

20/1/96

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALICILATOS  
SOBRE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA DE  
LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES  
EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMA-  
TOIDE JUVENIL**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
ELSA CATALINA PAZ ZAMACONA





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.

# I N D I C E

	Pág.
RESUMEN . . . . .	1
CAPITULO I	
INTRODUCCION. . . . .	4
CAPITULO II	
ANTECEDENTES CIENTIFICOS. . . . .	8
CAPITULO III	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. . . . .	16
OBJETIVOS . . . . .	17
HIPOTESIS . . . . .	18
DISEÑO EXPERIMENTAL . . . . .	19
CAPITULO IV	
MATERIAL Y REACTIVOS. . . . .	22
METODOS . . . . .	28
FUNDAMENTO METODOLOGICO . . . . .	44
CAPITULO V	
RESULTADOS. . . . .	53
TABLAS Y GRAFICAS . . . . .	61

*CAPITULO VI*

*DISCUSION . . . . . 91*

*CAPITULO VII*

*CONCLUSIONES. . . . . 98*

*LISTA DE ABREVIATURAS . . . . . 100*

*BIBLIOGRAFIA. . . . . 101*

*APENDICE. . . . . I*

## RESUMEN

La artritis reumatoide juvenil (ARJ) es una enfermedad recurrente, crónica e inflamatoria que primordialmente afecta las articulaciones. El estímulo antigénico que inicia la respuesta inmunitaria y la inflamación subsiguiente en la ARJ es desconocido, se considera a los salicilatos - el pilar del tratamiento médico de esta enfermedad. El ácido acetil salicílico es el mayormente usado como agente anti-inflamatorio.

La quimiotaxis es el proceso mediante el cual los fagocitos son atraídos a la vecindad de los invasores patógenos. La mayor parte de los factores quimiotácticos son del huésped y el sistema del complemento parece ser la fuente más importante de estos factores quimiotácticos. Se sabe que los neutrófilos son las primeras células atraídas a reunirse alrededor de la inflamación.

Se ha considerado que los complejos inmunes (C.I.) se forman in vivo durante la respuesta inmune humoral y en presencia de moléculas de Ag. Los C.I. pueden ejercer una función fisiológica o interferir con la función celular -- como es la activación del sistema del complemento con sus

*mecanismos efectores.*

*Se ha reportado en pacientes con ARJ una controversia sobre el efecto de los salicilatos en la actividad quimiotáctica y migración espontánea de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Además de una actividad fagocítica decrecida y una concentración de complejos inmunes circulantes aumentada.*

*En este estudio, se determinó la migración quimiotáctica y migración espontánea de PMN bajo el efecto y sin él de salicilatos tanto in vivo como in vitro, en un grupo de 12 niños con ARJ y un grupo testigo de 12 niños sanos con edades similares. También se determinó la concentración de salicilato en suero a diferentes tiempos después de la ingestión de una dosis de salicilato dada. Se efectuó la evaluación de la fagocitosis de Leucocitos PMN y se demostró la concentración de complejos inmunes en el suero de niños con ARJ antes de la toma del medicamento.*

*En el experimento in vivo los pacientes con ARJ, antes de la ingestión de salicilato presentaron cifras mayores de respuesta quimiotáctica ( $\bar{x} = 0.794 \pm 0.2$ ) con respecto a las encontradas cuando la concentración de salicilato experimentaba su concentración máxima ( $\bar{x} = 0.56 \pm 0.2$ )*

con una  $p < 0.001$ . El mismo fenómeno se observó con la migración espontánea y en el modelo in vitro en ambos casos.

Los niños con ARJ mostraron disminuida la actividad fagocítica de PMN al igual que la concentración de complejos inmunes en suero al compararlos con el grupo testigo. La concentración de salicilatos en suero no es homogénea a los diferentes tiempos.

## C A P I T U L O I

### INTRODUCCION

La artritis reumatoide juvenil (ARJ) o poliartritis crónica juvenil se caracteriza clínicamente por inflamación crónica de la sinovial (1). Fue descrita por G.F. -- Still en 1896. La enfermedad la describió detalladamente en sus diversas manifestaciones y propuso que la artritis crónica representaba más de una enfermedad; ya que, en 12 de 19 niños con artritis crónica, la enfermedad se caracterizó por artritis y manifestaciones clínicas extra-articulares (esplenomegalia, linfadenopatía, fiebre, serositis y anemia). Dos puntos fueron importantes para establecer el diagnóstico de la enfermedad: El primero, la cronicidad y el segundo la exclusión de otras enfermedades (2). La artritis se manifiesta por aumento de volumen de las articulaciones afectadas, incrementada sensibilidad y dolor; así como, rigidez de reposo de las articulaciones afectadas. - Las manifestaciones sistémicas son: Fiebre, exantema, hepatomegalia, adenomegalia, anemia, leucocitosis y trombocitosis (3).

En la artritis, la inflamación está mediada por facto



res como la bradicinina, histamina (4) y productos del metabolismo del ácido araquidónico de la vía ciclooxigenasa como los endoperoxidos  $PGG_2$  y  $PGH_2$ , tromboxanos y prostacilinas (5). Recientemente se ha demostrado la participación concomitante de radicales libres de oxígeno activado o bien como los metabolitos de la vía de la lipooxigenasa (5), leucotrieno C que se ha descrito como peroxilipido -- que corresponde a la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRL-A) (6). Los radicales libres y los productos de la lipooxigenasa pueden también estar involucrados en la producción de dolor por inflamación.

Una vez iniciado el proceso inflamación todos los sistemas que participan se activan y retroalimentan. En artritis inflamatoria crónica el primer sistema que se activa es el complemento (7); además del de las cininas (8). Los productos de activación del complemento  $C_{3a}$  y  $C_{5a}$  producen liberación de histamina de las células cebadas (9) -- mientras que las fracciones  $C_{3a}$ ,  $C_{5a}$ ,  $C_6$  y  $C_7$  atraen a los neutrófilos al sitio de la inflamación (10). Las prostaglandinas son sintetizadas por los leucocitos (11) y pueden también ser liberadas durante la activación del complemento (12). Los neutrófilos fagocitan complejos inmunes y posteriormente vierten sus enzimas lisosomales (13), lo -- que aunado a la infiltración celular condiciona erosión --

del cartílago (14), esto a la vez ocasiona liberación de -  
cininas por dos mecanismos: por el efecto de las enzimas -  
proteolíticas sobre el cininógeno (15) y por acción del --  
condroitín liberado del cartílago. Las fosfatasas lisoso-  
males liberan ácido araquidónico de la membrana celular y  
así favorecen la síntesis de prostaglandinas (16). Las --  
prostaglandinas contribuyen a mayor migración de leucoci-  
tos del torrente sanguíneo al sitio de lesión.

La prostaglandina E potencia el efecto de bradicinina  
e histamina sobre la permeabilidad vascular de la microcir-  
culación (17), además, de incrementar el dolor y la tempe-  
ratura por acción directa sobre receptores (18).

Se ha demostrado que  $C_5a$  no es capaz de inducir libe-  
ración de histamina ni de atraer neutrófilos en ausencia -  
de prostaglandina  $E_2$  (19). En el tratamiento de la infla-  
mación en artritis reumatoide se ha utilizado ácido acético  
salicílico desde 1880 (20) aunque su mecanismo de acción -  
no era bien conocido. Los primeros estudios se orientaron  
a la acción farmacológica de inhibir la enzima ciclo-oxige-  
nasa o prostaglandín-sintetasa (21) al acetilarla y favore-  
cer así su eliminación de la célula (22).

Se ha demostrado que pacientes con AR después de la -

administración oral de inhibidores de ciclo-oxigenasa los niveles séricos de cininógeno y prostaglandina descienden a niveles normales (23). En los últimos años se ha estudiado la acción de los salicilatos sobre los eventos celulares de la inflamación y específicamente sobre los neutrófilos que son las células que participan directamente en la inflamación (24).

En ratas Wistar, estudiando simultáneamente los mediadores y las alteraciones histológicas de la inflamación inducida experimentalmente se reveló que el ácido acetilsalicílico al igual que otros anti-inflamatorios no esteroideos, actúan disminuyendo la migración de las células al sitio de la inflamación (26). Otros investigadores han reportado deterioro de la quimiotaxis de monocitos sin afectarse la de los PMN al incubar las células "in vitro" con concentraciones terapéuticas de salicilatos (27).

## C A P I T U L O   I I

### ANTECEDENTES CIENTIFICOS

*De acuerdo con la comisión de Expertos en enfermedades reumáticas de la Organización Mundial de la Salud, se entiende por enfermedades reumáticas las que atacan al sistema locomotor, principalmente con dolor, disfunción y alteraciones anatómicas que afectan al tejido conectivo y en especial su elemento, colágena. La artritis reumatoide juvenil o artritis crónica juvenil es un reumatismo crónico, poliarticular, sistémico pauciarticular (4 o más articulaciones) inflamatorio que lleva a la deformación. Se inicia en menores de 16 años con una duración mínima de 3 meses (2).*

*Principia generalmente en los dedos y muñecas extendiéndose gradualmente a todas las articulaciones del cuerpo. Las lesiones del tipo inflamatorio afectan especialmente la membrana sinovial y partes blandas articulares, - lo que origina dolor, tumefacción y limitación de movimientos y luego por destrucción de cartilago articular, lleva a la anquilosis (28).*

*Generalmente se acepta que la artritis reumatoide es*

una enfermedad en cuya patogenia los mecanismos inmunológicos desempeñan un considerable papel, no obstante hasta -- ahora no se ha señalado un indicio sobre la naturaleza del estímulo antigénico. Se han considerado dos posibles causas. En la primera se sugiere que la enfermedad pudiera tener un origen infeccioso. La otra posibilidad es que la enfermedad pudiera ser un proceso autoinmunitario, posible mente como respuesta a la fibrina que ha sido antigénicamente alterada. La opinión está dividida en cuanto a que si la artritis reumatoide, es fundamentalmente causada por inmunidad mediada por células o por anticuerpos humorales.

Esta enfermedad tiene tendencia a desarrollarse en familias en las cuales se desencadena mediante algún factor como el shock, la fatiga, el trauma, infección o la exposición a factores adversos (29). La muerte originada exclusivamente por agravamiento de Artritis reumatoide es rara y cuando esta ocurre es por las manifestaciones extra-articulares con las que cursa el enfermo. En la actualidad se tiene una observación inapropiada de las manifestaciones extra-articulares por el clínico, considerándola como complicación y no como parte de la enfermedad. Las complicaciones de la Artritis reumatoide entendidas en sentido estricto, incluyen eventos como la fractura de huesos osteopénicos y los procesos infecciosos de piógenos del tejido óseo. La manifestación extra-articular más frecuente es -

La anemia en un 64.4% (30).

Los salicilatos son drogas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad. Reciben el nombre general de salicilatos todos los derivados del ácido salicílico, el cual es demasiado irritante para poder usarse sistémicamente, utilizándose para ello, derivados del ácido salicílico o salicilatos como los ésteres salicílicos, entre los cuales se encuentra el érito acetyl-salicílico o aspirina.

Los salicilatos poseen tres acciones fundamentales, a saber la antirreumática, analgésica (acción central) y la anti-inflamatoria. Los salicilatos en concentraciones terapéuticas (0.5 a 2.0 mM/l) producen el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo que sucede a nivel mitocondria donde tienen lugar los procesos de oxidación celular, ya que disminuye la relación fosfato oxígeno es decir que se produce una falta de utilización del fosfato en la citada reacción. En esta forma, la energía producida por la oxidación se pierde en forma de calor en vez de ser utilizada para la formación de ATP y en concentraciones mayores puede inhibir las enzimas oxidativas celulares, evitar la activación de las enzimas citinógenas y antagonizar los efectos periféricos de las aminas (31).

Por vía bucal, los salicilatos se absorben rápidamente en el estómago y sobre todo en el intestino delgado. - Después de la ingestión de 1 a 6 gramos de salicilato de sodio, existe un nivel bastante alto ya a los 30 min, alcanzando el máximo a las 2 a 3 horas para descender luego, habiendo aún concentraciones registrables a las 24 horas. A nivel de intestino los ésteres del ácido salicílico como ácido acetil-salicílico se hidrolizan parcialmente de manera que los niveles en la sangre son semejantes a los encontrados con el salicilato de sodio aunque algo inferiores. En la sangre los salicilatos circulan combinados en un 70 a 80% con las proteínas, especialmente albúmina, que sirven de depósito de dichas drogas.

Los salicilatos se excretan principalmente por el riñón, cantidades insignificantes aparecen en heces, sudor, bilis y leche, teniendo una vida media de 6 horas. La actividad anti-inflamatoria de los salicilatos se considera que está mediada por la inhibición de la actividad de síntesis de prostaglandinas (32) o por una alteración de la migración leucocitaria, como es su efecto sobre el sistema de producción de energía que es el responsable del movimiento celular (33).

Los efectos del salicilato sobre la respiración son de fundamental importancia, porque contribuyen a las serias

*perturbaciones del equilibrio ácido-base que caracterizan al envenenamiento por esta clase de compuestos.*

*En los adultos y niños mayores se produce especialmente alcalosis; la misma es del tipo respiratorio y obedece a la hiperventilación pulmonar con pérdida de dióxido de carbono, elevación de pH sanguíneo, urinario y disminución de bicarbonato.*

*En los niños pequeños se produce con dosis elevadas - acidosis metabólica, con disminución de la reserva alcalina y descenso de pH sanguíneo. Acidosis debida a la presencia de ácidos correspondientes a los cuerpos cetónicos.*

*La ingestión de salicilato puede provocar dificultades epigástricas, náuseas y vómito. El salicilato puede - causar también ulceraciones gástricas y hasta hemorragia - en los animales de experimentación y en el hombre. La hemorragia gástrica inducida por el salicilato es indolora y produce a menudo pérdida de sangre en las heces, y ocasionalmente anemia por deficiencia de hierro.*

*En el hígado aumentan la secreción biliar y en el riñón dosis elevadas son capaces de llevar a la insuficiencia renal aguda con anuria.*



## NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES Y SU FUNCION

El neutrófilo polimorfonuclear o granulocito corresponde a aproximadamente 60% de los leucocitos circulantes en el humano. El neutrófilo maduro es primordialmente una célula fagocitaria con dos tipos diferentes de gránulos. - Estos gránulos son conocidos como gránulos primarios o azurófilos que contienen hidrolasas ácidas, mieloperoxidasas y lisozima; además, numerosas proteínas catiónicas que tienen actividad bacteriana y los gránulos secundarios o específicos que contienen lactoferrina y algo de lisozima. -- Del 80-90% de los gránulos son específicos y del 10-20% son gránulos azurófilos. El neutrófilo, una vez liberado de la médula ósea, circula con una vida media de 6-7 horas, - antes de perder su capacidad funcional (34). Su fuerte metabolismo oxidativo (35) podría contribuir a la corta vida de esta célula.

Su supervivencia en los tejidos, en condiciones de -- equilibrio estacionario, es aproximadamente de 4-5 días. - La liberación de granulocitos en el interior de la sangre periférica parece que está relacionado con la viscosidad - celular, la deformabilidad y un factor liberador que puede actuar sobre las sinusoides de la médula ósea.

Los neutrófilos son células con un importante papel -

en resistencia a la infección (38) ya que son capaces de emigrar hacia los estímulos (quimiotaxis) en presencia de numerosos factores quimiotácticos, incluyendo productos bacterianos, proteasas de los tejidos y componentes del complemento. Una vez localizado en las zonas inflamatorias, el neutrófilo es capaz de fijar e ingerir materiales apropiadamente opsonizados. Los neutrófilos tienen receptores de membrana para  $C_3$  y para la porción  $Fc$  de las inmunoglobulinas. Durante la fagocitosis aparece una secuencia compleja de eventos morfológicos y bioquímicos concomitantes que incluyen aumento en el metabolismo de fosfolípidos, captación creciente de oxígeno, incremento en la producción de peróxido de hidrógeno y en la actividad de la vía de la hexosamonofosfato (HMP).

La fagocitosis está compuesta de 4 fases interrelacionadas: quimiotaxis, opsonización, ingestión y destrucción.

**QUIMIOTAXIS.** Es el proceso mediante el cual los fagocitos son atraídos a la vecindad de los invasores patógenos. La quimiotaxis representa un cambio en la dirección de la movilidad de los leucocitos (es decir, polarización) pero no en su velocidad. La quimiotaxis puede reflejar -- real atracción lineal de los fagocitos o algún otro proceso más sutil, mediante el cual, la inhibición de la migración aleatoria de los neutrófilos mantiene los fagocitos -

en una zona una vez llegada la oportunidad. El fenómeno anterior ocurre claramente "in vitro" y se supone que se lleva a cabo también "in vivo".

**OPSONIZACION.** La función de las opsoninas del suero (preparar el alimento para) es la de reaccionar con los microorganismos y volverlos más susceptibles para su ingestión por los fagocitos.

**INGESTION.** Los leucocitos polimorfonucleares son fagocitos activos; la energía para este proceso se deriva de la glucólisis. Emplean en una vesícula fagocítica o fagosoma a las partículas o bacterias al ponerse en contacto con ellas.

**DEGRANULACION.** La destrucción de microorganismos susceptibles dentro de los neutrófilos está íntimamente asociada al proceso de degranulación, o sea, la liberación del contenido de los gránulos en el interior del fagosoma (37).

## C A P I T U L O   I I I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Se ha planteado este estudio con el objeto de medir - el efecto de los salicilatos sobre la capacidad quimiotáctica y fagocítica de células polimorfonucleares (PMN), de niños con artritis reumatoide juvenil, considerando la controversia de la literatura, respecto a que el ácido acetil-salicílico modifica la inflamación, por acción directa sobre la quimiotaxis.*

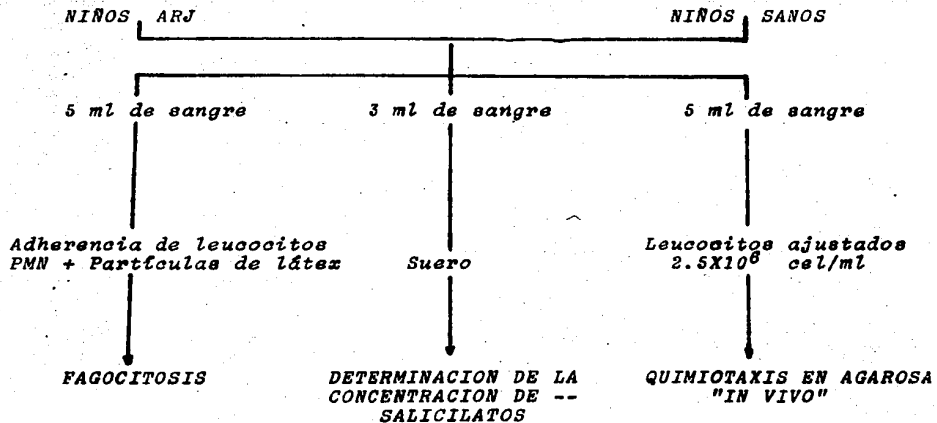
**OBJETIVOS:**

- 1.- *Estudiar la actividad quimiotáctica y fagocitosis de leucocitos polimorfonucleares en pacientes con artritis reumatoide juvenil.*
- 2 - *Determinar el efecto de los salicilatos sobre la actividad quimiotáctica "in vivo" e "in vitro" de leucocitos polimorfonucleares en pacientes con artritis reumatoide juvenil.*
- 3.- *Evaluar la concentración de complejos inmunes en el suero de pacientes con artritis reumatoide juvenil.*
- 4.- *Determinar la concentración de salicilatos a diferentes tiempos en el suero de pacientes tratados con artritis reumatoide juvenil*

**HIPOTESIS:**

*Los salicilatos modifican la actividad quimiotáctica de leucocitos polimorfonucleares "in vivo" e "in vitro" en pacientes con Artritis reumatoide juvenil. La actividad fagocítica se mostrará disminuida y la concentración de -- complejos inmunes aumentada en los niños con Artritis reumatoide juvenil con respecto a los niños sanos.*

DISEÑO EXPERIMENTAL

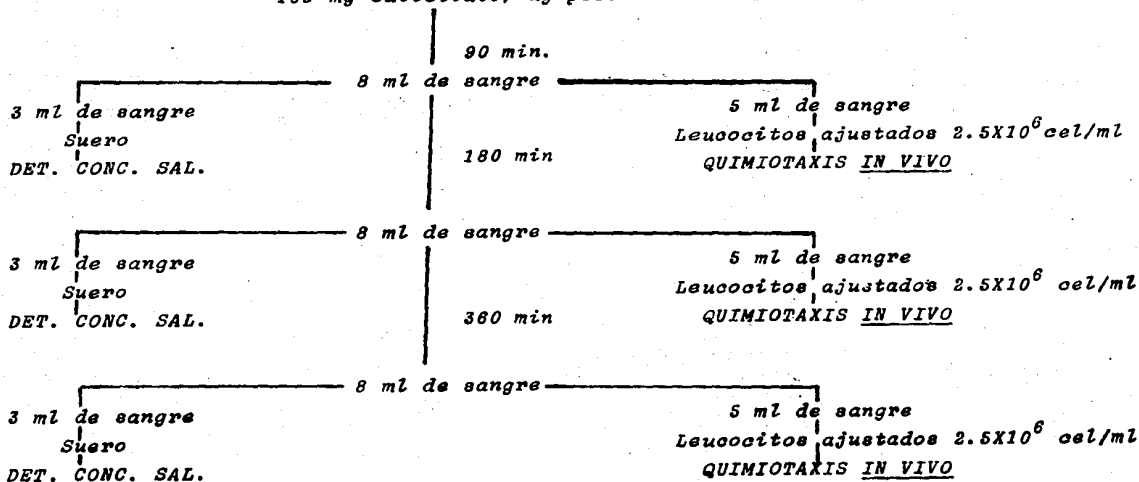


Primera Parte

**NIÑOS CON ARJ**

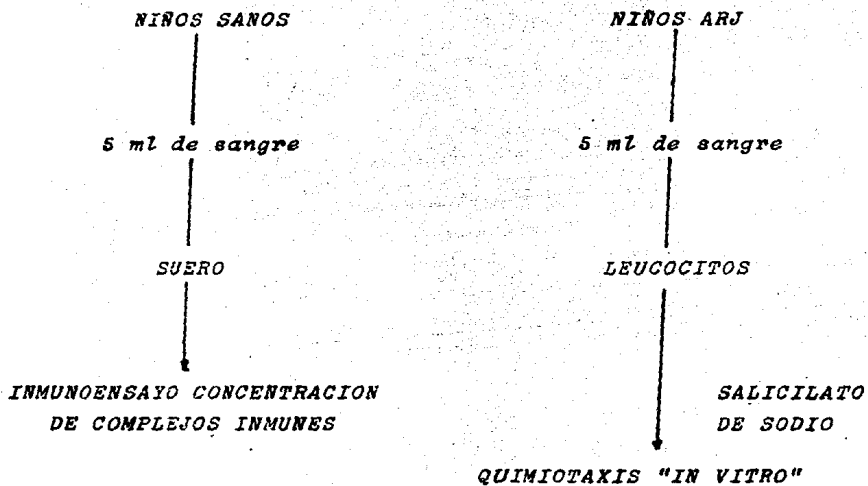
**DOSIS**

100 mg salicilato/ Kg peso



**NOTA:** Después de la ingestión de la dosis de salicilatos se procedió a tomar muestras de sangre a los 90 min., 180 min. y 360 min., realizando a cada muestra el estudio descrito.





## C A P I T U L O   I V

### MATERIAL

- Mechero Fisher
- Cubreobjetos (22 x 22 mm)
- Portaobjetos
- Pipetas de leucocitos con boquilla
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Pipetas graduadas de 0.1, 0.2, 1, 2, 5 y 10 ml.
- Nivel
- Jerigas de plástico y vidrio de 1, 5, 10 y 20 ml.
- Termómetro de -10 a 120°C
- Tabla niveladora
- Micropipeta de 10 ul.
- Puntas de plástico de 10 ul.
- Plantilla y horadador
- Perlas de vidrio
- Cámara de Neubauer
- Tubos de vidrio y plástico de 12 x 75
- Tubos de vidrio de 13 x 100
- Tubos con tapón de rosca de 25 y 50 ml.
- Tubos con tapón de rosca de 12 x 120 y 12 x 150
- Tubos cónicos de plástico para centrifuga de 15 ml.

- *Probetas de 25, 100 y 500 ml.*
- *Matraces aforados de 100, 500 y 1000 ml.*
- *Matraces Erlenmeyer de 300 ml.*
- *Vasos de precipitado de 300 y 500 ml.*
- *Cajas Petri de plástico de 35 x 10 mm (Falcon, Oxnard, Calif.)*
- *Frascos(viales) de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml.*
- *Frascos de 19 x 48 mm.*
- *Gradillas*
- *Piseta de 500 ml.*
- *Filtros y papel filtro de 0.45 um.*
- *Espátulas; perillas, ligaduras, algodón, gasas, ligas, etc.*

#### APARATOS

- *Contador de laboratorio; Clay Adams*
- *Micrómetro: Hyland*
- *Microscopio: Carl Zeiss West Germany*
- *Bomba de vacío: International Scientific*
- *Estufa: Cole-Parmer/ Instrument-Company*
- *Baño María: Modern Scientific Research*
- *Centrifuga: IEC (International Equipment Company).*
- *Potenciómetro: International Scientific.*

- *Balanza analítica: Sartorius.*
- *Incubadora: Lab-line Instruments*
- *Espectrofotómetro: Pye UNICAM SP8-100*
- *Fotómetro*
- *Mezclador*
- *Congelador*
- *Refrigerador*

#### REACTIVOS

- *Acido clorhídrico 0.1 y 1 N(P)*
- *Acido nítrico 0.07 N (P)*
- *Aceite de inmersión*
- *Agarosa (Tipo 1, low EEO-SIGMA)*
- *Albumina humana al 25% en solución (Albumex).*
- *Azul de tripan al 0.1 (P)*
- *Bicarbonato de sodio*
- *Cloruro de amonio al 0.85% (P)*
- *Cloruro de sodio*
- *Cloruro de potasio*
- *Colorante de Wright (P)*
- *Dextrosa*
- *Estándar de salicilato 10 mg/100 ml (P)*
- *Estreptomina "s"*

- Etanol al 70% (P)
- Fosfato ácido de sodio
- Fosfato ácido de potasio
- Fosfato diácido de potasio
- Formaldehído al 4%
- Hidróxido de sodio 0.1 N (P)
- Heparina 1000 UI/ml (Lab. Reforma)
- Medio de RPMI 1640 (Grand Island Biological Company)
- Metanol absoluto
- Nitrato férrico al 1% (P)
- Partículas de látex (Behring-Institute)
- Penicilina "G" sódica
- Resina sintética al 60% en Xilol (sigma)
- Solución buffer de Hanks (HBSS) (P)
- Solución salina isotónica al 0.9% (P)
- Solución buffer reguladora de pH a 7.0 (Sigma)
- Discos cubiertos con  $C_{12}$
- Antisuerpos anti-inmunoglobulina humana G y M marcados con fosfatasa alcalina
- Control positivo fuerte (liofilizado)
- Control positivo débil (liofilizado)
- Control negativo
- Diluyente (6% albúmina sérica bovina, 0.05% Tween 20 en 0.01 M de buffer fosfato)
- Fosfato de p-nitrofenil (P-NPP) substrato

- Solución amortiguadora de bicarbonato de sodio
- Solución de hidróxido de sodio. 3 M
- Solución amortiguadora de pH a 4.0 (Sigma)
- Tabletas de ácido acetilsalicílico de 300 mg. Carbonato de calcio 90 mg. Ácido cítrico 30 mg. Excipiente - c.b.p. 1 tableta (soluble) (ANDRE BIGAUX)
- Xileno
- Zimosan A (Sigma-Chemical-Company)

(P) Se prepararon en el laboratorio

#### MATERIAL HUMANO

#### GRUPO PROBLEMA:

Se formó con 12 niños de artritis reumatoide juvenil, que asistían a consulta en el laboratorio de inmunología, Hospital de Pediatría. Sus edades se encontraban entre 11 y 14 años. Se incluyeron en el estudio sólo niños con la enfermedad confirmada y que no hubieran recibido tratamiento en las dos últimas semanas previas al estudio.

#### GRUPO TESTIGO:

Este grupo se formó con 12 niños de edades similares

al grupo problema considerados sanos, que acudieron al laboratorio para estudios preoperatorios y que no presentaban procesos infecciosos, ni se encontraban en tratamiento con antibiótico, en las dos últimas semanas anteriores al estudio.

#### DOSIS DEL MEDICAMENTO:

A cada niño con artritis reumatoide juvenil se le dió a ingerir 100mg de ácido acetil-salicílico (en forma de tabletas) por kilogramo de peso. Todos los niños fueron pesados con anterioridad (31). De aquí se procedió a realizar las pruebas de concentración de salicilato en suero y quimiotaxis en agarosa (in vivo), a los 90, 180 y 360 min después de la ingestión de salicilato.

## METODOS

A) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE SALICILATOS EN - -  
SUERO*Obtención del suero:*

Se obtuvieron 3 ml de sangre por punción venosa de pacientes con artritis reumatoide juvenil y de pacientes sanos. La sangre se dejó coagular y se centrifugó a 200xG durante 10 min. El suero fue separado y conservado a -70°C hasta obtener el de todos los niños. A cada niño con artritis reumatoide juvenil se le dió a ingerir la dosis del medicamento indicada, elaborándose el siguiente programa de toma de muestra:

*Primera muestra: Cero min antes de ingerir la dosis del medicamento.*

*Segunda muestra: 90 min después de la ingestión de la dosis de ácido salicílico.*

*Tercera muestra: 180 min después de la ingestión de la dosis de ácido salicílico.*



*Cuarta muestra: 360 min después de la ingestión -  
de la dosis de ácido salicílico.*

*Tanto los sueros de niños con artritis reumatoide  
juvenil como los sueros de niños (testigos) fueron tra-  
tados de la manera siguiente:*

<i>TUBOS</i>	<i>PROBLEMA</i>	<i>BLANCO</i>
<i>ml de agua destilada</i>	<i>0.8</i>	<i>0.8</i>
<i>ml de suero problema o testigo</i>	<i>0.2</i>	<i>0.2</i>
<i>ml de nitrato férrico 1%</i>	<i>1.0</i>	<i>1.0</i>
<i>ml de ácido nítrico 0.07 N</i>	<i>-</i>	<i>1.0</i>

*Se mezclaron los reactivos en el orden señalado, -  
agitando después de cada adición y se dejaron reposar -  
por 5 min a temperatura ambiente. El color es estable  
durante una hora. La lectura de los tubos se realizó -  
con su blanco respectivo a 540 nm. La absorbencia obte-  
nida de los problemas y testigos se interpoló en la cur-  
va de calibración para así obtener la concentración de  
salicilatos.*

*Preparación de la curva de calibración:*

*En tubos de 12x75 mm se colocaron diluciones del -*

estándar de salicilato 10 mg/100 ml según se indica en la siguiente tabla:

TUBOS	A	B	C	D	E	BLANCO
ml del estándar 10 mg/100 ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
ml de agua destilada	0.8	0.6	0.4	0.2	-	1.0
ml de nitrato férrico 1%	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
mg de salicilato/100 ml	2	4	6	8	10	-
mM/l de salicilato	.14	.28	.43	.57	.72	-

La lectura de los tubos también se realiza a 540 nm frente a su blanco de reactivos.

## B) FAGOCITOSIS CON PARTICULAS DE LATEX

Obtención de las muestras:

De los pacientes y controles se obtuvo por punción venosa 5 ml de sangre, la cual fue defibrinada por agitación suave con 8 a 10 perlas de vidrio de 5 mm, al inicio de la coagulación.

Obtención de leucocitos polimorfonucleares (PMN);

Con el objeto de obtenerlos libres de eritrocitos,

se empleó el procedimiento de adherencia al vidrio. Para ello se utilizaron cubreobjetos desengrasados. Se depositó 0.7 ml de sangre desfibrinada sobre cada uno de ellos y se incubaron a 37°C durante 45 min en cámara húmeda. Luego se lavaron con solución de Hanks a pH=7 para eliminar las células no adherentes y suero.

#### Prueba de fagocitosis:

Los PMN adheridos a los cubreobjetos aún húmedos - del lavado anterior, se depositaron en cámara húmeda e inmediatamente se cubrieron con 0.5 ml de una mezcla de suero autólogo y 100 ul de una suspensión de partículas de látex dilución 1:100 incubándose nuevamente a 37°C - durante 30 min.

Al término de esta incubación, se volvieron a enjuagar con HANKS a pH=7 para retirar el suero y las partículas de látex no fagocitadas. Los cubre-objetos se dejaron escurrir y secar al aire. Posteriormente se tiñeron (Método Wright) y por último se montaron invertidos con Bálsamo de Canadá sobre porta-objetos con identificación del caso.

El índice fagocítico se determinó contando en el -

*microscopio de inmersión el número de partículas de látex fagocitadas por cada 300 PMN y el porcentaje de células fagocitantes se realizó contando el número de PMN que contenían por lo menos una partícula de látex y el número de células que no contenían ninguna. Se observó en campos microscópicos sucesivos de cada preparación, contando también 300 células.*

#### *Tinción de Wright*

*Se taparon los cubre-objetos con colorante de Wright durante 5 min y se agregó agua destilada, enseguida se mezcló soplando con pipeta Pasteur. Posteriormente se dejaron reposar durante 5 min y se lavaron con agua destilada. Por último, se dejaron secar al aire.*

### **C) QUIMIOTAXIS EN AGAROSA**

#### **MODELO "IN VIVO"**

##### **Obtención de Leucocitos:**

*La sangre obtenida de pacientes y controles fue heparinizada (10 a 20 unidades de heparina/ml de sangre)*

y colocada en tubos cónicos de 15 ml. Los eritrocitos fueron sedimentados por gravedad a 37°C durante 1 hr. - Los polimorfonucleares fueron obtenidos por centrifugación del plasma rico en leucocitos por medio de tres lavados con 5 ml de HBSS a pH=7 durante 10 min a 200xG en cada lavado. Las células lavadas fueron resuspendidas en 1 ml de Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI 1640) adicionado con 15% de albúmina humana al 25% en solución a pH=7. La cuenta de leucocitos fué realizada en cámara de Neubauer usando como colorante azul de Tripan diluido 1:4 y ajustado a pH=7. Las células se ajustaron a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  PMN/ml. La viabilidad de las células no fue menor del 90% en cada experimento.

#### Activación del Suero con Zimosan (ZAS):

A 1 ml de suero (paciente sano) se le agregaron 40 mg de Zimosan A, el cual fue mezclado e incubado a 37°C por 30 min. Se centrifugó a 900xG durante 5 min. El sobrenadante fue separado en alícuotas y guardado en congelación a -20°C.

10 ul del sobrenadante (ZAS) fueron colocados en el pozo izquierdo con respecto al central de cada serie de 3 pozos, se dejó en incubación durante 1 h a 37°C, -

antes de agregar las células (PMN): 10 ul de RPMI adicionado con 15% de albúmina humana al 25% fueron colocados en el pozo de la derecha con respecto al central de cada serie de 3 pozos. 10 ul de la suspensión de PMN - ( $2.5 \times 10^6$  células) fueron colocadas en el pozo central de cada serie de 3 pozos.

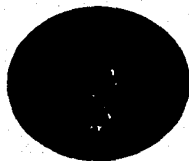
Las cajas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire durante 24 h. (Figura No. 1). Cada experimento fue realizado por triplicado, tomando en cuenta el promedio.

#### *Fijación, Tinción y Lectura:*

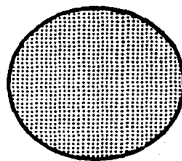
La fijación de las células a las cajas se realizó con 3 ml de formaldehído al 4% durante 30 min. Se lavaron con solución salina isotónica al 0.9% durante 5 min. El gel fue removido cuidadosamente. Las cajas -- fueron teñidas con colorante de Wright, enjuagadas con agua corriente y secadas al aire. La lectura de migración de las células se realizó por medio de un micrómetro con escala en mm (Figura No 2).

FIGURA No. 1

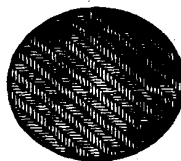
COLOCACION DE LA MUESTRA PROBLEMA



SUERO CON  
ZIMOSAN



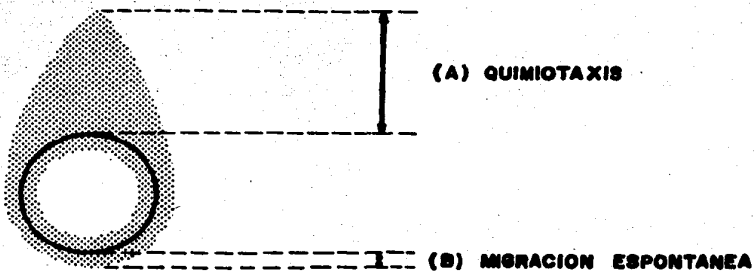
CELULAS  
PMN



MEDIO RPMI +  
ALBUMINA 15 %

SERIE DE 3 POZOS

FIGURA No. 2



FORMA DE CUANTIFICAR LA MIGRACION



MODELO "IN VITRO"

Por lo que se refiere a obtención de leucocitos, - preparación de la agarosa y la activación de suero con Zimosan fue el mismo procedimiento descrito en la técnica "in vivo".

Los leucocitos obtenidos fueron resuspendidos en - 1 ml de Hanks. Por otra parte, se efectuaron diluciones en tubos cónicos de un estándar de 20 mg de salicilato disueltos en 100 ml de Hanks adicionado con 15% de albúmina humana de la siguiente manera:

TUBO	DILUCION	CONCENTRACION DE SALICILATO mg/100ml	SALICILATO mM/ 1
1	1:2	10	0.724
2	1:4	5	0.362
3	1:8	2.5	0.140

Las células fueron distribuidas en los tres tubos. Se incubaron durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, posteriormente se realizó un lavado de las células con 5 ml de Hanks a pH=7.0, 200 XG por 10 min. - Se ajustó a una concentración de 2.5 X 10<sup>6</sup> células/ml.

En cada caja Petri fueron colocados 10 ul de suero

activado con Zimosan en el pozo izquierdo con respecto al central de cada serie de 3 pozos, se dejó en incubación 1 hr a 37°C, antes de agregar las células (PMN). - 10 ul de RPMI adionado con 15% de albúmina humana al 25% fueron colocados en el pozo de la derecha con respecto al central de cada serie de 3 pozos. 10 ul de la suspensión de PMN se colocaron en el pozo central de cada serie.

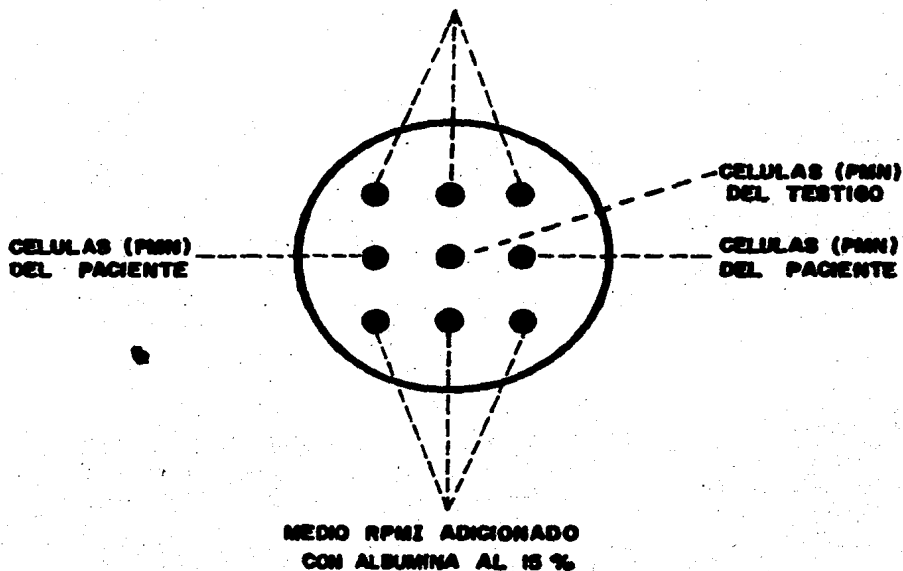
Las cajas permanecieron en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire por 24 hrs. (Figura No. 3). -- Cada experimento se realizó por triplicado, tomando en cuenta el promedio de cada uno.

Con lo que respecta a la fijación, tinción, y lectura de las cajas fue similar a la técnica "in vivo".

FIGURA N.º 3

ESQUEMA QUE MUESTRA LA COLOCACION DE LAS CELULAS EN -  
CADA POZO DE LA CAJA PETRI TANTO EN EL MODELO "IN VIVO"  
COMO "IN VITRO".

10 UL DE ZAS (SUERO ACTIVADO CON ZIMOBAN)



NOTA: EN EL MODELO "IN VITRO" SE INTERCALARON CELULAS -  
PMN DE CADA DILUCION (VARIACION DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALICILATO)

D) INMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE COM-  
PLEJOS INMUNES CIRCULANTES.

Se colectó asépticamente una muestra de sangre (No menos de 0.5 ml) en un tubo. Se dejó coagular y se separó el suero. Las muestras se conservaron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La preparación de la curva estándar se realizó con 1 control negativo, 1 control positivo débil, 1 control positivo fuerte sin diluir y una serie de diluciones -- del control positivo fuerte 1:4, 1:16 y 1:64. La curva se realizó por duplicado.

También se realizó la dilución correspondiente de los sueros problemas. Se corrieron al mismo tiempo todas las pruebas.

Los frascos se mezclaron perfectamente. Se añadió a cada frasco un disco acoplado con  $C_{2q}$  (con las pinzas especiales para transferir discos). Los frascos se agitaron suavemente para asegurarse de que los discos se sumergieran en las muestras y controles. Los frascos se incubaron en un baño con agua en agitación a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 45 min. Se utilizó un agitador fijo de mo-

do que el contenido estuviera en movimiento suave y - - constante.

Después de 45 min de incubación, los frascos se retiraron del baño y se colocaron en un baño con hielo -- (0°C). Todos los frascos y discos se lavaron 3 veces - con solución salina (0.9%) ajustada a un pH de 7.2 a 8.0 La solución de lavado se aspiró completamente después - del último lavado. Los discos se transfirieron a cada frasco a otra serie de viales limpios en el mismo orden.

Se colocó 0.5 ml del anticuerpo marcado con enzima anti-inmunoglobulina humana G y M en cada frasco. Los frascos se incubaron en un baño con agua en agitación a 37°C  $\pm$  2°C por 45 min. El substrato de fosfato de p-ni-trofenil se preparó en el segundo periodo de incubación. Manteniéndolo a una temperatura de 2°C a 8°C. Los frascos se retiraron del baño con agua después de los 45 -- min de incubación y se colocaron en un baño con hielo - (0°C). Cada frasco se lavó 3 veces con solución salina 0.9% y se aspiró toda la solución de lavado después del último lavado. Los discos se transfirieron a una tercer serie de frascos. A cada frasco se le añadió 1.0 ml -- del substrato. Los frascos se incubaron en el baño con agua en agitación por 20 min a 37°C  $\pm$  2°C, al final del -

período de incubación, los frascos se quitaron del baño con agua y se colocaron en un lugar seco.

Tan pronto como fué posible, se añadieron 2 gotas de solución de hidróxido de sodio 3 M (aproximadamente 0.1 ml) a cada frasco para detener la reacción. Los frascos se retiraron para poder mezclar su contenido.

#### Lectura de los resultados:

La lectura se realizó antes de que pasaran 2 h después de que la reacción fué detenida. Los resultados se leyeron en un fotómetro a una absorbencia de 405 nm con un volumen de muestra de 0.7 ml o menos. Las lecturas se registraron como unidades de absorbencia por 1000. El aparato se ajustó a cero con un blanco de agua destilada. Después de la lectura de cada muestra, se lavó la cubeta con agua destilada.

#### Análisis Estadístico:

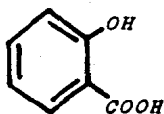
Los resultados de concentración de salicilato en suero a diferentes tiempos y la concentración de complejos inmunes se trataron con la prueba de t de Student. Los resultados de la actividad quimiotáctica y fagocítica

ca se trataron con métodos no paramétricos como fue el contraste de la U de Mann Whitney (45), con un límite de confianza del 95%.

## FUNDAMENTO METODOLOGICO

### A) DETERMINACION DE CONCENTRACION DE SALICILATO EN SUERO.

Esta técnica aprovecha la naturaleza fenólica del salicilato para hacerlo reaccionar con una sal férrica y formar un complejo de color violeta. La inhibición del color por adición de los fosfatos y oxalatos se impide mediante el empleo del nitrato férrico en concentraciones altas (38).



+ Fe<sup>+++</sup> = complejo de color violeta

Los valores del testigo para suero son menores de 1.1 mg/100ml.

### B) FAGOCITOSIS CON PARTICULAS DE LATEX

Este método aprovecha la propiedad de los leucocitos polimorfonucleares de adherirse al vidrio y de ingerir determinadas sustancias, llamándose a este fenómeno fagocitosis.



Las muestras de sangre utilizadas para la obtención de los polimorfonucleares se desfibrinaron con el objeto de evitar el uso de anticoagulantes tales como los agentes quelantes y la heparina, ya que se ha informado que el EDTA, el citrato y el oxalato sustraen los iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  del medio, los cuales son necesarios para la acción fagocítica.

Dado que los polimorfonucleares tienen tendencia a adherirse a la superficie de vidrio, las muestras de sangre desfibrinada se colocaron inmediatamente sobre cubreobjetos con el propósito de evitar la pérdida o se lección de la población de los PMN adheribles al vidrio del tubo de ensayo.

El lavado de los fagocitos con solución de Hanks permitió eliminar en lo posible las proteínas séricas que pudieran activar la fagocitosis, salvo las que pudiesen haber quedado atrapadas entre la superficie adherente de los PMN y el vidrio, o absorbidas fuertemente en la células.

Empleando este método, se pudieron obtener preparaciones que contenían en forma casi pura los PMN, salvo los monocitos y eosinófilos que también se adhirieron -

al vidrio. La desfibrinación de la sangre evitó la presencia de las plaquetas que también son adherentes (39, 40).

### C) QUIMIOTAXIS EN AGAROSA

El método de quimiotaxis de leucocitos humanos es-  
ta basado en la migración de células en un gel de agarosa. Este método tiene aplicación tanto para leucocitos polimorfonucleares como para monocitos, de los cuales mide quimiotaxis y migración espontánea. La quimiotaxis de neutrófilos esta definida como una migración activa y dirigida de las células hacia un gradiente de --  
substancias, las que atraen a las células. La cuantificación de migración es hecha por la medición de la distancia que las células recorrieron del margen del pozo hacia el factor quimiotáctico (A= Quimiotaxis) y la distancia que las células recorrieron del margen del pozo hacia el medio sin factor quimiotáctico (B= Migración -  
espontánea). Únicamente polimorfonucleares y monocitos contribuyen a los patrones de migración, los linfocitos no entran en el estrecho espacio entre la agarosa y el fondo de la caja Petri. Durante el período de incubación del ZAS en las cajas antes de agregar las células

ocurre la difusión radial del factor quimiotáctico en el pozo donde se encuentra para establecer un gradiente de concentración entre éste pozo y el pozo que contiene las células, las cuales migran espontáneamente fuera del pozo de donde fueron colocadas bajo la influencia del gradiente y el movimiento es unidireccional hacia la alta concentración del gradiente. Por otra parte la migración espontánea de las células hacia el tercer pozo que contiene el medio de RPMI no se ve influenciada por el gradiente provocado por Zimosan y continua su migración al azar.

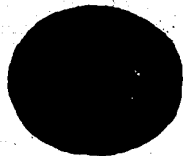
La presencia de albúmina en la agarosa es esencial, sin albúmina la migración de las células es significativamente menor y muy irregular, además el gel de agarosa libre de albúmina no puede ser removido en forma intacta de la caja Petri después de la fijación. Concentraciones de albúmina o suero en el medio de agarosa tan bajas como 1.25% permiten remover el gel y muy baja variabilidad de migración.

2.4 mm es la distancia ideal entre los pozos acaso porque una distancia mayor podría llevar a un exceso de dilución del factor quimiotáctico en la agarosa (Figura No. 4). El efecto del número de células podría resul--

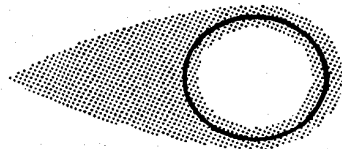
tar de una respuesta a un gradiente de nutrientes, gas o productos metabólicos los cuales son agotados o acumulados durante el tiempo del experimento. La respuesta de las células al gradiente quimiotáctico no aumenta -- proporcionalmente, resultando una disminución del índice quimiotáctico con un número de células incrementado. La utilización de albúmina en la agarosa es debido también a que el suero contiene activadores o inhibidores de la quimiotaxis o migración espontánea, sin embargo, concentraciones altas de albúmina sí inhiben la migración de las células (41, 42, 43).

FIGURA No 4

ESQUEMA QUE MUESTRA EL MOVIMIENTO  
DE MIGRACION DE LAS CELULAS

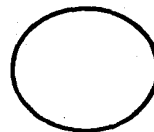


BUERO CON  
ZIMOSAN



CELULAS  
PMN

QUIMIOTAXIS



MEDIO RPMI +  
ALBUMINA 15 %

MIGRACION  
ESPONTANEA

**C) INMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES.**

La formación de complejos inmunes (CI) por la interacción de anticuerpos con antígeno es parte de la respuesta inmune humoral. Un número de métodos, basados en varios principios, pueden ser usados para detectar y - cuantificar complejos inmunes. Debido a la composición compleja y tamaño del complejo inmune, estos experimentos no necesariamente detectan al mismo complejo inmune y consecuentemente dan diferentes resultados.

Los métodos basados en la reacción entre la porción Fc de inmunoglobulinas en el complejo inmune y una de -- las subunidades del primer componente del complemento --  $C_{1q}$  son quizás los más comúnmente usados por su simplicidad y especificidad (44).

El  $C_{1q}$  purificado se adhiere a un disco especial. -- La muestra diluida apropiadamente se incuba con uno de -- los discos cubiertos de  $C_{1q}$ . Complejos inmunes (conteniendo inmunoglobulina G y/o inmunoglobulina M) si están presentes en la muestra se combinarán con el  $C_{1q}$  unido -- al disco. El disco se lava para remover toda la muestra residual y se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina hu

mana G y M marcadas con fosfatasa alcalina (anti-inmunoglobulina marcada con enzima). La anti-inmunoglobulina marcada con enzima se unirá inmunológicamente al anticuerpo en la porción en que el complejo inmune se combinó con  $C_{1q}$  en el disco durante la primera incubación, -- por lo cual se forma el complejo:

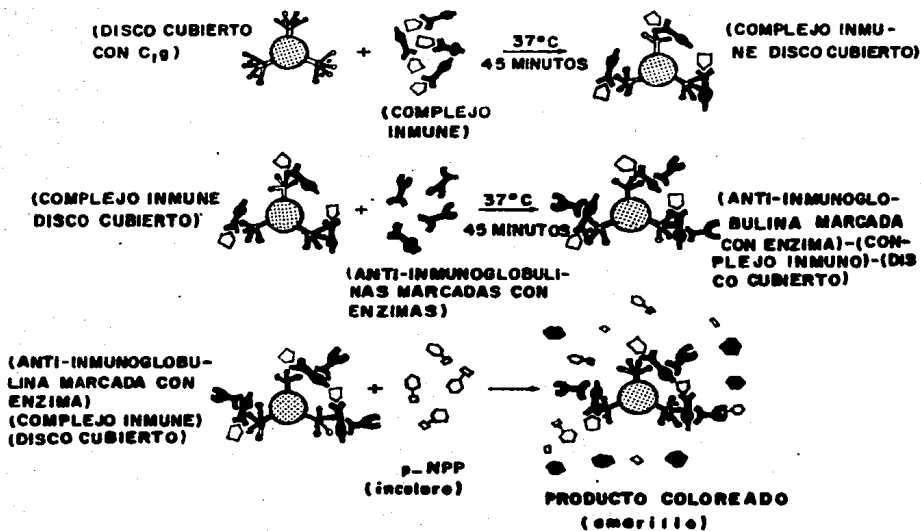
(disco acoplado con  $C_{1q}$  - complejo inmune)  
(anti inmunoglobulina marcada con enzima)

Después del lavado, se añade una mezcla de agente reductor y sustrato. La enzima marcada se libera por acción del agente reductor y la hidrólisis enzimática -- que se origina al reaccionar la enzima con el sustrato da como resultado un producto de color amarillo (p-nitrofenol).

Se añade hidróxido de sodio para parar la hidrólisis enzimática. La absorbencia es proporcional a la concentración de complejos inmunes y se mide con un fotómetro (Figura No. 5).

FIGURA No. 5

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA DETERMINACION DE COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL.



Ref. (59)



## C A P I T U L O V

### RESULTADOS

#### *Características de los Niños Estudiados:*

Se estudiaron un total de 24 niños, que se agruparon de la siguiente manera: el primer grupo se formó con 12 testigos sanos, 5 mujeres y 7 hombres con edades comprendidas entre 8 y 14 años y el segundo grupo integrado por 12 niños con artritis reumatoide juvenil, cuyas edades fluctuaban entre 11 y 14 años (Tabla No. 1). Algunos de estos niños ya tenía un período de tratamiento con ácido acetil-salicílico comprendido de 3 meses a 3 años antes de este experimento.

#### *Concentración de Salicilatos en Suero:*

En la Gráfica No. 1 y Tabla No. 2 se observa que la --concentración de salicilatos "máxima" encontrada en el suero de la mayoría de los pacientes es a los 90 min, sin embargo en algunos pacientes la concentración "máxima" de salicilatos se obtuvo a los 180 min.

Debido a esta discrepancia en tiempos (90 y 180 min) --de concentración "máxima" para confirmar si la mayor concen

tración de salicilato en suero provoca el mayor efecto sobre la quimiotaxis, fué necesario hacer otro tipo de gráfica en la cual se tabularon los resultados tomando en cuenta únicamente la concentración máxima de salicilato y la concentración mínima de salicilato sin tomar en cuenta el tiempo en el cual se tomaron las muestras, observándose que todos los pacientes sufren el mismo fenómeno (Tabla No. 3 y Gráfica No. 2).

Con ello, al hacer comparación de grupos, la diferencia estadística en cuanto a concentración fué significativa en todos los casos (Tabla de estadística No. 2). Al grupo de testigos sanos se les tomó la muestra en las mismas condiciones (Omin sin dosificación) que a los pacientes, se encontró similar concentración de salicilato en suero.

Quimiotaxis en Agarosa:

Modelo "IN VIVO"

Se estudió el efecto de las diferentes concentraciones de salicilato encontradas en el suero de cada paciente sobre la actividad quimiotáctica (Tabla 4, Gráfica No. 3) para ello se compararon los diferentes grupos entre sí, obteniéndose las siguientes estadísticas de migración. Grupo A (basal, antes de la ingestión de salicilato) con  $\bar{x} = 0.7947$

0.2 contra Grupo B (Concentración máxima de salicilato encontrada en suero) con  $\bar{x} = 0.566 \pm 0.2$ , Significativa ( $p < 0.001$ ); Grupo A contra Grupo C (La concentración intermedia de salicilato encontrada en suero de pacientes) con  $\bar{x} = 0.738 \pm 0.2$  es Significativa ( $p < 0.001$ ); Grupo A contra Grupo D (La concentración mínima de salicilato encontrada en suero) con  $\bar{x} = 1.03 \pm 0.2$  es Significativa ( $p < 0.001$ ); Grupo B contra Grupo C, Significativa ( $p < 0.001$ ). Grupo B contra Grupo D, Significativa ( $p < 0.001$ ) y Grupo C contra Grupo D, Significativa ( $p < 0.001$ ). Tabla de estadística No. 3.

Con lo cual se observa que a concentración mayor de salicilato en suero, la actividad quimiotáctica se encuentra disminuida y a concentración mínima de salicilato la quimiotaxis se encuentra aumentada.

Sin embargo al comparar individualmente cada caso, se observa que existen pacientes que presentan alta concentración de salicilato en suero y su actividad quimiotáctica no se observa tan disminuida como en el caso de otros pacientes.

La Tabla No. 5 presenta los datos obtenidos al medir el % de incremento y el % de decremento de la actividad quimiotáctica con respecto a la quimiotaxis basal antes de la ingestión de salicilato en presencia de las diferentes concen-

traciones de salicilato en suero (cada caso por separado). Estos datos se graficaron (gráfica No. 4) comparándose entre sí los resultados obtenidos de cada grupo, presentando diferencias estadísticas significativas en todos los grupos (Tabla estadística No. 4).

En esta gráfica No. 4 se observa claramente que a la concentración mayor de salicilato encontrada en suero - - - ( $\bar{x} = 0.248$ ) sucede un % de decrecimiento en la quimiotaxis - - - ( $\bar{x} = -27.99$ ) con respecto a la quimiotaxis basal de cada paciente y en la concentración mínima de salicilato ( $\bar{x}=0.191$ ) existe un % de incremento de la quimiotaxis ( $\bar{x} = +27.8$ ) con respecto a la basal.

Estas observaciones no pueden interpolarse en todos -- los casos, ya que algunos pacientes no logran incrementar -- su quimiotaxis arriba de la basal a los 380 min después de la ingestión de salicilato.

#### **Migración Espontánea de Agarosa:**

##### **Modelo "IN VIVO"**

Se investigó también el efecto de las diferentes con-- centraciones de salicilato sobre la migración espontánea de leucocitos polimorfonucleares en pacientes con artritis reu

matoide juvenil (Tabla No. 6, Gráfica No. 5). Se observó - que la concentración mayor de salicilato provocó disminución sobre la migración espontánea, no significativa estadísticamente y a la concentración menor de salicilato hubo un pequeño incremento en la migración. Los resultados de migración fueron comparados estadísticamente (Tabla de estadística No. 5). Grupo A (basal) con  $\bar{x} = 0.320 \pm 0.05$  contra Grupo B (concentración máxima) con  $\bar{x} = 0.305 \pm 0.03$ , la diferencia fue no significativa ( $p > 0.05$ ); Grupo A contra Grupo C (concentración intermedia) con  $\bar{x} = 0.334 \pm 0.04$ , no significativa ( $p > 0.1$ ); Grupo A contra Grupo D (concentración mínima) con  $\bar{x} = 0.319 \pm 0.07$ , significativa ( $p < 0.01$ ). Grupo B contra Grupo C la diferencia fue no significativa ( $p > 0.1$ ); Grupo C contra Grupo D fue significativa ( $p < 0.01$ ).

En la tabla No. 7, Gráfica 6, se observa detalladamente el % de decremento que sufre la migración espontánea a la mayor concentración de salicilato y el % de incremento sobre la migración a la concentración mínima de salicilato. Las diferencias estadísticas entre cada grupo son reportadas en la tabla estadística No. 6.

La Tabla No. 8 y la Gráfica No. 7 muestran un esquema general del efecto de la concentración de salicilato sobre la actividad quimiotáctica y migración espontánea de leuco-

citos polimorfonucleares. En el cual se observan dos casos claramente, al haber una substancia quimiotáctica presente ésta induce un gran desplazamiento de las células hacia él, lo cual se ve modificado por la introducción de salicilatos que a altas concentraciones provocan una inhibición en la migración y a bajas concentraciones un aumento de migración mayor, que el factor quimiotáctico.

#### Quimiotaxis en Agarosa

##### Modelo "IN VITRO"

También se observó el efecto de la concentración de salicilatos sobre la actividad quimiotáctica de leucocitos -- polimorfonucleares en pacientes con ARJ. En la Tabla No. 9 Gráfica No. 8 se expresan los valores en % de incremento o % de decremento de la quimiotaxis en presencia de las diferentes concentraciones de salicilato, en el medio de incubación, comparadas con la quimiotaxis sin medicamento (Basal). Los resultados obtenidos fueron que a concentración mayor de salicilato (0.729 mM/l), las células muestran un mayor % de decremento en la migración con  $\bar{x} = -22.85$  y a la concentración menor (0.140 mM/l) de salicilato un % de incremento con  $\bar{x} = +27.0$  en la quimiotaxis, con respecto a la migración quimiotáctica basal. Este fenómeno se repitió al igual que en el modelo "in vivo", únicamente que la distancia de migración en cada caso es menor. Los resultados de cada --

grupo de concentración de salicilato, se compararon estadísticamente siendo la diferencia significativa con  $p < 0.001$  -- (Tabla estadística No. 8).

### Migración Espontánea en Agarosa

#### Modelo "IN VITRO"

Al igual que el modelo "in vivo" se observó el efecto de las diferentes concentraciones de salicilato a las que fueron expuestas las células sobre la migración espontánea de leucocitos polimorfonucleares (Tabla No. 10, Gráfica No. 9). Los valores obtenidos son expresados en % de incremento y % de decremento de migración con respecto a la migración espontánea, sin influencia de salicilato. La forma de comportamiento de este fenómeno es similar al modelo "in vivo", en el cual a la concentración mayor de salicilato (0.729 mM/l) existe un decremento en la migración, pero al compararla estadísticamente con la concentración de salicilato 0.362 mM/l (intermedia), la diferencia es no significativa ( $p > 0.05$ ), tabla estadística No. 9 y a la menor concentración de salicilato 0.140 mM/l existe un % de incremento en la migración, significativo.

### Medición de Complejos Inmunes

Se determinó la concentración de complejos inmunes por

mililitro en los sueros de los diferentes grupos de niños - estudiados (Tabla No. 11, Gráfica No 10). En los niños sanos, se obtuvieron cifras promedio de  $\bar{x} = 5.77 \pm 0.88$  ug eq HAIgG/ml y en los pacientes con Artritis Reumatoide juvenil se observó un número de  $\bar{x} = 12.117 \pm 51.63$  ug eq HAIgG/ml. Estas cifras promedio se compararon entre sí y resultaron estadísticamente diferentes (Tabla estadística No. 10) con  $p < 0.001$ . Los resultados fueron obtenidos interpolando las absorbencias leídas de cada paciente en la curva estándar - realizada al mismo tiempo que las muestras problema.

#### *Fagocitosis de Partículas de Látex.*

Se determinó el % de fagocitosis e índice fagocítico - de partículas de látex por células leucocitos polimorfonucleares en los diferentes grupos de pacientes estudiados -- (Tabla No. 12 y Gráfica No. 11). En los resultados obtenidos se observa que en pacientes con Artritis Reumatoide Juvenil tanto el % de fagocitosis con  $\bar{x} = 79.6 \pm 139.53$  como el índice fagocítico con  $\bar{x} = 7.72 \pm 2.05$  se encuentran disminuidos en comparación a los resultados encontrados en pacientes sanos con % de fagocitosis  $\bar{x} = 11.46 \pm 0.86$ . El -- análisis estadístico muestra una diferencia significativa - en ambos casos (Tabla estadística No. 11).



TABLA No. 1

CARACTERISTICAS DE LOS NIÑOS SANOS Y CON ARTRITIS REUMATOIDE  
JUVENIL (ARJ)

NINOS SANOS	SEXO	EDAD AÑOS
1	F	8
2	M	10
3	M	10
4	F	12
5	F	13
6	M	12
7	F	9
8	M	10
9	M	11
10	M	10
11	M	11
12	F	14

NINOS ARJ	SEXO	EDAD AÑOS
1	F	14
2	M	11
3	M	12
4	F	13
5	F	14
6	M	11
7	F	12
8	M	13
9	M	12
10	M	12
11	F	14
12	F	13

M = Masculino

F = Femenino

TABLA No. 2

CONCENTRACIONES DE SALICILATOS EN SUERO A DIFERENTES TIEMPOS EN PACIENTES  
CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

No. Testigo	Salicilato mM/l	No. Paciente	mM/l de salicilato en suero			
			0 min	90 min	180 min	360 min
1	0.032	1	0.034	0.272	0.262	0.195
2	0.034	2	0.032	0.194	0.279	0.268
3	0.039	3	0.036	0.160	0.233	0.189
4	0.036	4	0.028	0.228	0.256	0.207
5	0.036	5	0.039	0.217	0.189	0.165
6	0.025	6	0.035	0.233	0.197	0.185
7	0.039	7	0.031	0.253	0.217	0.159
8	0.041	8	0.034	0.207	0.186	0.157
9	0.032	9	0.025	0.266	0.253	0.224
10	0.025	10	0.032	0.249	0.226	0.208
11	0.032	11	0.041	0.268	0.220	0.173
12	0.026	12	0.039	0.253	0.239	0.207
$\bar{X}$	0.032	$\bar{X}$	0.034	0.233	0.229	0.194
$\overline{DE}$	0.004	$\overline{DE}$	0.004	0.03	0.02	0.03

GRAFICA No 1

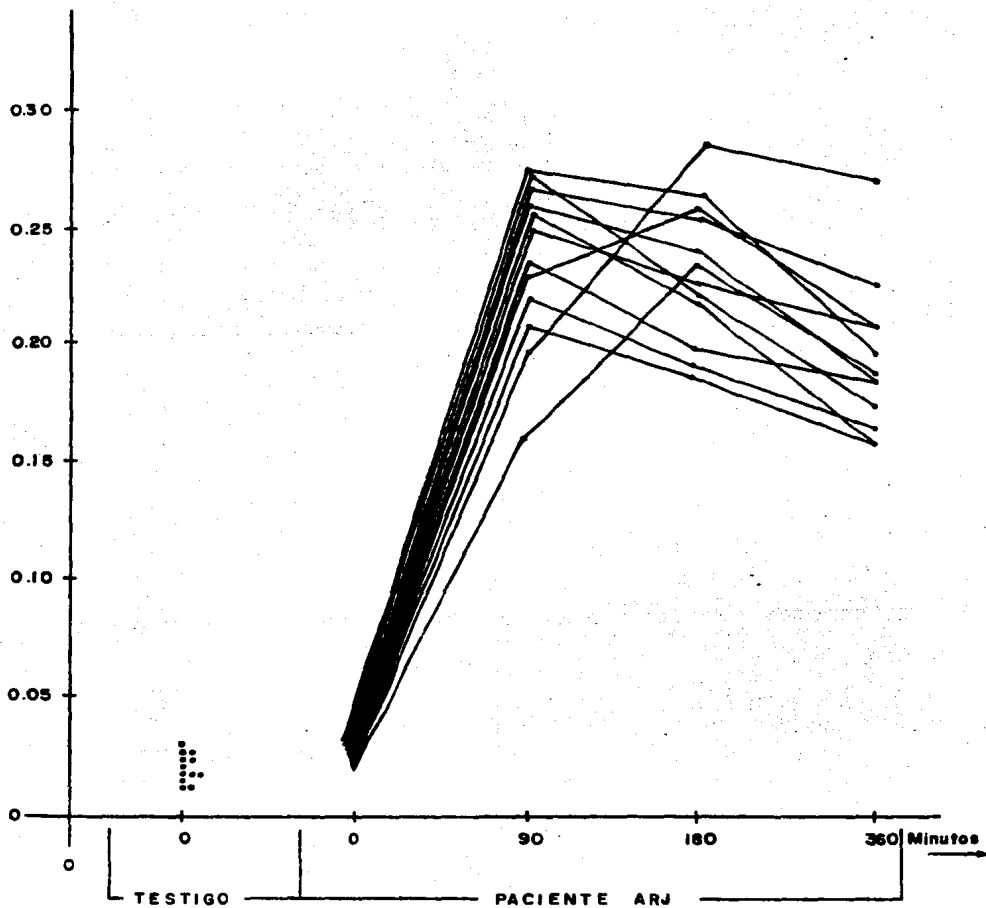


TABLA No. 3

CONCENTRACION DE SALICILATOS EN SUERO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

No. Testigo	Salicilato mM/1	No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATO mM/1			
			Antes de la Ingestión	MAYOR	INTERMEDIA	MENOR
1	0.032	1	0.038	0.272	0.262	0.195
2	0.034	2	0.032	0.279	0.268	0.194
3	0.039	3	0.036	0.233	0.224	0.189
4	0.038	4	0.028	0.256	0.228	0.227
5	0.036	5	0.039	0.217	0.189	0.185
6	0.025	6	0.035	0.233	0.197	0.185
7	0.039	7	0.031	0.253	0.217	0.159
8	0.041	8	0.034	0.207	0.186	0.157
9	0.032	9	0.025	0.266	0.253	0.224
10	0.025	10	0.032	0.249	0.226	0.208
11	0.032	11	0.041	0.268	0.220	0.173
12	0.026	12	0.039	0.253	0.239	0.207
$\bar{X}$	0.032	$\bar{X}$	0.034	0.248	0.225	0.191
$\overline{DE}$	0.004	$\overline{DE}$	0.004	0.02	0.025	0.02

GRAFICA No. 2

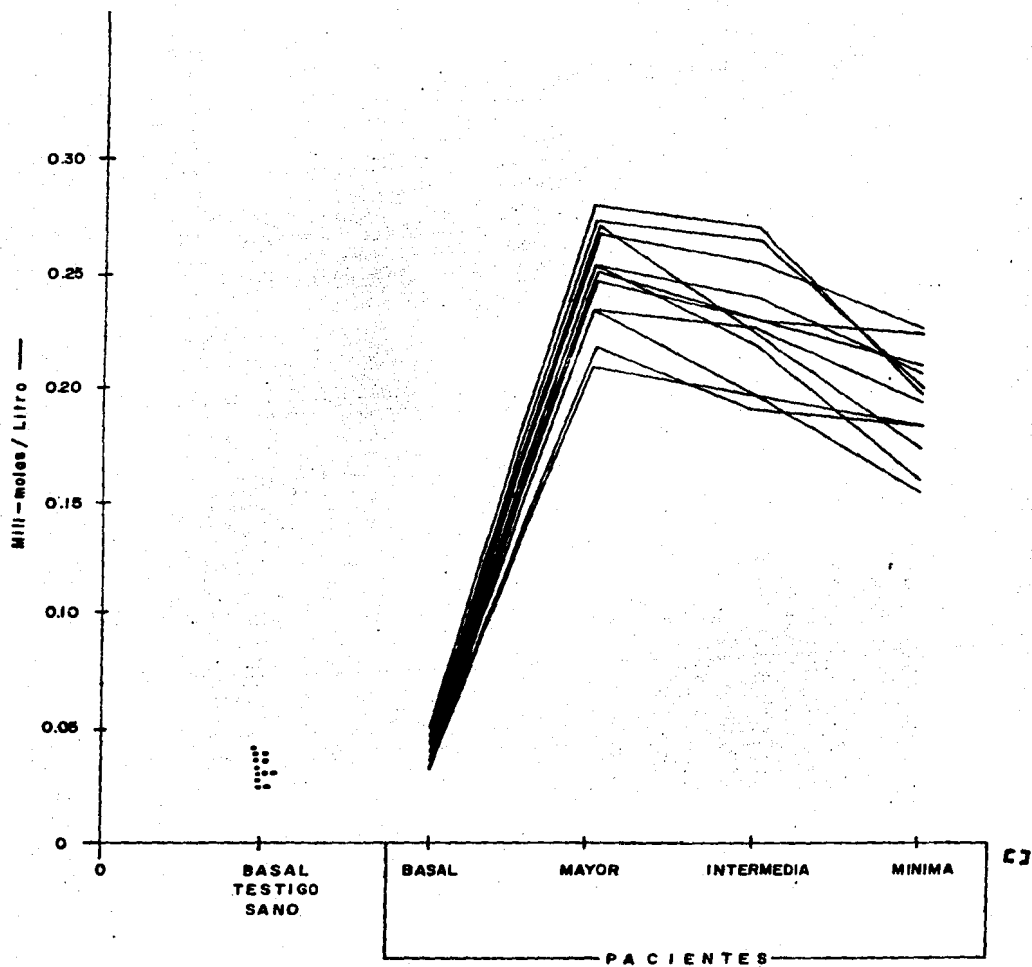


TABLA No. 4

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALICILATOS SOBRE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATOS EN SUERO (mM/L)							
	DISTANCIA DE MIGRACION (mm)							
	A BASAL		B MAXIMA		C INTERMEDIA		D MINIMA	
	mM/L	mm	mM/L	mm	mM/L	mm	mM/L	mm
1	0.038	0.86	0.272	0.40	0.262	0.55	0.185	1.13
2	0.032	0.83	0.279	0.42	0.268	0.52	0.194	1.00
3	0.036	0.70	0.233	0.60	0.189	0.80	0.160	1.30
4	0.028	0.86	0.256	0.73	0.228	0.93	0.207	1.06
5	0.039	0.80	0.217	0.76	0.189	1.13	0.165	1.26
6	0.035	0.93	0.233	0.63	0.197	0.70	0.185	0.83
7	0.031	0.80	0.253	0.50	0.217	0.65	0.159	0.70
8	0.034	0.75	0.207	0.78	0.186	0.86	0.157	1.10
9	0.025	0.90	0.266	0.50	0.253	0.60	0.224	0.80
10	0.032	0.70	0.249	0.50	0.226	0.70	0.208	1.00
11	0.041	0.80	0.268	0.50	0.220	0.80	0.173	1.00
12	0.039	0.60	0.253	0.50	0.239	0.60	0.207	0.70
$\bar{X}$	0.034	0.794	0.248	0.566	0.225	0.736	0.191	1.01
DE	0.004	0.2	0.02	0.2	0.025	0.2	0.02	0.2

GRAFICA No. 3

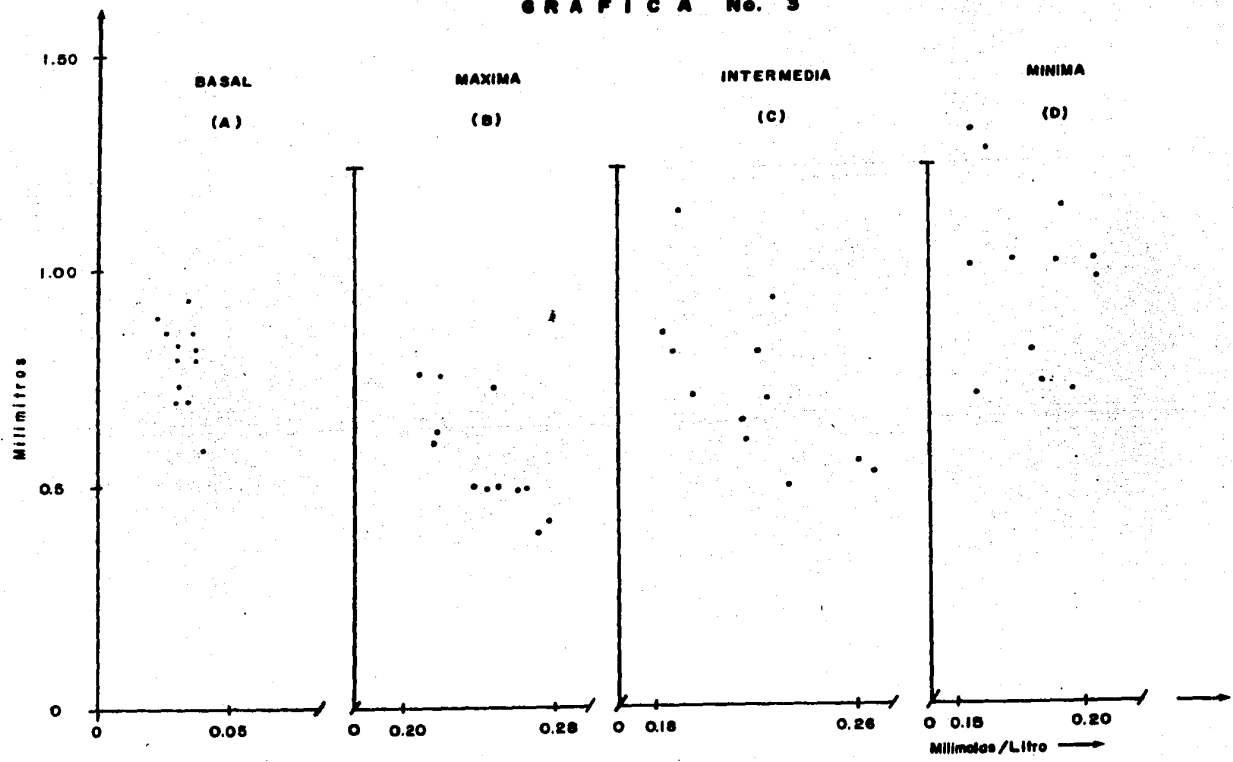


TABLA No. 5

% DE INCREMENTO Y % DE DECREMENTO DE LA QUIMIOTAXIS DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATOS mm/l QUIMIOTAXIS EN % DE INCREMENTO (+) Y % DE DECREMENTO (-)							
	BASAL (A)		MAXIMA (B)		INTERMEDIA (C)		MINIMA (D)	
	mM/l	mm	mM/l	%	mM/l	%	mM/l	%
1	0.038	0.66	0.272	-53.5	0.262	-36.1	0.195	+31.0
2	0.032	0.73	0.279	-49.3	0.288	-37.0	0.194	+20.4
3	0.036	0.60	0.233	-14.2	0.189	+14.2	0.160	+85.7
4	0.028	0.65	0.256	-15.1	0.228	+ 8.13	0.207	+23.2
5	0.039	0.60	0.217	- 5.0	0.189	+41.26	0.165	+57.5
6	0.035	0.60	0.233	-32.2	0.197	-24.7	0.185	-10.75
7	0.031	0.60	0.253	-37.5	0.217	-18.7	0.159	-12.5
8	0.034	0.60	0.207	+ 1.3	0.186	+14.6	0.157	+46.6
9	0.026	0.60	0.266	-44.4	0.253	-33.3	0.224	-11.1
10	0.032	0.60	0.249	-28.5	0.226	-	0.209	+42.8
11	0.041	0.55	0.266	-37.5	0.220	-	0.173	+25.0
12	0.039	0.60	0.253	-20.0	0.239	-	0.207	+16.6
$\bar{x}$	0.034	0.615	0.248	-27.99	0.225	+ 6.46	0.191	+27.8



GRAFICA No. 4

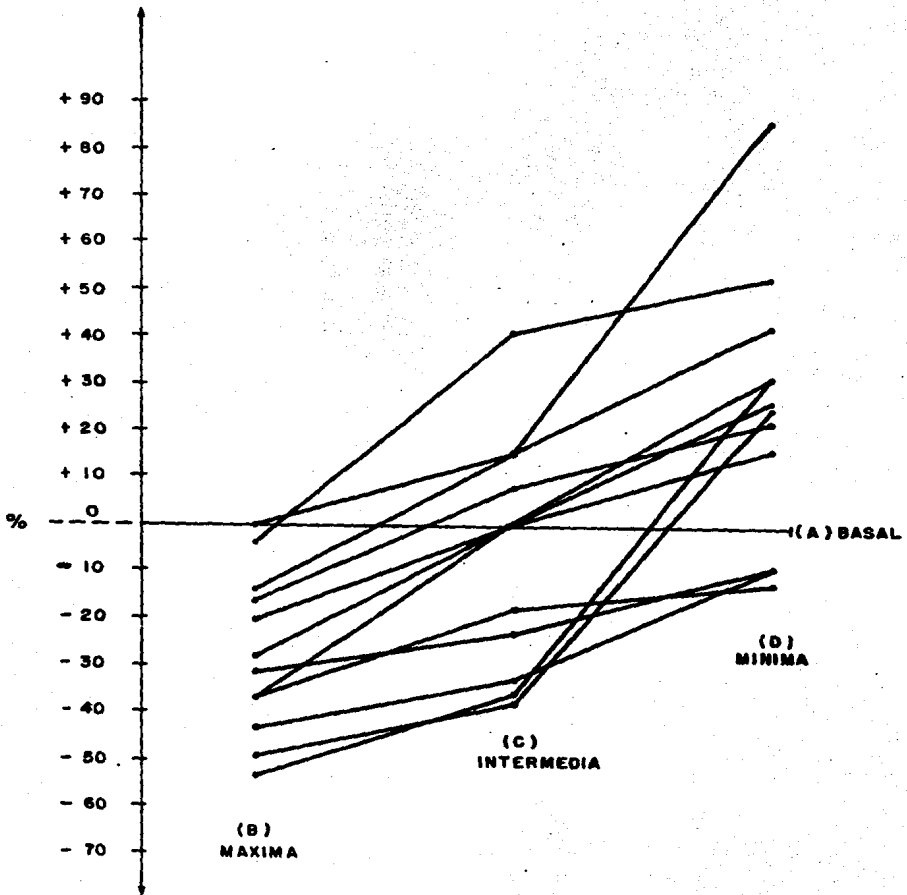


TABLA No. 6

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SALICILATO SOBRE LA MIGRACION ESPONTANEA DE LEUCOCITOS  
POLIMORFONUCLEARES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

"MODELO IN VIVO"

No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATOS mM/L DISTANCIA DE MIGRACION EN mm							
	BASAL (A)		MAXIMA (B)		INTERMEDIA (C)		MINIMA (D)	
	mM/L	mm	mM/L	mm	mM/L	mm	mM/L	mm
1	0.038	0.43	0.272	0.30	0.262	0.35	0.195	0.43
2	0.032	0.36	0.279	0.30	0.268	0.33	0.194	0.43
3	0.036	0.30	0.233	0.30	0.189	0.40	0.160	0.43
4	0.028	0.33	0.256	0.33	0.228	0.35	0.207	0.40
5	0.039	0.33	0.217	0.35	0.189	0.36	0.165	0.53
6	0.035	0.30	0.233	0.30	0.197	0.30	0.185	0.36
7	0.031	0.30	0.253	0.26	0.217	0.30	0.159	0.30
8	0.034	0.38	0.207	0.38	0.186	0.42	0.157	0.50
9	0.025	0.36	0.266	0.30	0.253	0.30	0.224	0.32
10	0.032	0.25	0.249	0.30	0.226	0.30	0.208	0.35
11	0.041	0.25	0.268	0.30	0.220	0.30	0.173	0.35
12	0.039	0.25	0.253	0.25	0.239	0.30	0.207	0.30
$\bar{X}$	0.034	0.32	0.248	0.30	0.225	0.334	0.191	0.391
$\overline{DE}$	0.004	0.05	0.03	0.025	0.04	0.02	0.02	0.07

GRAFICA No. 5

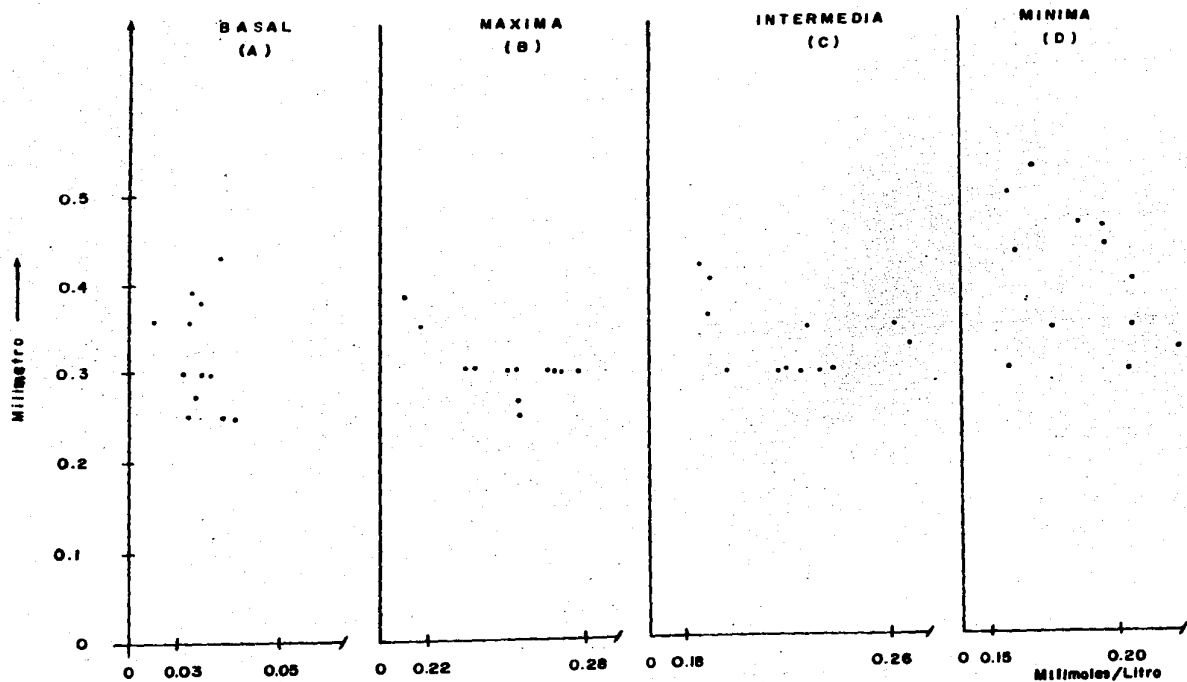


TABLA No. 7

% DE INCREMENTO Y % DE DECREMENTO DE LA MIGRACION ESPONTANEA DE LEUCOCITOS  
POLIMORFONUCLEARES  
"MODELO IN VIVO"

No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATOS mM/L MIGRACION ESPONTANEA EN mm, % DE INCREMENTO O DECREMENTO							
	BASAL (A)		MAXIMA (B)		INTERMEDIA (C)		MINIMA (D)	
	mM/L	mm	mM/L	%	mM/L	%	mM/L	%
1	0.038	0.43	0.272	-30.2	0.262	-18.6	0.195	-
2	0.032	0.36	0.279	-16.6	0.268	- 8.3	0.194	+19.4
3	0.036	0.30	0.233	-	0.189	+33.3	0.160	+43.3
4	0.028	0.33	0.265	-	0.228	+ 6.0	0.207	+21.2
5	0.039	0.33	0.217	+ 6.0	0.189	+ 9.0	0.165	+60.6
6	0.035	0.30	0.233	-	0.197	-	0.185	+20.0
7	0.031	0.30	0.253	-13.3	0.217	-	0.159	-
8	0.034	0.38	0.207	-	0.186	+10.5	0.157	+31.5
9	0.025	0.36	0.266	-16.6	0.253	-16.6	0.224	-11.1
10	0.032	0.25	0.249	+20.0	0.226	+20.0	0.208	+40.0
11	0.041	0.25	0.268	+20.0	0.220	+20.0	0.173	+40.0
12	0.039	0.25	0.253	-	0.239	+20.0	0.207	+20.0
$\bar{X}$	0.034	0.32	0.248	- 2.5	0.225	+ 5.74	0.191	+23.74

GRAFICA No. 6

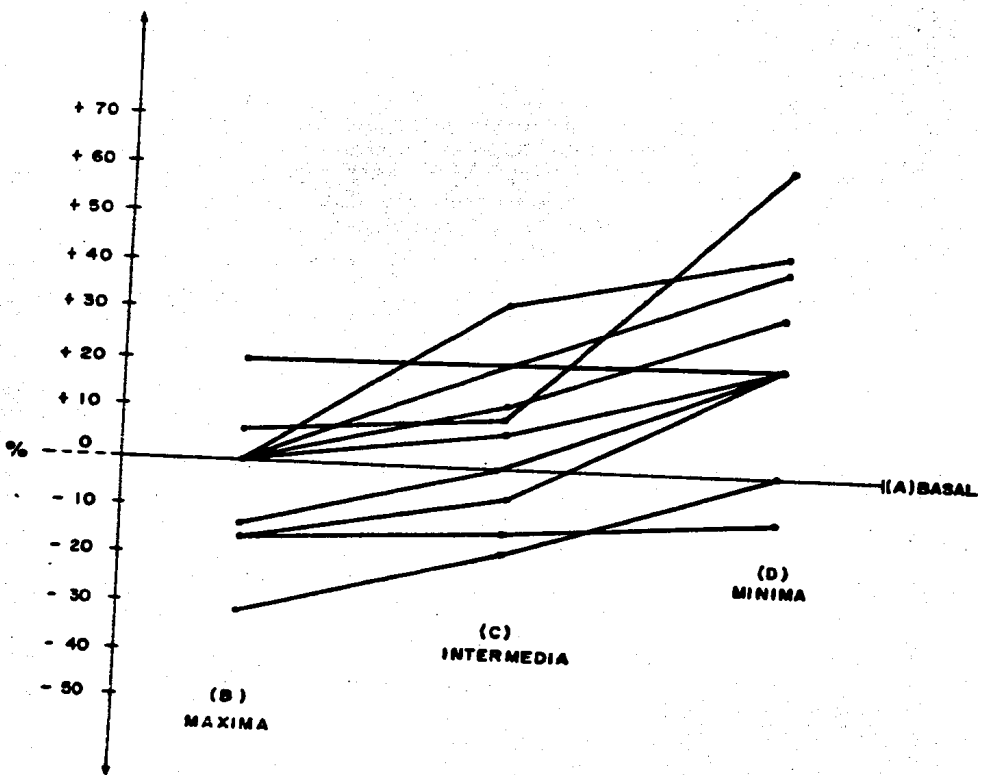


TABLA No. 8

ESQUEMA GENERAL DEL EFECTO "IN VIVO" DE LA CONCENTRACION DE SALICILATO SOBRE LA MIGRACION ESPONTANEA Y QUIMIOTAXIS DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL.

No. Determinación	QUIMIOTAXIS (Q) MIGRACION ESPONTANEA (M.E.)									
	TESTIGO		PACIENTES							
	BASAL (1)		BASAL (2)		MAXIMA (3)		INTERMEDIA (4)		MINIMA (5)	
	Q	M.E.	Q	M.E.	Q.	M.E.	Q.	M.E.	Q.	M.E.
1	0.66	0.30	0.86	0.43	0.40	0.30	0.55	0.35	1.13	0.43
2	0.73	0.30	0.83	0.36	0.42	0.30	0.52	0.33	1.00	0.43
3	0.60	0.20	0.70	0.30	0.60	0.30	0.80	0.40	1.30	0.43
4	0.65	0.30	0.86	0.33	0.73	0.33	0.93	0.35	1.06	0.40
5	0.60	0.30	0.80	0.33	0.76	0.35	1.13	0.36	1.26	0.53
6	0.60	0.20	0.93	0.30	0.63	0.30	0.70	0.30	0.83	0.36
7	0.60	0.26	0.80	0.30	0.50	0.26	0.65	0.30	0.70	0.30
8	0.60	0.30	0.75	0.38	0.76	0.38	0.66	0.42	1.10	0.50
9	0.60	0.30	0.90	0.36	0.50	0.30	0.60	0.30	0.80	0.32
10	0.60	0.20	0.70	0.25	0.50	0.30	0.70	0.30	1.00	0.35
11	0.55	0.25	0.80	0.25	0.50	0.30	0.80	0.30	1.00	0.35
12	0.60	0.20	0.60	0.25	0.50	0.25	0.60	0.30	0.70	0.30
$\bar{X}$	0.61	0.28	0.794	0.32	0.566	0.30	0.736	0.334	1.01	0.391
DE	0.2	0.02	0.2	0.05	0.2	0.025	0.2	0.02	0.2	0.07

GRAFICA No 7

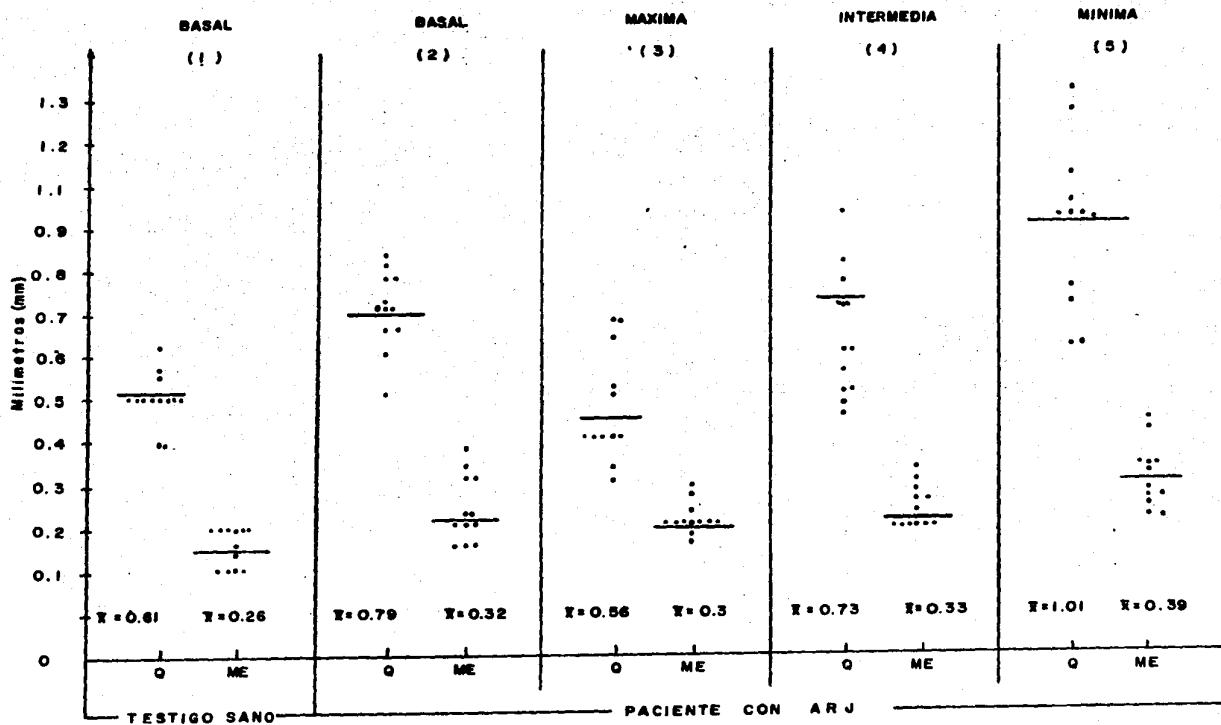


TABLA No. 9

## "MODELO IN VITRO"

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALICILATO SOBRE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

% DE INCREMENTO Y % DE DECREMENTO DE LA QUIMIOTAXIS

No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATO mM/L		
	MAXIMA 0.729 (1)	INTERMEDIA 0.362 (2)	MINIMA 0.140 (3)
1	-16.6	- 8.3	+25.0
2	-14.0	-10.0	+30.0
3	-33.3	- 6.6	+33.3
4	-14.2	+14.28	+28.5
5	-20.0	+13.3	+33.3
6	- 7.6	+ 7.6	+30.7
7	-16.6	- 8.3	+50.0
8	-33.3	-16.6	+16.6
9	-27.2	-18.8	+ 9.0
10	-33.3	-25.0	+25.0
11	-20.0	-10.0	+20.0
12	-38.4	- 8.3	+23.0
$\bar{X}$	-22.85	- 5.6	+27.0



## GRAFICA No 8

% DE INCREMENTO Y % DE DECREMENTO DE LA QUIMIOTASIS

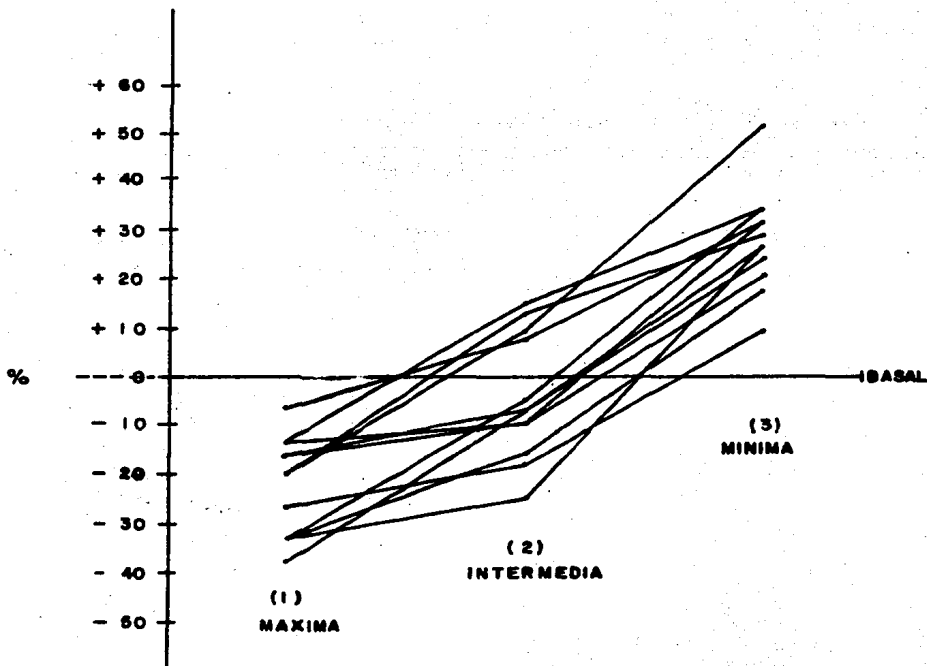


TABLA No. 10

MODELO "IN VITRO"

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE SALICILATO SOBRE LA MIGRACION ESPONTANEA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

% DE INCREMENTO Y % DE DECREMENTO DE LA MIGRACION

No. Paciente	CONCENTRACION DE SALICILATO mM/L		
	MAXIMA 0.729 (1)	INTERMEDIA 0.362 (2)	MINIMA 0.140 (3)
1	-	-	+43.3
2	-	-	-
3	-33.3	-23.3	-13.3
4	-39.3	-9.0	-
5	-	-	-
6	-33.3	-13.3	-
7	-13.3	-	-
8	-	+12.5	+25.0
9	-33.3	-	+20.0
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
$\bar{x}$	-12.7	-2.75	+6.25

GRAFICA No. 9

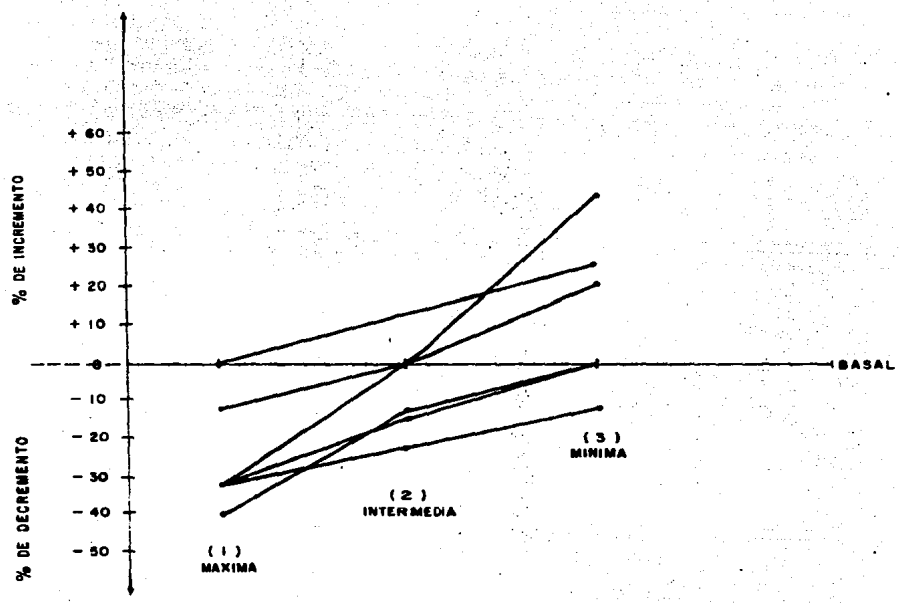


TABLA No. 11

CONCENTRACION DE COMPLEJOS INMUNES EN SUERO DE PACIENTES CON  
ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

GRUPO TESTIGO	ug eq HAIG/ml	GRUPO PACIENTES	ug eq HAIG/ml
1	7.70	1	5.27
2	4.80	2	6.39
3	5.10	3	7.64
4	5.37	4	30.66
5	5.10	5	5.27
6	5.30	6	13.95
7	6.40	7	13.95
8	5.20	8	20.10
9	6.10	9	9.01
10	5.39	10	9.01
11	5.20	11	16.52
12	7.60	12	7.64
$\bar{X}$	5.77	$\bar{X}$	12.117
$\overline{DE}$	7.60	$\overline{DE}$	51.63

G R A F I C A No. 10

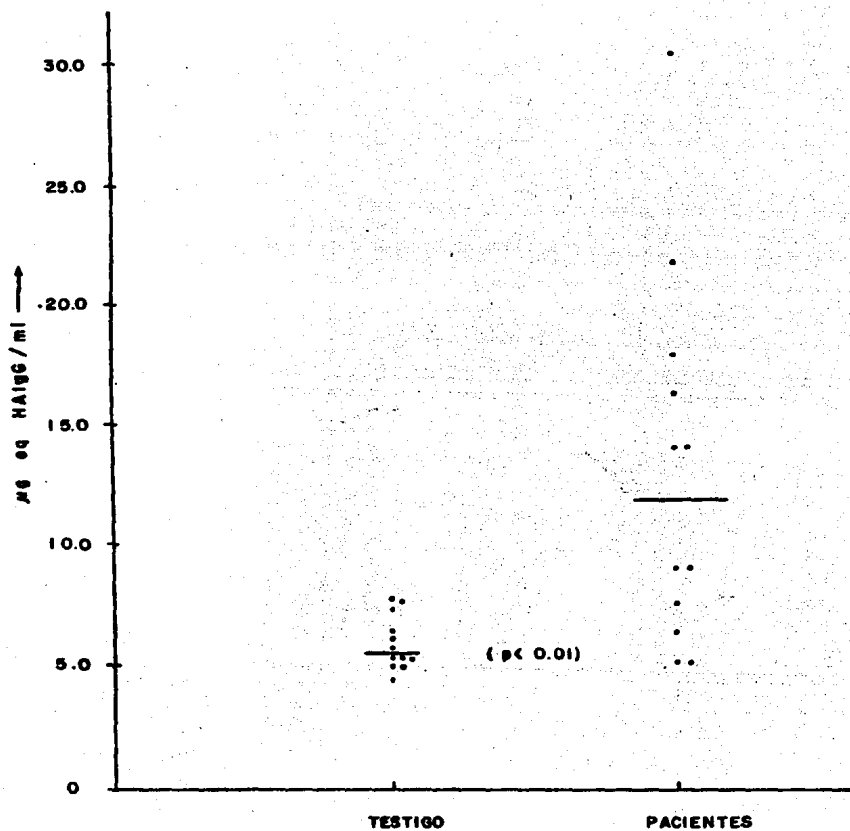
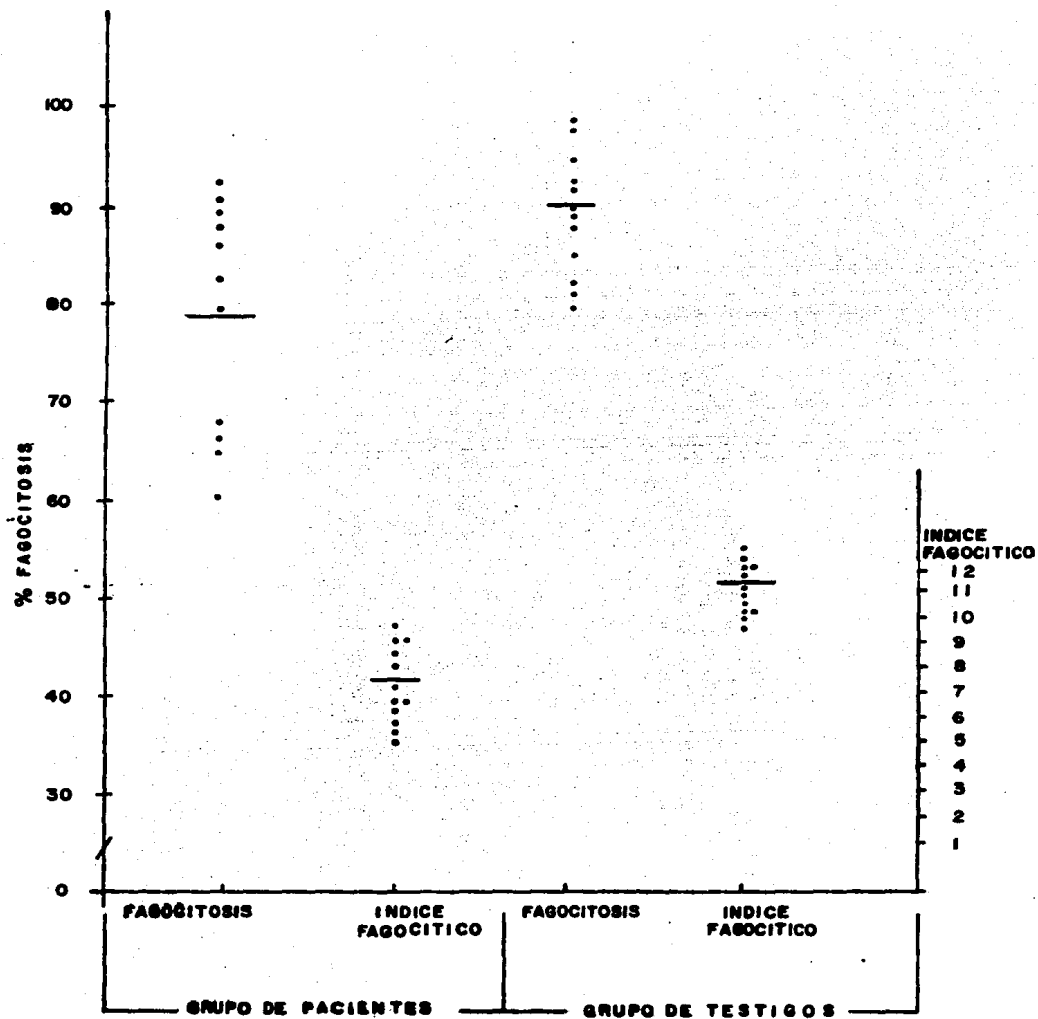


TABLA No. 12

FAGOCITOSIS DE PARTICULAS DE LATEX POR LEUCOCITOS POLIMORFO NUCLEARES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL.

No. DE DETERMINACION	GRUPO PACIENTES		GRUPO TESTIGO	
	FAGOCITOSIS %	INDICE FAGOCITICO	FAGOCITOSIS %	INDICE FAGOCITICO
1	93	10.0	82	10.2
2	89	9.5	88	12.0
3	87	9.0	89	10.0
4	86	5.7	98	12.5
5	91	7.1	90	11.2
6	81	7.3	85	11.0
7	89	9.5	98	10.5
8	83	8.6	99	12.6
9	90	6.75	95	13.0
10	83	5.8	93	12.5
11	84	6.0	81	10.6
12	80	7.5	92	11.5
$\bar{X}$	79.6	7.72	90.8	11.46
$\overline{DE}$	139.53	2.05	34.47	0.86

GRAFICA No. 11



**ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

**TABLA DE ESTADISTICA No. 1**

**FUENTE DE VARIACION**

**IN VIVO. Concentración de salicilato en suero a diferentes tiempos (mM/l)**

<b>GRUPO</b>	<b>n</b>	<b>t-calculada</b>	<b>p</b>	<b>Conclusión</b>
mM/l de salicilato a 0 min (basal) mM/l de salicilato a 90 min	12 12	28.4	$p < 0.001$	<b>SIGNIFICATIVA</b>
mM/l de salicilato a 0 min (basal) mM/l de salicilato a 180 min	12 12	26.1	$p < 0.001$	<b>SIGNIFICATIVA</b>
mM/l de salicilato 0 min (basal) mM/l de salicilato a 360 min	12 12	23.2	$p < 0.001$	<b>SIGNIFICATIVA</b>
mM/l de salicilato a 90 min mM/l de salicilato a 180 min	12 12	0.7	$p > 0.1$	<b>NQ SIGNIFICATIVA</b>
mM/l de salicilato a 90 min mM/l de salicilato a 360 min	12 12	5.79	$p < 0.001$	<b>SIGNIFICATIVA</b>
mM/l de salicilato a 180 min mM/l de salicilato a 360 min	12 12	4.6	$p < 0.01$	<b>SIGNIFICATIVA</b>

**TABLA DE ESTADISTICA No. 2**

**FUENTE DE VARIACION**

**IN VIVO. Concentración de salicilato en suero**

<b>GRUPO</b>	<b>n</b>	<b>t-calculada</b>	<b>p</b>	<b>Conclusión</b>
Concentración de salicilato (basal) Concentración mayor de salicilato	12 12	7.64	$p < 0.001$	<b>SIGNIFICATIVA</b>



GRUPO	n	t-calculada	p	Conclusión
Concentración de salicilato (basal)	12	8.6	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Concentración intermedia de salicilato	12			
Concentración de salicilato (basal)	12	21.35	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Concentración mínima de salicilato	12			
Concentración mayor de salicilato	12	3.3	p<0.01	SIGNIFICATIVA
Concentración intermedia de salicilato	12			
Concentración mayor de salicilato	12	9.3	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Concentración mínima de salicilato	12			
Concentración intermedia de salicilato	12	5.6	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Concentración mínima de salicilato	12			

TABLA DE ESTADISTICA No. 3

FUENTE DE VARIACION  
IN VIVO. Quimiotaxis

GRUPO	n	U-calculada	p	Conclusión
Migración basal	12	18.8	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Migración a concentración mayor	12			
Migración basal	12	7.5	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Migración concentración intermedia	12			
Migración basal	12	5.0	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Migración a la concentración mínima	12			
Migración a la concentración mayor	12	5.03	p<0.001	SIGNIFICATIVA
Migración a concentración intermedia	12			

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
Migración a la concentración mayor Migración a la concentración mínima	12	7.03	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
Migración a concentración intermedia Migración a la concentración mínima	12	5.01	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA

TABLA DE ESTADISTICA No. 4

FUENTE DE VARIACION

IN VIVO. % de incremento o % de decremento de la quimiotaxis de Leucocitos PMN

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
% Migración a la concentración mayor % Migración a concentración intermedia	12 12	33	$p < 0.025$	SIGNIFICATIVA
% Migración a la concentración mayor % Migración a la concentración mínima	12 12	26	$p < 0.01$	SIGNIFICATIVA
% Migración a concentración intermedia % Migración a la concentración mínima	12 12	6	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA

TABLA DE ESTADISTICA No. 5

FUENTE DE VARIACION

IN VIVO. Migración espontánea a diferentes concentraciones de salicilato

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
Migración basal Migración a concentración mayor	12	0.382	$p > 0.05$	NO SIGNIFICATIVA

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
Migración basal	12	1.55	$p > 0.1$	NO SIGNIFICATIVA
Migración a concentración intermedia	12			
Migración basal	12	3.29	$p < 0.01$	SIGNIFICATIVA
Migración a la concentración mínima	12			
Migración a la concentración mayor	12	1.95	$p > 0.01$	NO SIGNIFICATIVA
Migración a concentración intermedia	12			
Migración a la concentración mayor	12	5.9	$p < 0.01$	SIGNIFICATIVA
Migración a la concentración mínima	12			
Migración a concentración intermedia	12	4.2	$p < 0.01$	SIGNIFICATIVA
Migración a la concentración mínima	12			

TABLA DE ESTADISTICA No. 6

FUENTE DE VARIACION

IN VIVO. % de incremento o % de decrecimiento en la migración espontánea de leucocitos PMN.

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
% Migración a concentración mayor	12	49.5	$p > 0.05$	NO SIGNIFICATIVA
% Migración a concentración intermedia	12			
% Migración a la concentración mayor	12	37	$p < 0.025$	SIGNIFICATIVA
% Migración a concentración mínima	12			
% Migración a concentración intermedia	12	23	$p < 0.01$	SIGNIFICATIVA
% Migración a la concentración mínima	12			

TABLA DE ESTADISTICA No. 7

FUENTE DE VARIACION

IN VIVO. Quimiotaxis y Migración espontánea a diferentes concentraciones de salicilato

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
Quimiotaxis grupo testigo Migración espontánea testigo	12 12	25.19	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
<b>PACIENTES ARJ</b>				
Quimiotaxis basal Migración espontánea basal	12 12	20.6	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
Quimiotaxis a concentración mayor Migración espontánea a la concentración mayor	12 12	6.74	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
Quimiotaxis a concentración intermedia de salicilato Migración espontánea a concentración intermedia	12 12	8.75	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
Quimiotaxis a la concentración mínima Migración espontánea a la concentración mínima	12 12	14.95	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA

TABLA DE ESTADISTICA No. 8

FUENTE DE VARIACION

IN VITRO. % de incremento o % de decremento en la quimiotaxis de leucocitos PMN

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
% Migración con 0.729 mM/l salicilato % Migración con 0.368 mM/l salicilato	12 12	21	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
% Migración con 0.362 mM/l salicilato	12	2	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
% Migración con 0.140 mM/l salicilato	12			
% Migración con 0.729 mM/l salicilato	12	1.8	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
% Migración con 0.140 mM/l salicilato	12			

TABLA DE ESTADISTICA No. 9

FUENTE DE VARIACION

IN VITRO. % de incremento o % de decremento de la migración espontánea de Leucocitos PMN

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
% Migración con 0.729 mM/l salicilato	12	50.5	$p > 0.05$	NO SIGNIFICATIVA
% Migración con 0.362 mM/l salicilato	12			
% Migración con 0.362 mM/l salicilato	12	50.5	$p > 0.05$	NO SIGNIFICATIVA
% Migración con 0.140 mM/l salicilato	12			
% Migración con 0.729 mM/l salicilato	12	35.5	$p < 0.025$	SIGNIFICATIVA
% Migración con 0.140 mM/l salicilato	12			

TABLA DE ESTADISTICA No. 10

FUENTE DE VARIACION

Concentración de complejos inmunes en suero

GRUPO	n	t-calculada	p	CONCLUSION
ug eq/ml del grupo testigo	12	3.137	$p < 0.001$	SIGNIFICATIVA
ug eq/ml del grupo de pacientes ARJ	12			

TABLA DE ESTADISTICA No. 11

FUENTE DE VARIACION

Fagocitosis e indice fagocitico

GRUPO	n	U-calculada	p	CONCLUSION
% Fagocitosis del grupo testigo	12	33	$p < 0.025$	SIGNIFICATIVA
% Fagocitosis del grupo de pacientes ARJ	12			
Indice fagocitico del grupo tes- tigo	12	35.5	$p < 0.025$	SIGNIFICATIVA
Indice fagocitico del grupo de pa- cientes ARJ	12			

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

### DISCUSION:

Cuando se habla del efecto de salicilato sobre la migración leucocitaria, por lo regular se enfocan a neutrófilos. Mangliulo et, al (1977) observó la inhibición de quimiotaxis por ácido acetil-salicílico empleando la técnica de la cámara de Boyden (46), sin embargo otros autores formularon que sus resultados no eran confiables debido a que la aspirina puede provocar que las células disminuyan la capacidad de adhesión, en este caso al filtro utilizado en la cámara (25).

Se efectuó otro estudio en el cual también se utilizó la cámara de Boyden pero aquí se realizó conteo de células tanto adheridas como desprendidas del filtro, la respuesta quimiotáctica de neutrófilos en presencia de salicilatos no fue estadísticamente significativa pero si fue significativo el incremento en migración al azar. Estos autores concluyen que los salicilatos no tuvieron efecto sobre la quimiotaxis de neutrófilos (31).

Los presentes experimentos demuestran el efecto de salicilatos sobre la migración de neutrófilos "in vivo" e "in

*vitro*" un decremento de quimiotaxis y migración espontánea a altas concentraciones de salicilato en ambos modelos, utilizando para la cuantificación de migración el método de -- gel de agarosa en donde se determinó la distancia de migración en mm desde el extremo del orificio donde fueron colocadas las células al frente principal de migración, una técnica que elimina el conteo de células (12).

Con los resultados obtenidos podría gestionarse lo siguiente:

1°. El experimento "in vivo" podría indicar un efecto del salicilato sobre los mismos neutrófilos puesto que las células se sometieron a ciertos lavados antes de realizar los experimentos.

2°. Se ha sugerido que la secuencia principal en la -- producción de la respuesta inflamatoria "in vivo" es:

- a) Liberación de aminas, histamina y  $\text{H}_2$
- b) Formación de cininas, y finalmente
- c) La activación de prostaglandinas y posiblemente la sustancia de reacción lenta (SRS). Donde el complemento sérico, representa el mecanismo que induce y mantiene esta secuencia de evento. En el área de -- inflamación las primeras células en acumularse son



Los neutrófilos, los cuales poseen un metabolismo oxidativo sumamente activo conectado con su actividad microbiana y cuya movilidad e ingestión depende del metabolismo de glucosa, los eventos subsiguientes involucran el consumo de oxígeno y el estímulo de la vía hexosa-monofosfato (HMN) y con ello la -- producción de peróxido de hidrógeno y el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Estos daños metabólicos pueden producir daño sobre la membrana celular del neutrófilo.

Ahora bien, los neutrófilos una vez aislados, la autooxidación por presencia de factores en el suero puede causar daño en la migración espontánea y quimiotaxis, es decir, la llamada locomoción, en la cual es esencial la síntesis de proteínas, en cambio la función fagocítica no se ve afectada, siendo ésta una posible causa para la inhibición de la migración. Se ha observado que en un período de 5 hrs existe una rápida decaída de la quimiotaxis y migración espontánea, medido por la técnica de agarosa (47).

3°. La inhibición de la migración de neutrófilos es debida a la presencia de complejos inmunes circulantes y que la capacidad de los complejos inmunes de inhibir la migración de neutrófilos "in vitro" podría también contribuir a la acumulación de neutrófilos en sitios de formación de com-

plejos inmunes "in vivo".

Un mecanismo propuesto para esta acumulación de neutrófilos es la atracción quimiotáctica por activación de los componentes del complemento por complejos inmunes, lo cual puede ser demostrado en el suero y en el líquido sinovial. Sin embargo, además de la generación de factores quimiotácticos, los complejos inmunes podrían también afectar la migración de neutrófilos por una interacción directa con la superficie del neutrófilo.

Después de llevar a cabo un análisis detallado de las tres respuestas de la posible causa de la inhibición de la migración de neutrófilos (PMN) en los experimentos efectuados, la primera opción es la respuesta satisfactoria a los resultados obtenidos, ya que el comportamiento de quimiotaxis y migración espontánea presentado por las células es inversamente proporcional a la concentración de salicilato al cual se exponen las células tanto "in vivo" como "in vitro".

La segunda opción es eliminada, al tomar en cuenta que al realizar los experimentos las células (PMN) se aislaron del suero inmediatamente después de haber tomado las muestras de sangre por lo cual se evitó la auto-oxidación.

La tercera suposición no se acepta, tomando en cuenta que en los experimentos hechos se empleó un factor quimio-táctico en este caso, zimosan el cual evita que aunque las células hayan ingerido complejos inmunes o estén en contacto con complejos inmunes se inhiba la migración de las células (48).

Entre los trastornos inmunológicos asociados con complejos inmunitarios localizables en forma circulante o depositados en los tejidos está ARJ. Como es sabido casi cualquier antígeno extraño que produzca una respuesta identificable de anticuerpos puede conducir al desarrollo de depósitos de complejos inmunes. En los resultados obtenidos de complejos inmunes circulantes en suero se encontró aumentada significativamente la concentración de C.I. en niños con ARJ al compararla con la concentración observada en niños sanos. Lo anterior concuerda con investigaciones recientes que han demostrado en estos pacientes el desarrollo de C.I. como IgG-IgM y complejos IgG-IgG en el suero obtenido por ultracentrifugación. Esto es de importancia en vista de -- que el reconocimiento celular "in vivo" de los complejos inmunes induce que sean fagocitados o que ejerzan efectos de inflamación directa que dañan la función celular local. -- Por ejemplo: La fagocitosis de los complejos por células -- polimorfonucleares (PMN) conduce a un aumento en la activi-

dad metabólica liberando enzimas lisosomales al medio. - -  
 Otro efecto de los C.I. puede ser la lisis o eliminación de las células como resultado de la unión de los C.I. a la membrana (eritrocitos y plaquetas) como efecto final, un daño tisular en el sitio donde se localicen. Los efectos biológicos de los complejos inmunes se determinan por la interacción con los receptores celulares y humorales por lo que el acoplamiento de los C.I. a los receptores puede activar al sistema del complemento.

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos de la fagocitosis de partículas de látex por leucocitos PMN, la disminución existente en % de fagocitosis e índice fagocítico de pacientes con ARJ al compararla con el grupo de niños sanos, podría considerarse que es debido a la presencia "in vivo" de complejos inmunes los cuales son fácilmente fagocitados por los leucocitos PMN por lo que al realizar el experimento con partículas de látex ya no hay cabida a una mayor fagocitosis de partículas.

En sí el ácido acetil-salicílico es el medicamento de elección en el tratamiento de esta enfermedad, aunque su mecanismo de acción no está claro. La aspirina inhibe la actividad de la prostaglandín-sintetasa "in vitro" y reduce la biosíntesis de prostaglandinas en una variedad de siste-

mas (32). Se ha propuesto que la inhibición de esta enzima podría evitar unos de los efectos terapéuticos, tales como analgesia, antipirexis y las propiedades anti-reumáticas de aspirina y de otras drogas anti-inflamatorias no esteroideas (4).

Se sugiere que un importante componente de la acción anti-inflamatoria de aspirina es una interferencia con infiltración celular (33). Los mecanismos de esta acción no involucran un primer efecto sobre la prostaglandín-sintetasa y los efectos "in vivo" de aspirina sobre el contenido de prostaglandinas en exudados inflamatorios, es secundario a una acción inicial sobre migración leucocitaria.

## C A P I T U L O   V I I

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y después de haber realizado los experimentos necesarios se concluye lo siguiente:

- 1.- La actividad quimiotáctica de leucocitos polimorfonucleares en pacientes con artritis reumatoide juvenil se encuentra ligeramente aumentada y la fagocitosis de células PMN en este estudio se observó disminuida con respecto al grupo de niños control lo cual concuerda con la concentración de complejos inmunes circulantes.
- 2.- El efecto que tienen los salicilatos sobre la actividad quimiotáctica tanto in vivo como in vitro a altas concentraciones es la de influenciar un decremento significativo en la migración en ambos modelos y posteriormente ésta se va incrementando a menor concentración.
- 3.- La concentración de complejos inmunes circulantes en suero de niños con ARJ es significativamente mayor en comparación a los niños sanos.

4.- Los resultados obtenidos de la concentración de salicilato en el suero de pacientes con ARJ varía con respecto al tiempo de aplicación de la dosis, dependiendo de la capacidad de absorción o hidrólisis de los salicilatos por el organismo.

Es de importancia mencionar que los objetivos propuestos en la investigación lograron ser cumplidos. Sin embargo, para tener datos más representativos se sugiere que la muestra poblacional sea mayor.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARJ	Artritis reumatoide juvenil
C.I.	Complejos inmunes
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
Ag	Antígeno
DET.CONC. SAL.	Determinación de la concentración de salicilatos
HBSS	Solución buffer de Hanks
RPMI	Medio Roswell-Park-Memorial Institute
ZAS	Suero activado con Zimosan
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
N	Normalidad
U. I.	Unidades Internacionales
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
ul	Microlitros
ml	Mililitros
mM/L	Milimolas/litro
cel/ml	Células/mililitro
g	Gramos
mg	Miligramos
Kg	Kilogramos
min	Minutos
h	Horas
mm	Milímetros
um	Micrómetros
DE	Desviación estándar
$\bar{X}$	Media
p	Grado de significancia estadística



## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Still GF: *On a form of chronic joint disease in children.* *Med-Chir Trans* 80: 47-59, 1897.
- 2.- Ansel BM: *Chronic arthritis in childhood.* *Ann Rheum Dis.* Vol. 37, No. 2 (Abril): 107-120, 1978.
- 3.- Schaller JG: *The diversity of JRA Arthritis* *Rheum* 20 -- (Suppl) S52-S61, 1977.
4. Ferreira SH: *Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesin.* *Nature New Biology* 240 (December): 200-203, 1972.
- 5.- Famaey JP: *Recent developments about non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mode of action.* *General -- Pharmacology* 9: 155-161, 1978.
- 6.- Samuelson B: *Oxygenation and further transformation of polyunsaturated fatty acids.* *Proceedings of the Fourth International Prostaglandins Conference, Washington, DC USA Mag* 1979.
- 7.- Winchester RJ; Agnello V & Kunkel HS: *Gammaglobulin com*

plexes in synovial fluids of patients with Rheumatoid - arthritis. *Clinical and experimental immunology* 6: 689-706, 1970.

- 8.- Astorga G; Bollet A: Diagnostic specificity and possible pathogenetic significance of inclusion in synovial leucocytes. *Arthritis and Rheumatism* Vol. 8, No. 4 (Agosto): 511-523, 1965.
- 9.- Lepow IH; Willins-Kretschmer K: Gross and ultrastructural observations on lesions produced by intradermal injection of human C<sub>3</sub>a in man. *American Journal of pathology* 61 (1): 13-24, 1970.
- 10.- Ward PH: Chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. -- *Biochemical Pharmacology Suppl* 17: 99-105, 1968.
- 11.- Higgs GA; Youlten LJF: Prostaglandin production by rabbit peritoneal polymorphonuclear leucocytes in vitro. *British Journal of Pharmacology* 44: 330, 1972.
- 12.- Giround JP; Willoughby DA: The interrelations of complement and prostaglandin-like substance in weak inflammation. *Journal of Pathology* 101: 241-248, 1970

- 13.- Hollander JL; McCarty DJ; Astor GA; Gastro-Murillo E:  
*Studies on the pathogenesis of joint inflammation.* - -  
*Internal Medicine* 62: 271, 1965.
- 14.- Weismann G; Spilberg I & Krakuer K: *Arthritis induced by  
lysates of granulocyte lysosomes. Arthritis and Rheuma-  
tism* 12 (2): 103-107, 1969.
- 15.- Eisen V: *Observations on intrinsic forming factors in -  
human plasma. Journal of Physiology* 166: 96-97, 1963.
- 16.- Anderson AJ; Brocklehurst WE & Willes AL: *Evidence for  
the role of lysosomes in the formation of prostaglandins  
during carageenin induced inflammation in the rat. Phar  
macology Research Committee* 3: 13-19, 1971.
- 17.- William TJ & Morley J: *Measurement of soute of extrav  
sation of plasma protein in inflammatory response in -  
guinea pig skin using a continuous recording method* 55:  
1-12, 1974.
- 18 - Ferreira SH: *Prostaglandin, aspirin-like drugs and anal-  
gesia. Nature New Biology* 240: 200-203, 1972.
- 19.- G. Kaley and R. Weiner: *Prostaglandin E<sub>1</sub>; A potential -*

mediator of the inflammatory response. *Annals New York Academy of Sciences* pag. 338-350, 1974.

- 20.- Goodwin J: Failure To recognize efficacious treatments - of Juvenile rheumatoid arthritis. *Perspectives in Biology and Medicine*. *Annu Rev Immunol* 4 (1): 78-89, 1981.
- 21.- Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 231: 232-235, 1971.
- 22.- MacMurray WC: In a synopsis of human biochemistry. Ed Harper and Row Publishers Philadelphia pag 196, 1982.
- 23 - Zeitlin IF; Grennan DM: The role of the inflammatory mediator in joint inflammation in: *Recent advances in Rheumatology, Part I* Ed Buchanan and Dick. *Churchil Livingstone*. Edinburgh London and New York 195-212, 1976.
- 24.- Henson P: The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. *J Immunol* 107 (6): 1535-1546, 1971.
- 25.- MacGregor R; Spangnuolo J: Inhibition of granulocyte -- adherence by ethenol prednisone and aspirin measured --

- with an assay system. *The England Journal of Medicine* 291 (13): 642-646, 1974.
- 26.- Di Rosa M: A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of active of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Path* 105; 239-256, 1971.
- 27.- Fisher T; Gard S; Rachelefaky S: Monocyte chemotaxis under agarose. *Pediat Res* 14: 242-246, 1980.
- 28.- Goodman Gilman, Alfred; Goodman, Louis; Gilman, Alfred: *Las bases farmacológicas de la terapéutica. Sexta edición. Cap. 29 (674-719), 1981.*
- 29.- Boyd, William C. *Fundamentos de Inmunología. Tercera edición pag. 346-350, 1975.*
- 30.- Novales Robles BL. *Manifestaciones Extra-articulares en la Artritis reumatoide. Tesis UNAM pag. 1-4, 233-245, 1975.*
- 31.- Kemp, A.S.; Smith, Joan: The effect of salicylate on human leucocyte migration. *Clin exp Immunol* 49: 233-238, 1982.

- 32.- Vane, J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as mechanism of action for aspirin like drugs. *Nature New - Boil* 231: 232-235, 1971.
- 33.- Smith, M.J.H.; Ford-Hutchinson, A.W.; Elliot, P.N.C.: Prostaglandins and the anti-inflammatory activities of aspirin and sodium salicylate. *J. Pharm Pharmac* 27: -- 473-478, 1975.
- 34.- Mauer, A.M.; Athens, J.W.; Ashenbrucker, H.; Cart-Wright, G.E. & Wintrobe, M.M.: Leukokinetic studies II. A method for labelling granulocytes "in vitro" with radioactive diisopropylfluorophosphate (DFP<sup>32</sup>). *J. clin Invest* 39: 1481, 1960.
- 35.- Klebanoff, S.J. : Antimicrobial mechanisms neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Semin Hematol* 12: 117, - 1975.
- 36.- Bellanti, J.A. & Dayton, D H.: *The phagocytic cell in - host resistance*. Raven Press, New York (1975).
- 37.- Fundenberg, H. Hugh; Stites, Daniel P.: *Manual de Inmunología Clínica*, 2a. Edición, capítulo 8 (84-102) y capítulo 20 (241-263), 1980.

- 38.- Korolkovas, Andrejus: *Compendio Esencial de Química Farmacéutica*. Editorial Reverté, S.A. (España). pag 105, 181, 564 y 816, 1979.
- 39.- Gómez Estrada, Héctor; García González, JL: *Disfagocitosis Neonatal por deficiencia de tetrapéptido*. *Archivos de Investigación Médica* 6 (1): 403, 1975.
- 40.- Gómez Estrada, Héctor: *Actividad fagocítica de los macrófagos de conejos a diferentes temperaturas*. *Archivos de Investigación Médica* 10: 15, 1979.
- 41.- Anibal Margi, Ricardo: *Fundamentos de Inmunología e Inmunofísica*. 2a. Edición, pag. 498, 1980.
- 42.- Nelson, Roberto D; Que, Paul G; Simmons, Richard L: -- *Chemotaxis under agarose: A new and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes*. *The Journal of Immunology* 115 (6): 1650-1656, 1975.
- 43.- Dahl, Mark V; Lindroose, William E: *Leukocyte Chemotaxis under agarose: Manipulations of serum and plasma before incorporation into agarose can influence cell movement*. *Journal of Immunological methods* 29: 301-310, 1979.

- 44.- D. Male, LM; Roitt, FC: Analysis of Immune complexes in synovial effusions of patients with Rheumatoid arthritis. *Clin exp Immunol*, 39: 297-306, 1980.
- 45.- Downie, N.M.; Heath, R.W.: Métodos Estadísticos Aplicados. Edit. Harper & Row. Capitulo 12: 182-203 y capitulo 18: 281-295, 1981.
- 46.- Mowat, Alastair G; Baum, John: Chemotaxis of polymorphonuclear Leukocytes from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* 50: 2541-2548 1971.
- 47.- A. Ferrante, Lorraine J. Beard & Y.H. Thong: Early decay of human neutrophil chemotactic responsiveness following isolation from peripheral blood. *Clin exp Immunol* 39: - 532-537, 1980.
- 48.- Kemp, A.S.; Brown, Susan: Inhibition of neutrophil migration by aggregated immunoglobulin attached to micro--pore membranes. *Immunology* 39: 529 534, 1980.
- 49.- Katz W.A.: Modern management of rheumatoid arthritis. *Am J Med*, Oct 25; 79 (4C): 24-31 (43 ref.), 1985.



- 50.- Davies P, et al: The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2: 335-57 (152 ref), 1984.
- 51.- Roch-Arveiller H, et al: Modification of neutrophil chemotactic responsiveness during various inflammatory reactions *Pathol Res Pract*, Aug; 180 (2): 130-5, 1985.
- 52.- Kvein T.K., et al: Acetylsalicylic acid and juvenile rheumatoid Arthritis. Effect of dosage interval on the serum salicylic acid level. *Acta paediatr Scand*, Sep; 74 (5); 755-9, 1985.
- 53.- Fantone JC, et al: Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease. *Hum Pathol*, Oct; 16(10) 973-8 (65 ref), 1985.
- 54.- Udén A M. et al: Relation to chemotactic factor gradients to neutrophil migration and orientation under agarose. *J Leukocyte Biol*, Jan; 39(1): 27-35, 1986.
- 55.- Reeback JS, et al: Circulating immune complexes and rheumatoid arthritis: a comparison of different assay methods and their early predictive value for disease acti-

- vity and outcome. *Ann Rheum Dis*, Feb; 44 (2): 79-82, - 1985.
- 56.- Dahlgren C.: The choice of agarose in the under-agarose assay critically affects neutrophil locomotion (letter). *J. Immunol Methods*, Apr. 17; 88 (2): 287-8, 1986.
- 57.- Malmsten C.L.: Prostaglandins, Thromboxane, and Leukotrienes in inflammation. *Semin Arthritis Rheum*, Nov; - 15 (2 Suppl 1): 29-35 (92 ref.), 1985.
- 58.- Moore TL, et al: Mediators of inflammation. *Semin Arthritis Rheum*, May; 14 (4): 247-62 (200 ref.), 1985.
- 59.- Williams RC Jr.: *Immune Complexes in Clinical and Experimental Medicine*. Cambridge: Harvard University Press, 1980.

## A P E N D I C E

## PREPARACION DE REACTIVOS:

## Solución buffer de Hanks (HBSS)

## Fórmula:

NaCl . . . . .	8000 mg/l
KCl . . . . .	400 mg/l
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O . . . . .	60 mg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O . . . . .	100 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	60 mg/l
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	140 mg/l
Dextrosa . . . . .	1000 mg/l
NaHCO <sub>3</sub> . . . . .	350 mg/l
Rojo de fenol. . . . .	2.5 mg/l

Se disolvió el NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> en 500 ml. de -- agua destilada. Aparte se disolvió la dextrosa, los fosfa-- tos y rojo de fenol en 400 ml de agua destilada. Ambas solu-- ciones se mezclaron y esterilizaron a través de filtros esté-- riles de 0.22 micras. El NaHCO<sub>3</sub> se disolvió en 100 ml de -- agua y esterilizó en autoclave. En el momento de su uso se añadió a la mezcla anterior.

Medio de RPMI 1640

Fórmula:

1 sobre de RPMI 1640  
 2 g de bicarbonato de sodio  
 5 ml de penicilina "g" sódica  
 5 ml de estreptomocina "s"

El bicarbonato de sodio se disolvió previamente en 50 ml de agua destilada estéril y se filtró, posteriormente se agregaron los demás reactivos, se aforó a 1000 ml con agua destilada estéril. Se mezcló fuertemente durante 10 min. Se conservó en refrigeración y se ajustó su pH a 7.0 al momento de su uso.

Azul de Tripan 0.1%

Fórmula:

Azul de Tripan . . . . .	0.4 g
NaCl . . . . .	0.8 g
$K_2HPO_4$ . . . . .	0.06 g
Agua destilada . . . . .	95 ml

Filtrar y al momento de utilizarlo, diluirlo 1:4. Es un colorante vital, por lo cual se preparó y guardó en forma estéril.

## PREPARACION DE AGAROSA:

Se pesaron 0.08 mg de agarosa en 5 ml de agua destilada estéril. En un "baño María" a ebullición se disolvió la agarosa durante 10 a 15 min. La agarosa fue enfriada en un baño de agua a 47°C. La suspensión de agarosa se mezcló con un volumen igual del medio de RPMI-1640 adicionado con 15% de albúmina humana al 25% (5 ml), cuando ambas soluciones hablan alcanzado la misma temperatura a 47°C.

3 ml de la suspensión anterior fueron vaciados en cajas Petri estériles de 35 x 10 mm; se dejó sòlidificar la agarosa a temperatura ambiente. Las cajas fueron refrigeradas por 30 min, 3 series de 3 pozos con diámetro de 2.4 mm y separadas 2.4 mm un pozo del otro, fueron cortados en el gel, -- usando para ello una plantilla con un horador. El gel de los pozos fue removido por succión con una bomba de vacío.