	0.5	0.25	0.10
0.8-1.0	3	2.1	0.9	0.81	0.38
0.8-1.0	1	2.3	-1.4	1.69	0.73

$$\chi^2 = \underline{31.16}$$

TABLA 21
 CALCULO DE χ^2 PARA LAS TRES POBLACIONES DE LA CUARTA ETAPA
 FORMANDO TRES PARES DE COMBINACIONES.

Mex-Bel						Mex-L.A.					Bel. L.A.				
-0.1	41	26	67	35.9	31.0	41	63	104	53.9	50.0	26	63	89	42.9	46.0
-0.3	42	43	85	45.5	39.4	42	17	59	30.6	28.3	43	17	60	28.9	31.0
-0.5	6	8	14	7.5	6.4	6	7	13	6.7	6.2	8	7	15	7.2	7.7
-0.7	5	4	9	4.8	4.1	5	2	7	3.6	3.3	4	2	6	2.8	3.1
-1.0	3	3	6	3.2	2.7	3	1	4	2.0	1.9	3	1	4	1.9	2.0
	97	84	181			97	90	187			84	90	174		

	O	E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	O	E	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E	O	E	(O-E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
-0.1	41	35.9	5.1	26.0	0.72	41	53.9	-12.9	166.4	3.08	26	42.9	-16.9	285.6	6.65
-0.1	26	31.0	-5.0	25.0	0.80	63	50.0	13.0	169.0	3.38	63	46.03	16.9	287.9	6.25
-0.3	42	45.4	-3.5	12.5	0.26	42	30.6	11.4	129.9	4.24	43	28.9	14.1	198.8	6.87
-0.3	43	39.4	3.6	12.9	0.32	17	28.3	-11.3	127.6	4.5	17	31.0	-14.0	196.0	6.32
-0.5	6	7.5	-1.5	2.2	0.3	6	6.7	-0.7	0.4	0.0	8	7.2	0.8	0.6	0.08
-0.5	8	6.4	1.6	2.5	0.4	7	6.2	0.8	0.6	0.1	7	7.7	-0.75	0.5	0.07
-0.7	5	4.8	0.2	0.0	0.0	5	3.6	1.4	1.9	0.5	4	2.8	1.2	1.4	0.51
-0.7	4	4.1	-0.1	0.0	0.0	2	3.3	-1.3	1.6	0.5	2	3.1	-1.1	1.2	0.39
-1.0	3	3.2	-0.2	0.0	0.0	3	2.0	1.0	1.0	0.5	3	1.9	1.0	1.1	0.59
-1.0	3	2.7	0.3	0.0	0.0	3	2.0	1.0	1.0	0.5	3	1.9	1.0	1.1	0.59
						1	1.9	0.9	0.8	0.9	1	2.0	-1.06	1.1	0.54

$\chi^2 = \underline{2.81}$	$\chi^2 = \underline{17.82}$	$\chi^2 = \underline{28.27}$
-----------------------------	------------------------------	------------------------------

TABLA 22

MEDIAS CALCULADAS POR MES, POR LABORATORIO, Y ALGUNAS COMBINACIONES
PARA LA CUARTA ETAPA.

MES	MEX	BEL	L.A.	MEX-BEL-L.A.	MEX-BEL
ENE	0.10	0.20	0.00	0.10	0.15
FEB	0.23	0.18	0.06	0.16	0.20
MAR	0.16	0.16	0.06	0.13	0.15
ABR	0.13	0.30	0.07	0.17	0.21
MAY	0.12	0.21	0.02	0.12	0.16
JUN	0.16	0.16	0.06	0.13	0.15
AGO	0.28	0.13	0.06	0.14	0.16
SEP	0.15	0.20	0.05	0.13	0.16
OCT	0.15	0.21	0.15	0.17	0.18
NOV	0.13	0.20	0.20	0.17	0.16
DIC	0.21	0.21	0.06	0.16	0.21

BIBLIOGRAFIA:

- Armstead, R; Taylor, N.; (1977)*
"DESIGN AND OPERATION OF AN IN-HOUSE PYROGEN TEST".
North Carolina, USA.
- Carpenter, Ph.; (1975)
"IMMUNOLOGY AND SEROLOGY"
W.B. Saunders, Co. Philadelphia, USA.
- Cabagnac, M.; Duclaux, R.; Guillet, A. (1970)
"THERMOREGULATION COMPORTEMENTALE CHEZ LE CHIEN:
EFFETS DE LA FIEVRE ET LA THYROXINE!"
Physiol. and Behavior 5:679-704.
- Cooper, J. F.; Pearson, S.M. (1977)*
"DETECTION OF ENDOTOXIN IN BIOLOGICAL PRODUCTS"
Memphis, USA.
- Croxton, F.E. (1973).
"ELEMENTARY STATISTICS"
Dover Publications, Inc. New York, USA.
- Dijk, P, va; de Voorde, H. (1977)*
"FACTORS AFFECTING PYROGEN TESTING IN RABBITS"
Louvain, Belgium.

- 170
- Dressel, H.; (1977)*
"REMARKS ON SOME PROPERTIES AND EFFECTS OF SODIUM
NUCLEINATE (A PYROGEN)"
Berlin, Ost. Germany.
- Fudenberg, H.H.; Stites, D.I.; Caldwell, J.L.; Wels, J.V. (1980)
"BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY"
California, USA.
- Fumarola, D.; Jirillo, E. (1977)*
"LIMULUS TEST, PARENTERAL DRUGS AND BIOLOGICAL PRODUCTS."
Vary, Italy.
- Gardi, C.M.; Arpagaus, G.; (1977)*
THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST, A USEFUL TOOL
FOR THE CONTROL OF PLASMA FRACTIONS."
Switzerland.
- Giese, A.C. (1968)
CELL PHYSIOLOGY
W.B. Saunders, Co. Philadelphia, USA.
- Good, C.M.; Lane, H. (1977)*
THE BIOCHEMISTRY OF PYROGENS
Bull Parent Drug Assoc. CONACYT. México.
- Gonzalez, et. al; (1971)
PARTITIONAL CALORIMETRY OF THE NEW ZEALAND WHITE RABBIT
AT TEMPERATURES 5-35⁰C
J. Appl. Physiol. 31:728-734.

Greissman, S.E.; Hornick, R.B. (1969).

"COMPARATIVE PYROGENIC REACTIVITY OF RABBIT AND MAN
TO BACTERIAL ENDOTOXINE".

Baltimore, USA.

Hammel, H.T. (1968).

REGULATION OF INTERNAL BODY TEMPERATURE"

Ann. Rev. Physiol. 30:641-710.

Hegedus, L.; Benko, A. (1977)*

COMPARATIVE PYROGEN REACTIVITY OF RABBIT AND MAN TO
HUMAN ALBUMIN AND IMMUNOGLOBULIN SOLUTIONS.

Budapest, Hungary.

Hellon, R.F. (1970)

THE STIMULATION OF HYPOTHALAMIC NEURONES BY CHANGES IN
AMBIENT YEMPERATURES

Hulda, M.; (1974)

ENVIRONMENTAL VARIABLES IN ANIMAL EXPERIMENTATION"

Bucknell University Press, USA.

Johnson, F.M. Eyring, H. Polissar, M.J. (1954)

THE KINETIC BASIS OF MOLECULAR BIOLOGY.

Kluger, M. (1971).

THE RABBIT EAR AS A TEMPERATURE SENSOR

Life Sciences, 10:895-899.

Idem, (1971)

FEVER IN THE FROG HYLA CINEREA

J. Thermal Biol. 2:79-81

Idem, (1979).

FEVER, ITS BIOLOGY, EVOLUTION AND FUNCTION.

Princeton University Press, USA.

Kunhold, B. (1977)*

COMPARABILITY OF PYROGEN TESTS.

West Germany

Kuronen, T.; Peltola, H., Nors. T.; Haque, N.; Helena, F. (1977)*

ADVERSE REACTIONS AND ENDOTOXIN CONTENTS OF POLISACCHARIDE
VACCINES.

Helsinki, Finland.

Liebermaster, C. (1887)

AN INTRODUCTION TO SPECIAL PATHOLOGY AND THERAPY.

Verlag, Von F.C.W. Vogel, Leipzig, Germany.

Luderitz, D.; Freudenberg, B.; Galanos, Ch.; Kiss, F.; Lehman, V.

(1977)*

THE PYROGEN OF GRAMNEGATIVE BACTERIA.

West Germany.

Lucken, R.N.; Adlam, C.; Knight, P.A. (1977)*

A COMPARISON OF PYROGENICITY AND RELATED PROPERTIES SEEN
IN SUSPENSIONS.

Kent, United Kingdom.

Marcus, S.; Nelson, J.R.; (1977)*

TESTS ALTERNATIVE TO THE RABBIT BIOASSAY FOR PYROGENS.

University of Utah, USA.

Naumovic', N.; Popovic', B.; Nedeljovic', M. (1977)*

PROTEIN CONCENTRATION IN IMMUNOLOGICAL PREPARATIONS AND
PYROGEN REACTION OF RABBITS.

Belgrade, Yugoslavia.

Newton, C. (1969).

MOLECULAR ASPECTS OF ENDOTOXIC REACTION

Bact. Rev. 33:72-98.

Noordwijk, J.; de Jong, Y. (1977)*

COMPARISON OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE, (LAL) TEST
WITH THE RABBIT TEST, FALSE POSITIVES AND FALSE NEGATIVES.

The Netherlands.

Ott, L. (1977)

AN INTRODUCTION TO STATISTICAL METHODS AND DATA ANALYSIS

Duxbury Press, Massachusetts, USA.

Pinter, J.; Zsadansky, C.; Gyoffi, G. (1977)*

PYROGEN TESTS OF INFUSIONS, BLOOD ANTICOAGULANT SOLUTIONS,
PLASTIC MATERIALS AND RUBBER PRODUCTS.

Budapest, Hungary.

Ronnenberg, J. Zh. (1977)*

COMPARISON OF THE PYROGEN TESTS IN RABBITS AND WITH
LIMULUS LYSATE.

West Germany.

Seibert, F.B. (1923).

FEVER PRODUCING SUBSTANCES FOUND IN SOME DESTILLED WATER.

Ann. J. Physiol. 67:90-104

Simon, S.; Toth, M.; Wallerstein, G.; Remmeny, Z.; (1977)*

STUDIES ON THE SENSITIVITY AND REPRODUCTIBILITY OF
PHARMACOLOGICAL PYROGEN TESTING.

Budapest, Hungary.

Snell, E.S.; Atkins, E; (1968).

THE MECHANISMS OF FEVER.

Academic Press; New York, USA.

Turco, S.; King, R. (1979).

STERILE DOSAGE FORMS

Lea & Febeni, Philadelphia, USA.

Vaughn, L.K.; Bernhim, H.A.; Kluger, M. (1974).

FEVER IN THE LIZARD DIPSOSAURUS DORSALIS

Nature, 252-473-474.

Weary, M.; Wallin, R.F.; (1973).

THE RABBIT PYROGEN TEST.

Illinois, USA. CONACYT, México.

Wunnenberg, W.; Hardy, J.D. (1972).

RESPONSE OF SINGLE UNITS OF THE POSTERIOR HYPOTHALAMUS
TO THERMAL STIMULATION.

J. Appl. Physiol. 33:547-552.

Zimmerman, G.; (1977)*

REGULARITIES IN THE FREQUENCY OF MINUS TEMPERATURES IN
THE RABBIT PYROGEN TESTS.

East Germany.

=====

* Selecciones de las Memorias del Simposio Internacional sobre Sistemas
de prueba de Pirogenicidad, Inocuidad y Toxicidad, de Productos
Biológicos, celebrado en Budapest, en 1977 y editadas por la asocia-
ción Internacional de Sociedades Microbiológicas. Desarrollo en
Estandarización Biológica.