

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**BIODISTRIBUCION DE ERITROCITOS MARCADOS CON PIP-99mTc Y
FRAGILIZADOS CON CALOR, EN RATONES PARA SU USO EN
CENTELLOGRAFIA ESPLENICA**



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, Octubre de 1,998

06
T(1889)
C.4

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	DR. HERBERTH RAUL AREVALD ALVARADO
VOCAL V	DR. MANOLA ANLEU FORTUNY

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS:

Mi padre, mi pronto auxilio, a quien he de agradecer toda mi vida porque me ha permitido llegar hasta aquí, llenándome de toda abundancia espiritual y material.

MIS PADRES

José Maximiliano Chacón Camey
Martha Lidia del Cid de Chacón

Como una recompensa a una vida de sacrificios y limitaciones, que con amor y sin esperar recompensa alguna superaron el cansancio y las adversidades.

MIS HERMANOS

Oswald Geovany Chacón del Cid
Claudia Mariela Chacón del Cid

Por sus consejos y apoyo que siempre me han brindado.

MIS ABUELOS

Rómulo del Cid Oliva (Q.E.P.D)
Justa Ramírez de del Cid (Q.E.P.D)
Fermín Chacón
Elvira Camey de Chacón

Con mucho respeto.

A MI ESPOSA

Lorena Cruz de Chacón

Que siempre estuvo atenta brindándome ánimo y comprensión en los momentos más difíciles

A MI HIJO

Milton Josué Chacón Cruz

Que en lo último, cuando ya me faltaban fuerzas, su sonrisa fué un medio que Dios usó para vencer el cansancio.

A MI FAMILIA EN GENERAL Con mucho cariño

TESIS QUE DEDICO

A:

Mi patria Guatemala

Escuela Nacional Urbana para Varones "20 de Octubre",
Morales, Izabal.

Instituto de Educación Básica Francisco Marroquín, Morales,
Izabal.

Instituto Particular Mixto Dr. Pedro Molina, Bananera,
Izabal.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Compañeros y amigos. En especial a: Pablo Jacinto, Cecilia
Barrientos, Erick Martínez, Karla Lange, Gabriela Soto,
Héctor Cuevas, Sandra Armas.

AGRADECIMIENTOS

A:

Lic. Oscar Federico Nave Herrera
Licda. Diana Freire de Nave

Por su asesoría profesional, pero ante todo su apoyo y paciencia en la realización de esta investigación.

Dirección General de Energía Nuclear, por su colaboración y apoyo económico.

Todos aquellos que de una u otra manera hicieron posible este trabajo.

INDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	3
3.	ANTECEDENTES	5
4.	JUSTIFICACIONES	17
5.	OBJETIVOS	18
6.	HIPOTESIS	19
7.	MATERIALES Y METODOS	20
8.	RESULTADOS	26
9.	DISCUSION DE RESULTADOS	29
10.	CONCLUSIONES	31
11.	RECOMENDACIONES	32
12.	REFERENCIAS	33
13.	ANEXOS	36

I. RESUMEN

La marcación de células sanguíneas es una de las técnicas que se incluyen en medicina nuclear, la cual es empleada específicamente en el área diagnóstica, para determinar patologías de orden esplénico, trombosis venosa profunda, hemorragias internas y otros trastornos.

El objetivo del estudio fue determinar el tiempo máximo en el cual los eritrocitos fragilizados con calor a 49.5°C y marcados con 99m-Tecnecio, eran captados por el bazo, para su posterior uso en gammagrafía esplénica así como evaluar el uso del modelo biológico propuesto (el ratón), para este tipo de estudio.

Para ello se utilizaron diez mililitros de sangre O Rh+ de seis donadores voluntarios con hematocrito normal, la cual se dividió en dos alícuotas de cinco mililitros y se formaron dos grupos, uno el grupo control (eritrocitos marcados con 99m-Tecnecio) y el grupo tratado (eritrocitos marcados con 99m-Tecnecio y fragilizados con calor a 49.5°C durante 20 minutos). Se determinó, el porcentaje de hemólisis de ambos grupos mediante el uso de un tubo de la curva de fragilidad osmótica que contenía una concentración de solución salina de 0.562 gr/dl. Los eritrocitos fragilizados debían presentar una absorbancia entre 0.528-0.563 y un porcentaje de marcación del 90%.

Los eritrocitos fueron posteriormente inyectados en ratones, los que fueron sacrificados a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Se les extrajo sangre, pulmón, hígado y bazo a los cuales se les determinó el porcentaje de actividad de radiación por gramo de órgano en un contador de centelleo tipo pozo.

Se aplicó el análisis estadístico de ANDEVA de tres vías con lo que se determinó que no existía diferencia significativa entre el grupo control y el tratado y los diferentes tiempos de determinación de la actividad por gramo de órgano con un ($p \geq 0.05$), las cuales son debidas a los bajos porcentajes de marcación obtenidos durante el procedimiento.

En estudios hematológicos el perro es considerado el modelo experimental ideal por tener mas similitud con el humano. En esta investigación se propuso al ratón ya que este es el modelo biológico en el que se han realizado los otros estudios en radiofarmacia.

Se realizaron las pruebas de compatibilidad cruzada mayor, empleando eritrocitos humanos de grupo sanguíneo O factor Rh positivos y suero de ratón, observándose que no hay una aglutinación de los eritrocitos IN VITRO, con lo cual se descarta la posibilidad de que el ratón reconozca como extraños a los eritrocitos en un primer contacto.

II. INTRODUCCION

La medicina nuclear es una ciencia que hace uso de compuestos marcados radioisotópicamente para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades.

Una de las ramas de la energía nuclear que ha alcanzado mayor aplicación es la marcación de componentes sanguíneos como plaquetas, leucocitos, eritrocitos, utilizando radiofármacos (fármacos específicos marcados con un radionucleido) que emiten radiación generalmente de tipo gamma.

El tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc) es uno de los radionucleidos más utilizados como trazadores, debido a sus características físicas y químicas, a su fácil obtención y que permite una marcación sencilla.

Existen varios factores que hay que controlar al efectuar un radiomarcaje con ^{99m}Tc , entre ellos la pureza del radiofármaco, la especificidad, la administración al paciente y la información diagnóstica que éste nos proporcione.

En este estudio se marcaron eritrocitos con ^{99m}Tc -PIP y se fragilizaron con calor a 49.5°C por 20 minutos después de haberlos marcado se determinó el tiempo de máxima captación de éstos eritrocitos por el bazo, por lo que se realizó un estudio de biodistribución en ratones extrayéndoles el bazo, así como sangre, hígado y pulmones a los cuales se les midió la actividad por gramo de órgano, por medio de la cantidad de radiación emitida y mediante un estudio cinético.

Anteriormente en Guatemala se han realizado estudios de marcación y fragilización de eritrocitos con calor, pero no se ha realizado un control IN VIVO (ratones) de estos eritrocitos fragilizados, por esto se realizó un estudio para evaluar el mejor tiempo de captación de eritrocitos marcados y fragilizados como se describió anteriormente, evaluando mediante conteo gammagráfico la cantidad de radiación captada por cada órgano evaluado.

III. ANTECEDENTES

A. Técnicas de marcación de eritrocitos

Bale en 1949 utilizó el primer trazador radiactivo para marcaje de eritrocitos (C^{14} -lisina). Desde esa época se utiliza una gran variedad de isótopos entre los cuales, los de mayor utilidad son el ^{51}Cr , el ^{111}In y el ^{99m}Tc (tabla No.1) (1).

El ^{51}Cr es un radiofármaco utilizado como marcador para la determinación del volumen celular y para el estudio de la supervivencia de hematíes (2,3).

El ^{111}In radiofármaco con un período de semidesintegración de 2.81 día y que junto con agentes lipofílicos quelantes como la oxina y la acetilacetona nos proporcionan un marcador de eritrocitos de gran utilidad clínica (2,3).

Otro marcador el ^{99m}Tc , puede ser utilizado en tres formas

- IN VITRO

La cual consiste en la marcación de las células afuera de un modelo experimental. Henning y Schwartz fueron los primeros en describir rendimientos de marcaje superiores al 95% con el método descrito por Berger llamado preestanzado el cual consiste en la incubación de eritrocitos con Sn^{+2} seguido de la adición de pertecnetato (TcO_4^-) el cual permanece

dentro de la célula. Otro método conocido como postestanzado, el cual consiste en la incubación de las células con pertecnetato y adición posterior del Sn^{+2} , cayó en desuso debido a la laboriosidad de dicha técnica, al pequeño volumen de TcO_4^- utilizado y al escaso rendimiento de marcaje (2,3).

Srivastava desarrolló un método el cual utiliza hipoclorito de sodio como agente oxidante del exceso de estaño, disminuyendo así el tiempo de manipulación (3,4).

- IN VIVO

Los estudios realizados sobre la administración previa de Sn^{+2} en la distribución IN VIVO de pertecnetato en pacientes a los que se les había realizado una gammagrafía fue el punto de partida del marcaje de eritrocitos (3,4).

Pavel propuso una técnica de simple inyección de pertecnetato 30 minutos después de la administración de Sn^{+2} evitando el uso de lavados y la centrifugación que es aplicado en los métodos IN VITRO (3,4).

Hamilton estableció que la cantidad mínima que garantiza un marcaje satisfactorio es de aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal de Sn^{+2} en forma de pirofosfato 5-30 minutos antes de la administración del tecnecio por la toxicidad del Sn^{+2} (3,4).

Las concentraciones de Sn^{+2} utilizadas por diversos autores así como los rendimientos de marcaje con la técnica IN

VIVO pueden ser cuantificadas y se observan en la tabla No. 2. Se debe tomar en cuenta que en este tipo de marcaje, el tiempo transcurrido desde la preparación del pirofosfato de estaño hasta su uso y el tiempo entre la reconstitución del vial con el suero fisiológico y su inyección, pueden interferir en el proceso (3,4).

Es muy importante tomar en cuenta la cantidad mínima de estaño establecida por Hamilton ya que cuando se trabaja con muestras biológicas o con los componentes radioactivos propiamente, se expone a la transmisión de enfermedades infecciosas o a la penetración del material radioactivo al organismo, por lo cual es importante tomar toda clase de medida de protección (3-5).

- IN VIVO/IN VITRO

Debido al escaso rendimiento de marcaje y la pobre calidad de imágenes obtenidos con el método IN VIVO.

Callahan, introdujo una modificación de gran utilidad combinando los dos métodos mencionados con anterioridad. Con esta modificación se obtiene un 90% de actividad unida a los hematíes (3-5).

B. Mecanismos de transporte y fijación, estabilidad y elución del trazador:

1. El Cromato sódico ^{51}Cr

Este trazador marca las células en su forma hexavalente y no en su forma catiónica trivalente.

Durante el paso hacia el interior de la célula el Cr^{6+} es reducido a Cr^{3+} uniéndose a la fracción beta de la globina (6,7).

La desventaja principal del ^{51}Cr es su tendencia a eluir de las células marcadas mediante un proceso bifásico, en el cual primero eluye de una manera rápida durante 24 horas, seguida por una desaparición exponencial mucho más lenta. Toda vez este trazador ha eluido de la célula no es reutilizado. La naturaleza de la velocidad de elución se debe principalmente a la pérdida de células no viables a consecuencia del proceso de marcaje (6,7).

En pacientes normales el ritmo de elución es de 1%/día pero varía entre 0.67% y 2.27/día en aquellos que tienen alteraciones hematológicas. La tasa de marcaje con ^{51}Cr será superior a lo normal en las hemoglobinopatías, hemoglobina H, y aún más elevada en hemoglobina fetal, presencia hemoglobina F (alfa 2 y gamma) donde la unión del ^{51}Cr es más débil, por carecer de cadenas beta (6,7)

2. El pertecnetato de sodio ^{99m}Tc

Segun Dewanjee al marcar hematíes IN VIVO administrando de 2 a 4 mg de pirofosfato de estaño, un 30-40% de Sn^{+2} se localiza en hueso, un 40-50% se excreta por vía renal y solo un 5-8% penetra en el eritrocito y se une a la hemoglobina. El pertecnetato penetra por difusión de los canales aniónicos y

es reducido a perteneiato (TcO_2^-) el cual se une a la porción beta de la hemoglobina preferentemente (8).

La distribución relativa del tecnecio en los componentes del hematíe segun Rehani, es de aproximadamente un 95% en el hemolizado (19% en la fracción hemo y 76% en la globina) y 5% en la membrana (4.5 en las proteínas y 0.5% en lípidos) (9,10).

Segun Dewanjee la presencia de glicoproteínas, Sodio-Potasio-Adenosin Trifostasa y Calcio Adenosin Trifosfatasa la membrana del hematíe producen un transporte de pertecnetato y Estaño similar al del Cl^- y Calcio (10).

El Estaño estimula a las ATPasa catiónicas pudiendo a su vez, ser bombeado fuera del eritrocito por las mismas enzimas (10)

Zimmer observó que se producía inhibición de la marcación por la acción de drogas como la metildopa y la hidralacina posiblemente por la oxidación del Sn^{+2} (11).

Zanelli, encontró irregularidades con la digoxina, verapamil, clorotiazida y el propanolol. Lee obtuvo bajos rendimientos con la técnica IN VIVO en pacientes sometidos a medicación cardiactiva y antihipertensora (12,13).

Se han encontrado interferencias en la unión y retención vascular del trazador por la digoxina, la cual afecta el transporte de la membrana del hematíe por inhibición de la bomba de Na^+/K^+ dependientes de ATPasa y del prazosin que

inhibe la captación de norepinefrina en las neuronas periféricas distales. En general, los fármacos antiarrítmicos, diuréticos, hipotensores y beta bloqueadores pueden afectar el marcaje de hematíes con tecnecio (14,15).

C. Hematíes sensibilizados

La actividad de las células del sistema fagocítico mononuclear y la capacidad secuestradora de eritrocitos dañados o sensibilizados son dos de las funciones más importantes del bazo, las cuales junto con ayuda de trazadores permiten la visualización y estudio de dicho órgano (16,17).

Unos de los factores críticos que determina el aclaramiento de los eritrocitos por el bazo es su grado de destrucción. Con una alteración apropiada éstos son alcarados casi en su totalidad selectiva y específicamente por el bazo, por lo que con poca alteración se retrasa su aclaramiento y si el daño es muy severo son aclarados por el hígado o incluso se podría producir hemólisis intravascular (18).

El método de alteración por calor (20 minutos a 49.5 grados celcius) seguidos por el marcaje con tecnecio proporciona aclaramiento rápido de las células, entre 5-15 minutos con actividad esplénica máxima (19).

D. Dificultades técnicas en la marcación de eritrocitos con ^{99m}Tc

Una de las dificultades en la técnica de marcación de eritrocitos es un fenómeno de aglutinación el cual ocurría cuando se hacía una mezcla de eritrocitos lavados con solución salina y un eluido de un generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc . Anteriormente se creía que esta aglutinación se debía a la introducción de grandes cantidades de peróxido de hidrógeno y a la contaminación con trazas de un metal (20,21).

La aglutinación se demostró en células de sangre de todas las especies de animales. Fue satisfactoriamente demostrado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), no tiene efecto en la reacción de aglutinación, mientras que el aluminio sí (21).

Se ha visto que existe una variación diaria en la concentración de aluminio en los generadores así como una marcada diferencia de este metal en los diferentes tipos de generadores. La Comisión de Energía Atómica de los Estados Unidos establece un standard arbitrario de 0.5 mg de aluminio como un máximo disponible por 10 mCi de ^{99m}Tc -pertechnetato. Este fenómeno de aglutinación se previene con cuantificación fisiológica de albúmina y gamma globulina si estos componentes son agregados antes del eluido. Es dudoso que tenga efecto IN VIVO en humanos debido a la protección de estas proteínas (21,22).

E. Aplicaciones clínicas del marcado de células

Cuando se realiza un marcado de eritrocitos es muy importante tener en cuenta la aplicación clínica que se le va a dar ya que con ello se elige el tipo de técnica que se debe de seguir así como el radioisótopo más adecuado a utilizar (23,24).

Existen dos tipos generales de técnicas de marcado, el de cohorte, en pulsos o de estirpe y al azar.

1. Radiomarcado en cohorte o en pulsos o de estirpe:

Con estos nombres se conoce a los radionucleidos (Uruguay y Barcelona) que forman parte de la estructura de la célula, idealmente implica el marcado de los precursores medulares de un tipo dado de célula por un tiempo específico y limitado, sin marcar otras células presentes o circulantes, lo cual permite el estudio de su velocidad de producción, cinética, longevidad, muerte y desaparición en el organismo.

Las aplicaciones clínicas de esta técnica es el estudio de la cinética del hierro y de la sobrevivencia de los eritrocitos (23,24).

2. Radiomarcado al azar

Con este marcado, el radiofármaco se fija en eritrocitos tomados de sangre periférica, marcando así células de diferentes edades en una mezcla al azar y por lo tanto se

aplica sólo al estudio de la vida media de los eritrocitos, así como a la obtención de imágenes gammagráficas (23,24).

Siendo el ^{99m}Tc un radionucleido de tipo al azar presenta sus aplicaciones clínicas específicas (24,25).

En el método IN VITRO es utilizado para sangrado de vías digestivas, gammagrafía de bazo con eritrocitos fragilizados y gammagrafía del bazo con eritrocitos normales para determinar si el bazo presenta un aumento de su función de destrucción celular.

El método IN VIVO, es utilizado para estudios cardíacos de primer paso (fracción de eyección, localización y cuantificación de cortos circuitos).

El método IN VIVO modificado para el estudio de sangrado gastrointestinal.

F. El Bazo

Es un órgano importante para el sistema hematopoyético ya que cumple con la función de vigilancia de eritrocitos que estén sufriendo algún cambio a nivel de su membrana atrapándolos dentro de su red de clasificación (pulpa roja). Dicha facultad ha permitido realizar estudios de la fragilidad o elasticidad que posee estos eritrocitos. Es importante en el estudio de hemólisis idiopáticas, ya sea por problemas de los eritrocitos o patologías propias del bazo (26,27).

La cápsula del bazo en muchos animales inferiores es muy

rica en musculo liso. La estimulación simpática provoca intensa contracción del bazo, por otra parte la inhibición simpática permite una expansión esplénica, con el consiguiente almacenamiento de sangre (27).

En el hombre, la cápsula esplénica carece de músculo pero la dilatación de los vasos puede hacer que el órgano acumule varios centenares de mililitros de sangre (27).

En el bazo hay dos zonas para el almacenamiento de sangre, los senos venosos y la pulpa (27).

Las pequeñas arterias o arteriolas pasan directamente a los senos venosos, los que aumentan de volumen cuando el bazo se distiende. En la pulpa esplénica los capilares son muy permeables de manera que gran parte de la sangre pasa primero a la pulpa y luego difunde a través de ella antes de penetrar los senos venosos (27,28).

El bazo puede almacenar eritrocitos suficientes para que al disminuir el valor de hematocrito en la sangre, pueda este aumentar de 1 a 2 % (27,28).

La sangre que atravieza la pulpa esplénica antes de penetrar en los senos sufre aplastamiento, por lo que los eritrocitos frágiles no resisten el traumatismo, la hemoglobina liberada y el estroma celular son digeridos por las células del sistema fagocítico mononuclear (29).

Durante la vida fetal la pulpa esplénica produce

eritrocitos exactamente igual como la médula ósea. Cuando se acerca el momento del parto el bazo pierde su capacidad de producir eritrocitos, pero en algunas enfermedades como eritroblastosis fetal continúa produciéndolos (30).

G. Centellografía esplénica

La gammacámara es un equipo mediante el cual puede estudiarse la morfología y función de un órgano por medio de la detección de un trazador. El detector es de cristal de yoduro de sodio (NaI) activado con Talio. Existen 37 o mas fotomultiplicadores arreglados en una vía específica y un gran número de poros para canalizar la vía de fotones gamma (30).

Cuando un fotón gamma interactúa con el detector, produce tres señales X, Y y Z, las primeras dos definen la localización precisa de la interacción, la tercera es específica del pico de energía de la interacción que en el caso del ^{99m}Tc es de 140 Kevs (30,31).

Estos signos son representados sobre un osciloscopio. La duración del punto sobre una amplitud ordinaria es tan corta como de 10^{-8} segundos, pero su intensidad es suficiente para exponer a una fotografía o una película de rayos X y así producir una imagen del órgano o sistema que se estudia (31).

La función hematopoyética del bazo reaparece durante condiciones patológicas severas tales como una mielofibrosis avanzada o en anemia hemolítica severa (31).

La centellografía esplénica es ejecutada 15-20 minutos después de la inyección intravenosa de 3-5 mCi de sulfuro coloidal marcado con ^{99m}Tc . La centellografía puede también realizarse y obtenerse imágenes usando células rojas fragilizadas y marcadas con ^{99m}Tc o ^{51}Cr . Las indicaciones para centellografía esplénica incluyen la evaluación del tamaño del bazo, presencia de masa abdominal en el cuadrante superior izquierdo, del defecto focal, bazos accesorios y función esplénica (31,32).

La curva de desaparición de eritrocitos marcados con ^{99m}Tc tiene dos componentes: uno con un tiempo medio de 29 horas (95%) y otra con un tiempo medio de 20 minutos. Aproximadamente cinco por ciento de la actividad es observada en el bazo en relación al secuestro de eritrocitos dañados (32).

- Cuando los eritrocitos marcados con ^{99m}Tc son desnaturalizados por calor a 49°C por 20 minutos, se acumulan selectivamente en el bazo. Veinte minutos después de la inyección, la radioactividad en la sangre baja 50% del nivel máximo. La curva de aclaramiento del plasma es bifásica y la relación de unidad de área de la actividad bazo-hígado en relación a la superficie corporal es normalmente 4:1 (33).

IV. JUSTIFICACIONES

La marcación de eritrocitos con ^{99m}Tc y tratados con calor, es una técnica que se ha empleado en los últimos años para realizar estudios del funcionamiento del bazo y diagnosticar diversas patologías a nivel de dicho órgano.

Además es sabido que la realización de una centellografía esplénica se debe llevar a cabo después de 15-20 minutos de la inyección de sulfuro coloidal marcado con ^{99m}Tc . Esta técnica es la que se utilizaba con anterioridad pero presentaba la desventaja que sólo proporcionaba información acerca de la morfología de un órgano. La ventaja de los eritrocitos marcados es que además de esta función no proporciona información acerca de la función esplénica.

Las técnicas de marcación IN VITRO proporcionan la ventaja de manejar la marcación de eritrocitos fuera del paciente y disminuye así el número de punciones que puedan hacerse a éste. Es por ello que se hizo necesario establecer el tiempo de máxima captación por el bazo de los eritrocitos marcados con ^{99m}Tc , para poder obtener una mejor resolución en la centellografía esplénica y así optimizar el diagnóstico de patologías a nivel de éste órgano.

De lo anterior surgió la necesidad de elaborar trabajos que mejoren la aplicación a la técnica de marcación IN VITRO.

V. OBJETIVOS

- Determinar mediante estudios de biodistribución en ratones el tiempo de máxima captación esplénica de eritrocitos marcados con ^{99m}Tc y fragilizados con calor, estableciendo el tiempo de máxima captación en el bazo.

VI. HIPOTESIS

El tiempo de captación máxima de eritrocitos marcados con PIP-³²mTc y fragilizados con calor a 49.5°C por 20 minutos en el bazo del ratón, es de 30 minutos después de su administración.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

Eritrocitos humanos marcados con ^{99m}Tc -PIP y tratados con calor a 49.5°C provenientes de donadores sanos voluntarios.

B. Muestra a Analizar

Sangre fresca de donadores sanos voluntarios con Hematocrito normal.

C. Recursos

1. Recursos humanos

a. Investigador: Milton Stuardo Chacón del Cid

b. Asesores: Licda. Diana Freire de Nave

Lic. Federico Nave Herrera

2. Recursos Institucionales

Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.

D. Materiales

-Jeringas de 1. 5. 10 y 20 cc

-Agujas de 21 x 1 1/2

-Algodón

-Viales de vidrio tipo penicilina, transparentes

-Tapones de goma para los viales

-Portaviales plomados

-Pipetas plásticas

- Pipetas volumétricas de 10 ml
- Tubos de centrifuga de 10 cc
- Tubos de ensayo de 16 x 100 mm
- Gradillas para tubo de ensayo
- Guantes descartables
- Gabacha de plomo
- Dosímetro
- Cubetas plásticas
- Material de disección (pinzas, separadores, bisturí, tijeras, algodón)

E. Equipo

- Calibrador de dosis: marca Capintec inc., modelo CRC-12
- Centrífuga Lab Line, saf-T-Angle Centrifuge No. 42. Hz 50/60. 280 W.
- Espectrofotómetro Milton Roy Company: Spectronic 20, volts: 115, Hz: 60, Amp: 0.9.
- Contador de centelleo sólido: marca ORTEC, modelo 2000, 0-3 kw.
- pHmetro Fisher accumet: modelo 805 mp, Amp: 0.08, Hz: 50/60.
- Liofilizadora: marca Labconco.
- Plancha agitadora Fisher Scientific Company: modelo 610.
- Baño de agua para Biología Molecular, marca PRECISION, modelo: 180, cat. No. 66630, temp. amb: +5 C a +100 C, 120 voltios, 225 Watts, 1.9 amp, Hz: 50/60.
- Medidor de contaminación radioactiva.

F. Reactivos

Set para marcación de glóbulos rojos:

-Vial 1: Pirofosfato de Sodio/ Sn^{+2} liofilizado 40 mg/10ml

-Vial 2: EDTA al 4.4%

-Vial 3: Peróxido de Hidrógeno 20v. dilución 1:10

-Heparina

-Alcohol Isopropilico al 70 por ciento

-Generador de $^{99\text{m}}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$

-Agua destilada

-Cloruro de sodio

-Fosfato Dibásico de Sodio

-Fosfato Monobásico de Sodio Dihidratado

G. Biológicos

-48 ratones de la Cepa Balzac, de ambos sexos comprendidos entre 20-30 gramos.

-Sangre O Rh⁺ de donadores con hematocrito normal

H. Procedimiento

1. Se extrajeron 10 ml de sangre O Rh⁺ de donadores voluntarios con hematocrito normal (36-48), usando Heparina como anticoagulante. Se agregó cinco mililitros de sangre a cada vial de trabajo, uno para el grupo control (marcado sin fragilizar) y otro para el grupo tratado (marcado y fragilizado con calor a 49.5 C).

2. Se reconstituyó el vial de PIP-Sn²⁺ con 10 ml de solución salina y se dejó en reposo durante 5 minutos.
3. Se agregaron sesenta microlitros del vial de Pirofosfato-estaño reconstituído a cada vial con la sangre y se colocó en un agitador tipo péndulo durante 20 minutos.
4. Se adicionaron 0.3 ml de peróxido de hidrógeno a cada vial con sangre.
5. Se agregó un mililitro de EDTA al 4% a cada cinco mililitros de sangre.
6. Se marcó con cinco mCi de ^{99m}Tc cada cinco mililitros de sangre, para obtener un porcentaje de marcación de aproximadamente 90%.
7. El vial utilizado para el grupo control se dejó en reposo, el vial del grupo tratado se colocó en baño de María a 49.5°C por 20 minutos.
8. Se verificó el porcentaje de hemólisis de los eritrocitos del grupo control y el tratado con la ayuda de un tubo de la curva de fragilidad osmótica que tenía una concentración de solución salina de 0.562 gr/dl.
9. A los 15, 30, 45 y 60 minutos después de la inoculación se procedió a sacrificar a los ratones del grupo control y del grupo tratado.
10. Se procedió a sacrificar a los ratones del grupo control y del grupo tratado, a los 15, 30, 45 y 60 minutos después de la inoculación.

11. Se procedió a la extracción de sangre, pulmón, hígado y bazo del ratón. se tomó el peso de cada órgano y se midió al radiación emitida en un contador tipo pozo.

12. Se obtuvo el porcentaje de actividad por gramo de órgano.

I. Diseño Experimental

En este estudio se formaron dos grupos. un grupo control que consistió en eritrocitos marcados con ^{99m}Tc y un grupo de tratamiento a investigar que consistió en eritrocitos marcados con ^{99m}Tc -PIP y fragilizados con calor a 49.5°C por 20 minutos.

En el primer paso se utilizaron 10 ml de sangre tipo O Rh⁺ de seis donadores con hematocrito normal. En el segundo paso los eritrocitos se marcaron con ^{99m}Tc -PIP. Después de la marcación, los eritrocitos del grupo control se dejaron en reposo y los eritrocitos del grupo tratado, se colocaron en baño de María a 49.5°C por 20 minutos. Se tomó un tubo de la curva de fragilidad osmótica que tenía una concentración de solución salina de 0.562 gr/dl, para evaluar el porcentaje de hemólisis del grupo control y el grupo tratado. Para la evaluación de dichas diferencias pareadas se utilizó la prueba de "t de student", utilizando el área bajo la curva.

Se midió el porcentaje de emisión de radiación por gramo de órgano a través de un contador de centelleo tipo pozo, en diferentes tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos después de la inoculación, lo cual fue estructurado mediante un diseño de bloques al azar.

En el diseño de bloques completos al azar. los tratamientos serán los tiempos de análisis (15, 30, 45 y 60 minutos). los bloques el grupo control y el grupo con tratamiento. Las réplicas serán 4 calculadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n_i = \frac{2NC^2}{\Delta^2}$$

tomando un NC= 2.48 con un alfa=0.05 y beta=0.30

El limite de error (Δ)= 2 DS

por lo que para hacer mas reproducible la prueba se tomará un número de seis réplicas.

Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el tratado se realizará la prueba de ANDEVA (Análisis de Varianza de tres vías).

El número de réplicas mínimas obtenido estadísticamente para el análisis tomando dos desviaciones estándar fue de cuatro por lo que para hacer mas reproducible la prueba se tomará un número de seis.

VIII. RESULTADOS

En este estudio se pretendía evaluar el tiempo de máxima captación por el bazo del ratón de eritrocitos marcados con Tecnecio-99 y fragilizados con calor. Para ello se separaron las muestras de sangre O Rh positivo obtenidas de donadores voluntarios con hematocritos normal, en dos grupos: grupo control (sangre marcada con tecnecio) y grupo de tratamiento (sangre marcada con tecnecio y fragilizada con calor a 49.5°C por 20 minutos).

De la muestra de sangre (diez mililitros en total) se tomaron dos alícuotas de cinco mililitros, una para el grupo control y otra para el grupo de tratamiento llevándose a cabo este procedimiento en las seis repeticiones de igual forma. Se efectuó la marcación de eritrocitos del grupo control y del tratado con ^{99m}Tc obteniéndose el porcentaje de marcación mediante un contador de centelleo tipo pozo (Tabla No.1).

La determinación de la fragilización de eritrocitos se realizó de acuerdo a un estudio anterior, tomando un tubo de la curva de fregilidad osmótica con una concentración de 0.562 gr/dl de solución salina (24), haciéndose posible efectuar el control de calidad del punto óptimo de hemólisis para los eritrocitos y calculándose que para un intervalo de confianza del 95%, los eritrocitos control, debían de producir cero de absorbancia y para los eritrocitos tratados por calor esta concentración de solución salina debía de producir un rango de absorbancia de 0.528 a 0.563 con una longitud de onda de 540 nm, lo que representa aproximadamente

el 50% de hemólisis. Los resultados obtenidos estuvieron dentro de este rango (Tabla No.2).

El análisis del bazo con los diferentes tiempos estudiados nos permite observar que existe un mayor porcentaje de captación por este órgano a los treinta minutos en el grupo control (Tabla No.3 y Gráfica No.1)

El hígado presenta un porcentaje mayor de captación a los treinta minutos tanto del grupo control como del tratado (Tabla No.4 y Gráfica No.2).

El pulmon del grupo control presentó un mayor porcentaje de actividad a los quince minutos y el del grupo de tratamiento a los sesenta minutos (Tabla No.5 y Gráfica No.3).

La sangre del grupo control presentó un porcentaje mayor de actividad a los quince minutos y en el grupo de tratamiento a los sesenta minutos.

La dispersión de datos alrededor de la media observada en las gráficas anteriores (cajas de Tukey), pudieron ser debidas a problemas de contaminación durante el proceso, los cuales interfirieron con los datos obtenidos.

La cinética de captación de los eritrocitos marcados fueron analizados de la siguiente manera: al minuto quince después de haber administrado los eritrocitos marcados a los ratones, se observa que la sangre tanto del grupo control como de tratamiento, presentan el mayor porcentaje de actividad, esto es debido a que una gran parte de los eritrocitos administrados aún se encuentran a nivel del

torrente sanguíneo y la distribución en los diferentes órganos es baja (Tabla No.7 y Gráfica No.5).

A los treinta minutos el bazo alcanza un mayor porcentaje de actividad. observándose que a nivel de sangre los porcentajes han disminuído. indicándonos que la distribución de eritrocitos a nivel del pulmón pudo haberse dado entre los quince y treinta minutos (Tabla No. 8 y Gráfica No.6).

Como se observó los porcentajes de actividad han disminuído después de los quince minutos a nivel sanguíneo, como a nivel pulmonar. haciéndose notorio que entre los minutos treinta y cuarenta y cinco. en órganos como el bazo e hígado se alcanzan los mayores porcentajes de actividad (Tabla No.9 y Gráfica No.7).

Al minuto sesenta, los eritrocitos marcados que no han sido captados comienzan nuevamente su cinética a nivel sanguíneo. por lo que nuevamente se puede apreciar un aumento en el porcentaje de actividad a nivel de este órgano y una disminución en los demás correspondientes (Tabla No.10 y Gráfica No.8).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Se infiere de los resultados obtenidos en la investigación lo siguiente:

La variación en el porcentaje de marcación de eritrocitos en relación a lo establecido en estudios anteriores, fue atribuido al cambio en el porcedimiento de marcación. La disminución del porcentaje de marcación de los eritrocitos después de la fragilización por calor durante 20 minutos, en un rango del 5 al 6%, contribuye de forma negativa a que los porcentajes de actividad por gramo de órgano obtenido durante el estudio, hayan sido bajos, lo que afecta directamente a que se estableciera una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el de tratamiento y en los diferentes tiempo del estudio cinético.

Tomando en cuenta este factor, se dedujo que el aumento en el porcentaje de actividad a los cuarenta y cinco minutos observado a nivel del bazo del grupo control, pudo haber sido un problema de contaminación, ya que se observó que en el grupo de tratamiento la sangre obtiene una elevación en el porcentaje de actividad, haciendo que la cinética de distribución se pierda. Tomando en cuenta la correlación de la cinética de distribución de los eritrocitos marcados con tecnecio-99 se encontró que a los treinta minutos el bazo obtiene su mayor porcentaje de actividad.

Como control en el proceso se utilizó para los eritrocitos tratados con calor, los datos obtenidos en el

estudio anterior (84) en el que se empleó la curva de fragilidad osmótica para determinar el tubo en el cual se produce el 50% de hemólisis, encontrándose que los pequeños cambios no interfieren durante el estudio.

Se realizaron las pruebas de compatibilidad cruzada mayor empleando eritrocitos humanos grupo O factor Rh positivo y suero de ratón observándose que no hay una aglutinación de los eritrocitos *IN VITRO*, con lo cual se descarta la posibilidad de que el ratón reconozca como extraños a los eritrocitos humanos en un primer contacto.

X. CONCLUSIONES

1. El ratón es uno de los modelos biológicos que puede usarse para este tipo de investigación, aunque el recomendado es el perro, ya que se realizaron las pruebas de compatibilidad cruzada mayor, empleando eritrocitos humanos de grupo sanguíneo O factor Rh positivo y suero de ratón, con lo que se descartó la posibilidad de que el ratón reconociera como extraños a los eritrocitos humanos en un primer contacto.
2. Se observa un mayor porcentaje de captación a los treinta minutos, de los eritrocitos marcados con tecnecio y fragilizados con calor, en el bazo del ratón, sin presentarse una diferencia estadísticamente significativa.
3. No existe diferencia significativa en cuanto a la máxima captación de los eritrocitos humanos marcados con ^{99m}Tc sin fragilizar y los tratados con calor a 49.5°C por el bazo del ratón en los diferentes tiempos utilizados en estudio, lo cual pudo deberse a los bajos porcentajes de marcación de los glóbulos rojos.

XI. RECOMENDACIONES

- Antes de efectuar un estudio cinético, en el cual se utilice la administración de células sanguíneas, alcanzar porcentajes de marcación celulares mayores al 90% para obtener una mejor captación de actividad del órgano blanco.
- Llevar a cabo pruebas de compatibilidad cruzadas entre el modelo biológico propuesto y humano (suero del ratón y eritrocitos humanos), en este caso para descartar problemas de incompatibilidad.

XII. REFERENCIAS

1. Sociedad Española de Radiofarmacia. Curs D' Introducció a la Radiofarmacia. Universitat de Barcelona. Doc.Tec. 1993. 234p. (p.151-171).
2. Fisher J, Wolf R. Medicina Nuclear en la Hematología. Fisher J, Leon A. Trad. Alemania: Hoechst. 1967. 137p.
3. Gil MC, Rey AM. Curso Regional de Capacitación sobre la práctica de la Radiofarmacia Hospitalaria: Técnicas para maracación de células sanguíneas. Universidad de Montevideo Uruguay. Doc. Tec. 1994. 40p. (p.1-15)
4. Srivastova SC, et al. Current State of the Art of Blood Cell Labeling. J Nucl Med. 1986; 18:475-476p.
5. Gonzáles BM. Curso Regional de Capacitación sobre la práctica de la Radiofarmacia Hospitalaria: Seguridad y riesgo de la Radiación en el marcado de células sanguíneas. Universidad de Montevideo Uruguay. Doc. Tec. 1994. 30p. (p.2-30).
6. Comisión Chilena de Energía Nuclear. Mecanismos de localización de algunos radiofármacos utilizados en Medicina Nuclear: nuevos agentes de radiodiagnóstico. Chile: CCHEN. 1982. 67p.
7. Saha GB. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 3rd.ed. New York. 1992. XVI+322p. (p.116-118).
8. Eckelman W, et al. Technetium-labeled RBC. J Nucl Med. 1970; 12:22-23.
9. Rehani MM, Sharma SK. Site of ^{99m}Tc binding to the RBC: Concise communication. J Nucl Med. 1980; 21:676-678.
10. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. New York: Scientific American Books, 1986. XXXV+1187p.
11. Zimer AM, Pavel DG, Karesh SM. Technical Parameters of "in vivo" RBC labeling with ^{99m}Tc . J Nucl Med. 1979; 18:241-245.
12. Saha G. Fundamentals of Nuclear Pharmacy 2ed. New York: Springer Verlag Inc. 1986. VII+287p.
13. Kelbach H. Technetium- 99m labeling of RBC "in vivo": Evaluation of new aproach. J Nucl Med. 1986; 27:1770-1773.

14. Wagner H. Principles of Nuclear Medicine. Philadelphia: W.F. Saunders. 1968. 586c.
15. Maisay M. Medicina Nuclear: Aspectos Clínicos. Barcelona: Doyma. 1983. 125p.
16. Wintrobe M, et al. Clinical Haematology. 8ed. Philadelphia: Lea and Febiger. 1981. 2021p.
17. Brodeck J. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 10a.ed. México: Ed. Panamericana. 1982. 1552p.
18. Wilson R. Hematología Básica. México: Ed. Interamericana. 1988. 233p.
19. Pérez J. Manual de Prácticas de Hematología. 2ed. Guatemala: USAC. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1989. 112p.
20. Masjhr JS. Nuclear Haematology. 517-542 (In Yanatra R. Nofal M. Handbook of Nuclear Medical Practice in Developing Countries. Viena: 1991. 764p).
21. Weinstein MB, et al. Technical Difficulties in Labeling Erythrocytes with ^{99m}Tc : Identification of Agglutinating Substance. J Nucl Med. 1970; 5:183-185p.
22. Rapaport S. Introduction to Haematology. 2ed. New York: JB. Lippincott Co. 1987. 624p.
23. Thakur ML. Radiolabeled blood elements techniques and Clinical applications. 543-550 (En Yanatra R y Nofal M. Handbook of Nuclear Medical Practice in Developing Countries. Viena: 1991. 764p).
24. González BM. Curso Regional de Capacitación sobre la práctica de la Radiofarmacia Hospitalaria: Aplicaciones Clínicas del marcado de células. Universidad de Montevideo Uruguay. Doc. Tec. 1994. 50p. (p.1-25).
25. Newman P, et al. Visualizing Cardiac Blood Pool: Comparison of three labeling methods. J Nucl Med, 1983; 8:463-466.
26. Stites DP, Terry AI. Inmunología Básica y Clínica. 7a.ed. México. El Manual Moderno S.A. de C.V. 1991;
27. Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. 7a.ed. México. Interamericana Mc Graw-Hill. 1990; 1051p. (p.342-343).

28. Valk P. Guille J. Measurement of splenic function with heat damaged RBC: effect of heating conditions: Concise Communication. J Nucl Med. 1984: 25:965-968p.
29. Lehniger AL. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a.ed. Calvet F. Bozal J. trad. Barcelona: Ed. Omega. S.A. 1981. XXIII+1117p.
30. Démenech FM. et al. Medicina Nuclear: Aplicaciones Diagnósticas de los isótopos radioactivos. ed. Barcelona-España: Ed. Científica Médica. 1980. XVII+364p. (p.13-28).
31. International Atomic Energy Agency. Handbook of Nuclear Medicine: Practice in developing countries. Viena: 1992. 715p. (p.17-111).
32. William B. et al. Essential of Nuclear Medicine Science. ed. Baltimore-London: Williams and Wilkins. 1987. XVI+439p. (p.9-19).
33. Johnson PM. Herion JC. Technical considerations in scintillation scanning of the spleen. Radiol 76:438-443. 1961.
34. Estrada FC. Comparación de los métodos de alteración o sensibilización de eritrocitos marcados con ^{99m}Tecnecio para su uso en centrellografía esplénica. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (tesis de graduación. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1993.

XIII. ANEXOS

CUADRO No. 1

MARCADORES RADIOISOTOPICOS PARA ELEMENTOS SANGUINEOS

	Cohorte, estirpe o en pulsos.	Al Azar
Eritrocitos	^{15}N -Glicina ^{14}C -Glicina ^{59}Fe . ^{55}Fe . ^{52}Fe ^{75}Se -metionina	^{32}P -ortofosfato ^{32}P . ^3H ^{14}C - diisopropilfluorofosfato (DFP) ^{51}Cr -cromato de sodio $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sn

Fuente: Ref. 24

CUADRO No. 2

RENDIMIENTOS DE MARCAJE CON LA TECNICA "IN VIVO"

AUTOR	[Sn+2]	TIEMPO	RENDIMIENTO
		Sn+2 a ^{99m}Tc	%
Pavel	27.3 microg/kg	30'	96 (5'); 95 (60')
Hamilton	10 microg/kg	5'-30'	85 ± 2 (120')
Parker	700 microg/kg	15'-30'	71 ± 12 (60')
Hegge	2050 microg/kg	30'	76 (30')
Esquerre	8.5 microg/kg	30'	78 ± 9

Fuente: Ref. 24

TABLA No. 1

PORCENTAJES DE MARCACION OBTENIDOS DE LAS SEIS MUESTRAS
DE SANGRE DEL GRUPO CONTROL Y DEL TRATADO

No.	GRUPO CONTROL %	GRUPO TRATADO %
1	45	50
2	45	55
3	81	81
4	76.1	76.1
5	80	80
6	85.1	85

Grupo control: eritrocitos marcados con ^{99m}Tc -PIF.
Grupo tratado: eritrocitos marcados con ^{99m}Tc -PIF y
fragilizados con calor por 30 minutos a 49.5°C .

TABLA No. 2

ABSORBANCIA DE LAS SEIS MUESTRAS DE SANGRE DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO, OBTENIDOS MEDIANTE LA UTILIZACION DE LA CURVA DE FRAGILIDAD OSMOTICA

No.	GRUPO CONTROL Absorbancia	GRUPO TRATADO Absorbancia
1	.005	.600
2	.005	.545
3	.000	.556
4	.000	.567
5	.000	.556
6	.000	.545

Grupo control: eritrocitos marcados con ^{99m}Tc .
Grupo tratado: eritrocitos marcados con ^{99m}Tc y fragilizados con calor por 20 minutos a 49.5°C .

TABLA No. 3
 Porcentajes de actividad por gramo de órgano de los
 de los eritrocitos del donador No.1

P. RATON	CODIGO	P.ORGANO	CUENTAS	ACT/ORGANO	%ACTIV
C 30grs	C1s	0.084 gr	927	11035.71	43.54
	C1p	0.183	928	5860.11	22.33
	C1h	1.120	7520	6163.93	24.32
	C1b	0.128	318	2484.38	9.80
T 34grs	T1s	0.032 gr	445	13906.25	48.12
	T1p	0.204	1537	7534.31	26.1
	T1h	1.579	8993	4428.75	15.32
	T1b	0.064	194	3031.25	10.50
C 32grs	C2s	0.121 gr	2501	20669.42	19.96
	C2p	0.182	2031	11159.34	10.77
	C2h	1.396	76482	54786.53	52.90
	C2b	0.088	1492	16954.54	16.37
T 34grs	T2s	0.046 gr	1136	24695.65	54.60
	T2p	0.222	2377	10707.21	23.70
	T2h	1.587	10843	6832.39	15.10
	T2b	0.095	287	3021.05	6.70
C 35grs	C3s	0.098 gr	208	2122.45	6.88
	C3p	0.202	762	3772.28	12.23
	C3h	1.817	34541	19009.90	61.62
	C3b	0.088	523	5943.20	19.27
T 34.5gs	T3s	0.283 gr	5778	20416.96	36.55
	T3p	0.203	1806	8896.55	15.93
	T3h	1.705	12582	7379.50	13.21
	T3b	0.036	690	19166.67	34.31
C 32.5gs	C4s	0.170 gr	2027	11923.53	49.70
	C4p	0.213	1064	4995.31	20.80
	C4h	1.375	6444	4686.55	19.52
	C4b	0.161	386	2397.52	9.99
T 30grs	T4s	0.043 gr	510	11860.47	45.41
	T4p	0.139	808	5812.95	22.25
	T4h	1.124	4998	4446.62	17.02
	T4b	0.049	196	4000.00	15.31

1,2,3 y 4: son los tiempos 15, 30, 45 y 60. minutos respectivamente.

C: grupo control

T: grupo tratado

s: sangre

p: pulmón

h: hígado

b: bazo

P: peso

ACT: Actividad

TABLA No. 4
Porcentajes de actividad por gramo de órgano de los
eritrocitos del donador No. 2

P.RATON	CODIGO	P.ORGANO	CUENTAS	ACT/ORGANO	%ACTIVI
C 23grs	C1s	0.206 gr	476	2310.68	33.60
	C1p	0.103	157	1524.27	22.20
	C1h	1.338	3117	2329.60	33.88
	C1b	0.118	84	711.86	10.35
T 22.6gs	T1s	0.116 gr	363	3129.31	50.80
	T1p	0.217	263	1304.15	21.20
	T1h	1.292	1502	1162.54	18.87
	T1b	0.133	75	563.91	9.15
C 25.5gs	C2s	0.161 gr	359	2229.81	41.20
	C2p	0.218	272	1247.71	23.05
	C2h	1.427	1438	1007.71	18.81
	C2b	0.098	91	928.57	17.15
T 22.9gs	T1s	0.314 gr	692	2203.82	19.95
	T1p	0.183	480	2622.95	23.74
	T1h	1.264	4885	3864.71	34.99
	T1b	0.124	292	2354.84	21.32
C 23.8gs	C3s	0.157 gr	383	2439.50	42.58
	C3p	0.160	180	1000.00	17.45
	C3h	1.311	1678	1278.40	22.31
	C3b	0.088	87	1011.63	17.66
T 21.4gs	T3s	0.152 gr	353	2322.37	45.44
	T3p	0.191	266	1078.53	21.10
	T3h	1.161	1440	1240.31	24.27
	T3b	0.228	107	469.30	9.18
C 22grs	C4s	0.296 gr	580	1959.46	39.77
	C4p	0.171	179	1046.80	21.25
	C4h	0.746	713	955.80	19.40
	C4b	0.084	81	964.29	19.57
T 24.4gs	T4s	0.116 gr	331	1991.38	28.06
	T4p	0.165	308	1866.67	26.30
	T4h	1.446	3287	2273.17	32.03
	T4b	0.117	113	965.81	13.61

1,2,3 y 4: Son los tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente.

C: grupo control

T: grupo tratado

s: sangre

p: pulmón

h: hígado

b: bazo

P: peso

ACT: Actividad

TABLA No. 5
Porcentajes de actividad por gramo de órgano de los
eritrocitos del donador No. 3

P. RATON	CODIGO	P. ORGANO	CUENTAS	ACT/ORGANO	%ACTIV
C 28grs	C1s	0.182	3487	19159.34	46.34
	C1p	0.160	1486	9287.50	23.46
	C1h	1.328	7794	5868.98	14.20
	C1b	0.103	724	7029.13	17.00
T 32grs	T1s	0.144	13693	95090.28	18.95
	T1p	0.242	36369	150908.71	30.10
	T1h	1.328	250886	188920.18	37.66
	T1b	0.320	21366	66768.75	13.31
C 30grs	C2s	0.083	2838	34192.77	15.82
	C2p	0.250	6322	25288.00	11.74
	C2h	1.247	15776	126512.43	58.76
	C2b	0.097	2842	29298.97	13.61
T 32grs	T2s	0.181	7935	43839.78	35.04
	T2p	0.235	8741	37195.79	29.73
	T2h	1.705	30475	17873.90	14.29
	T2b	0.149	3905	26208.95	20.95
C 28.5gs	C3s	0.187	8014	42855.61	37.46
	C3p	0.156	4880	30000.00	26.20
	C3h	1.382	18141	13619.37	11.89
	C3b	0.095	2662	28021.05	24.47
T 25.5gs	T3s	0.060	3238	53966.67	41.46
	T3p	0.167	5150	30838.32	23.70
	T3h	1.260	21463	17034.13	13.09
	T3b	0.077	2176	28259.74	21.72
C 26grs	C4s	0.245	9351	38167.35	33.40
	C4p	0.144	4844	32250.00	28.22
	C4h	1.159	20816	17960.31	15.72
	C4b	0.096	2485	25885.42	22.65
T 31grs	T4s	0.180	4000	22222.22	39.96
	T4p	0.195	2624	13456.41	24.20
	T4h	1.273	6678	5245.88	9.43
	T4b	0.125	1835	14630.00	26.40

1, 2, 3 y 4: Son los tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente.

C: grupo control

T: grupo tratado

s: sangre

p: pulmón

h: hígado

b: bazo

P: peso

ACT: Actividad

TABLA No. 6
Porcentajes de actividad por gramo de órgano de los
eritrocitos del donador No. 4

P. RATON	CODIGO	P. ORGANO	CUENTAS	ACT/ORGANO	%ACTIV
C 23.5gs	C1s	0.128	3978	31078.12	47.17
	C1p	0.170	2388	14017.65	21.27
	C1h	1.259	10354	8621.12	13.08
	C1b	0.052	688	12173.08	18.47
T 26.8gs	T1s	0.203	97675	481157.64	12.78
	T1p	0.181	154341	852712.71	22.86
	T1h	1.289	425399	330022.50	8.76
	T1b	0.067	140796	2101432.84	55.81
C 22.5gs	C2s	0.237	11120	46919.83	20.69
	C2p	0.145	7544	52027.60	22.94
	C2h	1.095	19175	17511.42	7.72
	C2b	0.054	5957	110314.81	48.64
T 20.5gs	T2s	0.105	6452	51616.00	14.01
	T2p	0.147	8478	57673.47	15.66
	T2h	1.159	156391	134936.15	36.64
	T2b	0.051	6327	124058.82	33.69
C 26.1gs	C3s	0.154	221204	1436389.61	24.85
	C3p	0.138	155929	1129920.39	19.55
	C3h	1.050	417457	397578.09	6.88
	C3b	0.056	157681	2815732.14	48.72
T 24.5gs	T3s	0.074	2182	29486.49	34.75
	T3p	0.164	2846	16840.24	19.84
	T3h	1.151	27084	23530.84	27.73
	T3b	0.052	780	15000.00	17.68
C 21.2gs	C4s	0.127	3675	28937.00	18.28
	C4p	0.227	3898	17171.81	10.85
	C4h	1.374	116262	84615.72	53.47
	C4b	0.090	2478	27533.30	17.40
T 26.5gs	T4s	0.202	7986	39534.65	45.11
	T4p	0.184	3095	16820.65	19.19
	T4h	1.340	19632	14650.75	16.71
	T4b	0.054	898	16629.63	18.97

1, 2, 3 y 4: son los tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente.

C: grupo control

T: grupo tratado

s: sangre

p: pulmón

h: hígado

b: bazo

P: peso

ACT: Actividad

TABLA No. 7
 Porcentajes de actividad por gramo de órgano de los
 eritrocitos del donador No. 5

P.RATON	CODIGO	P.ORGANO	CUENTAS	ACT/GRAMO	%ACTIV
C 29grs	C1s	0.206	2841	13791.26	3.93
	C1p	0.240	4243	17679.16	12.73
	C1h	1.479	133413	90204.87	64.94
	C1b	0.145	2496	17213.79	12.40
T 32grs	T1s	0.059	17005	288220.34	54.07
	T1p	0.219	13210	60319.63	11.32
	T1h	1.773	155028	87438.24	16.40
	T1b	0.091	8833	97065.93	18.21
C 27.5gs	C2s	0.125	30033	240264.00	45.13
	C2p	0.183	13186	72054.64	13.53
	C2h	1.439	173863	120822.10	22.69
	C2b	0.125	12403	99224.00	18.64
T 25.2gs	T2s	0.277	15928	57501.80	12.87
	T2p	0.204	14492	71039.22	15.90
	T2h	1.228	169570	154372.96	34.55
	T2b	0.098	16067	163948.98	36.68
C 26.5gs	C3s	0.181	5119	23281.77	30.21
	C3p	0.188	4193	22303.19	23.82
	C3h	1.193	14359	12036.04	12.86
	C3b	0.112	3472	31000.00	33.11
T 25.1gs	T3s	0.137	5447	39759.12	40.13
	T3p	0.177	4247	23994.35	24.22
	T3h	1.087	12088	11120.51	11.22
	T3b	0.076	1840	24210.53	24.43
C 32grs	C4s	0.172	7521	45726.74	44.82
	C4p	0.209	5119	24492.82	25.10
	C4h	1.369	15893	11609.20	11.89
	C4b	0.150	2661	17740.00	18.18
T 26.5gs	T4s	0.117	4689	40076.92	39.89
	T4p	0.170	3823	22488.23	22.38
	T4h	1.294	18468	14272.02	14.20
	T4b	0.074	1748	23621.62	25.51

1, 2, 3 y 4: son los tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente.

C: grupo control

T: grupo tratado

s: sangre

p: pulmón

h: hígado

b: bazo

P: peso

ACT: Actividad

TABLA No. 8
 Porcentajes de actividad por gramo de órgano de los
 eritrocitos del donador No. 6

P.RATON	CODIGO	P.ORGANO	CUENTAS	ACT/ORGANO	%ACTIV
C 23.3gs	C1s	0.135	187651	1383733.33	30.38
	C1p	0.207	241067	1160483.10	25.90
	C1h	0.962	427754	443770.27	9.90
	C1b	0.045	68006	1492422.22	33.31
T 22grs	T1s	0.041	3529	65414.63	20.87
	T1p	0.152	12165	74460.53	23.75
	T1h	0.962	90766	93470.90	29.82
	T1b	0.051	4935	80156.86	25.57
C 22.5gs	C2s	0.144	50395	344063.33	19.99
	C2p	0.152	28872	184375.00	10.71
	C2h	0.975	357077	365364.10	21.23
	C2b	0.044	37243	827181.80	48.06
T 22.1	T2s	0.093	36218	380333.33	7.650
	T2p	0.153	89533	579647.06	11.65
	T2h	0.890	426062	477769.66	9.61
	T2b	0.045	159937	3535333.30	71.10
C 24grs	C3s	0.087	16429	179103.45	10.06
	C3p	0.178	27237	148258.43	8.33
	C3h	1.034	315242	304057.06	17.08
	C3b	0.035	41048	1148600.00	64.53
T 23grs	T3s	0.100	13530	126830.00	10.53
	T3p	0.168	26917	155178.60	12.89
	T3h	0.932	246509	263585.84	21.89
	T3b	0.042	28502	658452.38	54.69
C 26grs	C4s	0.114	20835	175333.33	20.05
	C4p	0.170	15704	87394.12	9.99
	C4h	1.159	364757	313986.19	35.91
	C4b	0.084	25849	297642.86	34.04
T 21grs	T4s	0.122	11123	84370.49	43.72
	T4p	0.151	6977	40596.03	23.50
	T4h	1.144	30103	25573.43	14.78
	T4b	0.076	2559	22526.31	13.02

1, 2, 3 y 4: son los tiempos 15. 30. 45 y 60 minutos respectivamente.

C: grupo control

T: grupo tratado

s: sangre

p: pulmón

h: hígado

b: bazo

Tabla No.9 DATOS NO TRANSFORMADOS DE MEDIAS DE PORCENTAJES DE ACTIVIDAD POR GRAMO DE ORGANO OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES TIEMPOS

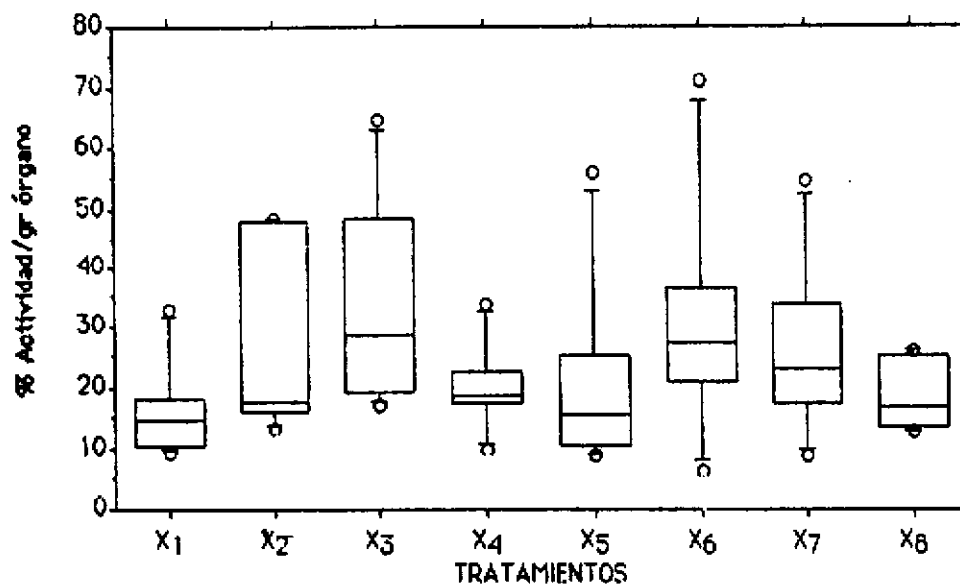
GRUPO Control y Tratado	15 min	30 min	45 min %	60 min
C. sangre	35.24	27.14	25.33	34.34
C. pulmón	21.15	15.46	17.93	19.37
C. hígado	26.72	30.32	22.11	25.98
C. bazo	16.89	27.08	34.63	20.30
T. sangre	34.26	24.02	34.81	41.20
T. pulmón	22.52	20.05	19.61	22.97
T. hígado	21.14	24.20	18.57	17.36
T. bazo	22.09	31.74	27.00	18.80

TABLA No. 10
ANALISIS ESTADISTICO DEL BAZO DEL
GRUPO CONTROL Y TRATADO EN RELACION A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE
TRATAMIENTO

Source:	df.	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	.409	.409	.002	.9666
TIEMPOS (B)	3	1357.54	452.513	1.968	.1343
AB	3	327.195	109.065	.474	.702
Error	40	9199.219	229.98		

TIEMPOS:		Quince	Treinta	Cuarentic	Sesenta	Totals
GRUPOS	Control	6 16.880	6 27.078	6 34.627	6 20.305	24 24.725
	Tratado	6 22.092	6 31.74	6 27.002	6 18.803	24 24.909
Totals:		12 19.49	12 29.409	12 30.814	12 19.554	48 24.817

GRAFICA No. 1
COMPARACION DEL BAZO DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN LOS DIFERENTES
TIEMPOS DE TRATAMIENTO



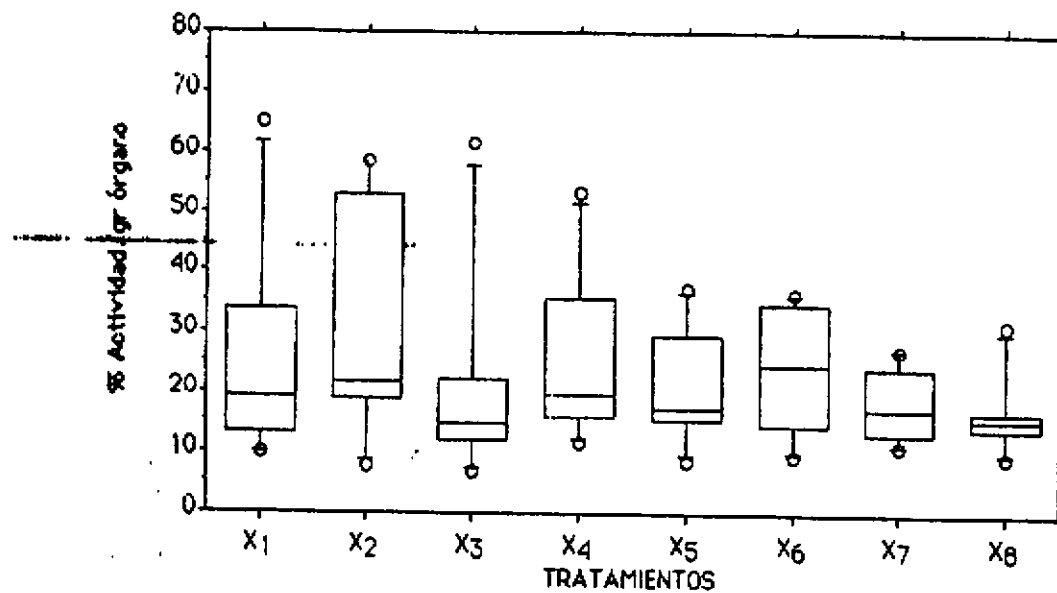
X1=C-15
X2=C-30
X3=C-45
X4=C-60
X5=T-15
X6=T-30
X7=T-45
X8=T-60

TABLA No. 11
ANALISIS ESTADISTICO DE HIGADO DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN
RELACION A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO

Source:	df.	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	427.154	427.154	1.823	.1846
TIEMPOS (B)	3	329.761	109.92	.469	.7055
A8	3	39.381	13.127	.056	.9823
Error	40	9373.07	234.327		

TIEMPOS:		Quince	Treinta	Cuarenta..	Sesenta	Totals:
GRUPOS	Control	6 26.72	6 30.318	6 22.107	6 25.985	24 26.283
	Tratado	6 21.138	6 24.197	6 18.568	6 17.362	24 20.316
Totals:		12 23.929	12 27.258	12 20.337	12 21.673	48 23.299

GRAFICA No. 2
COMPARACION DE HIGADO DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN LOS DIFERENTES
TIEMPOS DE TRATAMIENTO



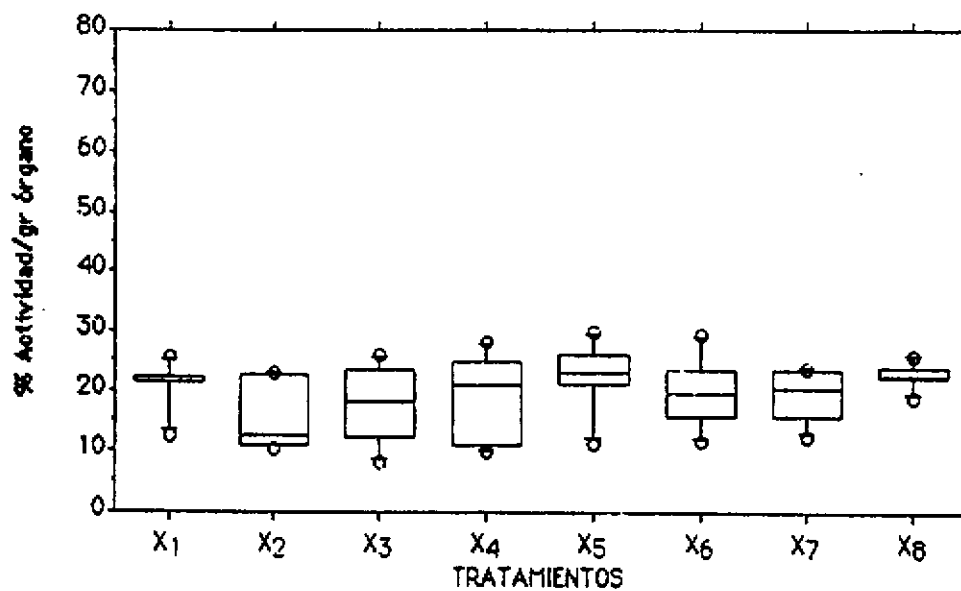
X1=C-15
X2=C-30
X3=C-45
X4=C-60
X5=T-15
X6=T-30
X7=T-45
X8=T-60

TABLA No. 12
ANALISIS ESTADISTICO DE PULMON DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN
RELACION A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO

Source:	df:	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	95.147	95.147	2.851	.0991
TIEMPOS (B)	3	134.442	44.814	1.343	.2741
AB	3	21.578	7.193	.216	.8851
Error	40	1334.935	33.373		

TIEMPOS:		Quince	Treinta	Cuarentic..	Sesenta	Totals:
GRUPOS	Control	6 21.140	6 15.457	6 17.93	6 19.360	24 18.476
	Tratado	6 22.52	6 20.063	6 19.613	6 22.97	24 21.292
Totals:		12 21.834	12 17.76	12 18.772	12 21.169	48 19.884

GRAFICA No. 3
COMPARACION DE PULMON DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN LOS DIFERENTES
TIEMPOS DE TRATAMIENTO



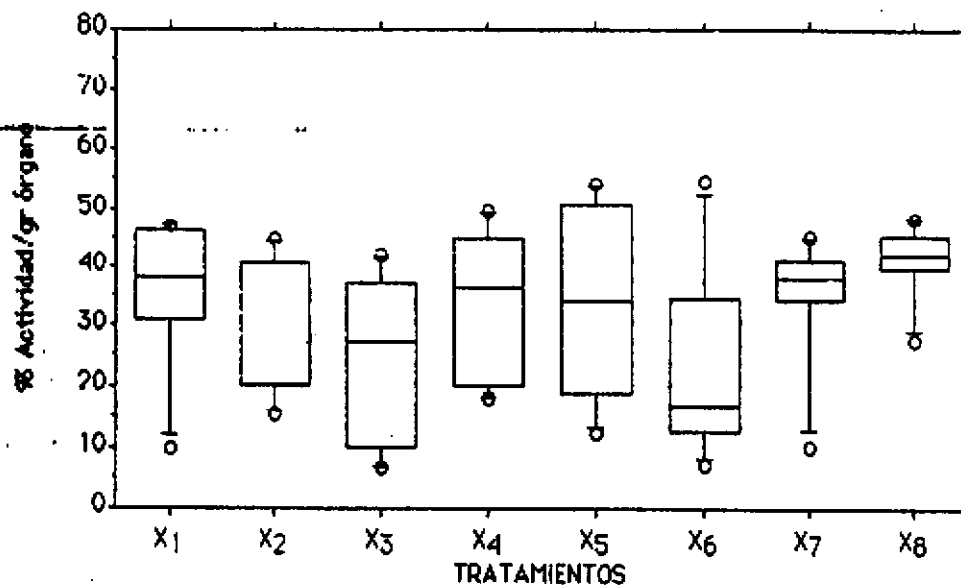
X1=C-15
X2=C-30
X3=C-45
X4=C-60
X5=T-15
X6=T-30
X7=T-45
X8=T-60

TABLA No. 13
ANALISIS ESTADISTICO DE SANGRE DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN
RELACION A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE TRATAMIENTO

Source:	df:	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	112.241	112.241	.56	.4585
TIEMPOS (B)	3	1028.617	342.872	1.712	.18
AB	3	330.354	110.118	.55	.6512
Error	40	8011.598	200.29		

TIEMPOS.		Quince	Treinta	Cuarentic...	Sesenla	Totals:
GRUPOS	Control	35.243	27.142	25.335	34.337	30.514
	Tratado	34.265	24.02	34.813	41.192	33.572
Totals:		12	12	12	12	48
		34.754	25.581	30.074	37.764	32.043

GRAFICA No. 4
COMPARACION DE SANGRE DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO EN LOS DIFERENTES
TIEMPOS DE TRATAMIENTO



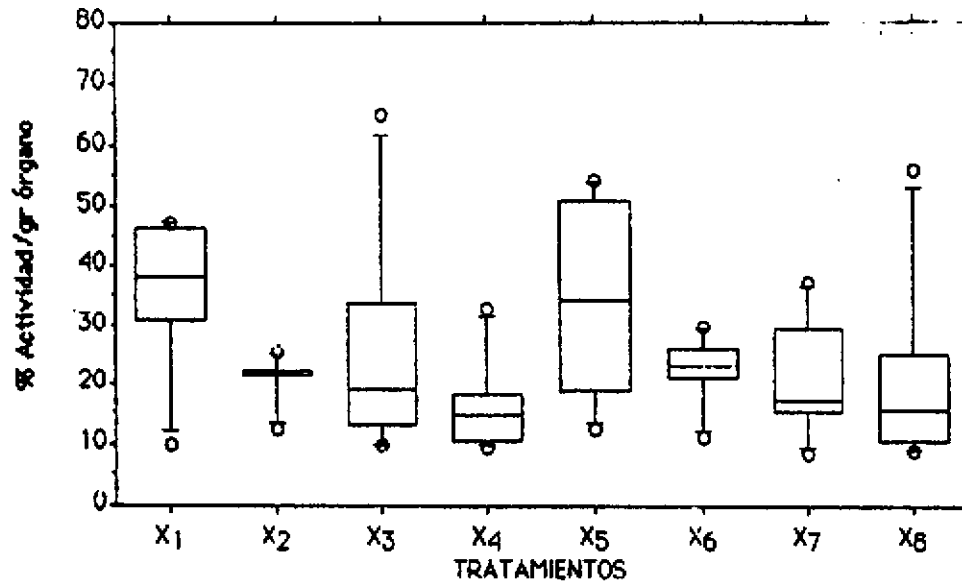
X1=C-15
X2=C-30
X3=C-45
X4=C-60
X5=T-15
X6=T-30
X7=T-45
X8=T-60

TABLA No. 14
ANALISIS ESTADISTICO DEL MINUTO 15 EN RELACION A LOS DIFERENTES ORGANOS
DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO

Source:	df:	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	1.687E-4	1.687E-4	8.810E-7	.9993
ORGANOS (B)	3	1640.076	546.692	2.854	.0491
AB	3	183.205	61.068	.319	.8117
Error	40	7561.48	191.537		

ORGANOS.		Sangre	Pulmón	Hígado	Bazo	Totals.
GRUPOS	Control	6 35.243	6 21.148	6 26.72	6 16.888	24 25
	Tratado	6 34.265	6 22.52	6 21.138	6 22.092	24 25.004
Totals:		12 34.754	12 21.834	12 23.929	12 19.49	48 25.002

GRAFICA No. 5
COMPARACION DEL TRATAMIENTO 15 MINUTOS EN LOS DIFERENTES ORGANOS DEL
GRUPO CONTROL Y EL TRATADO



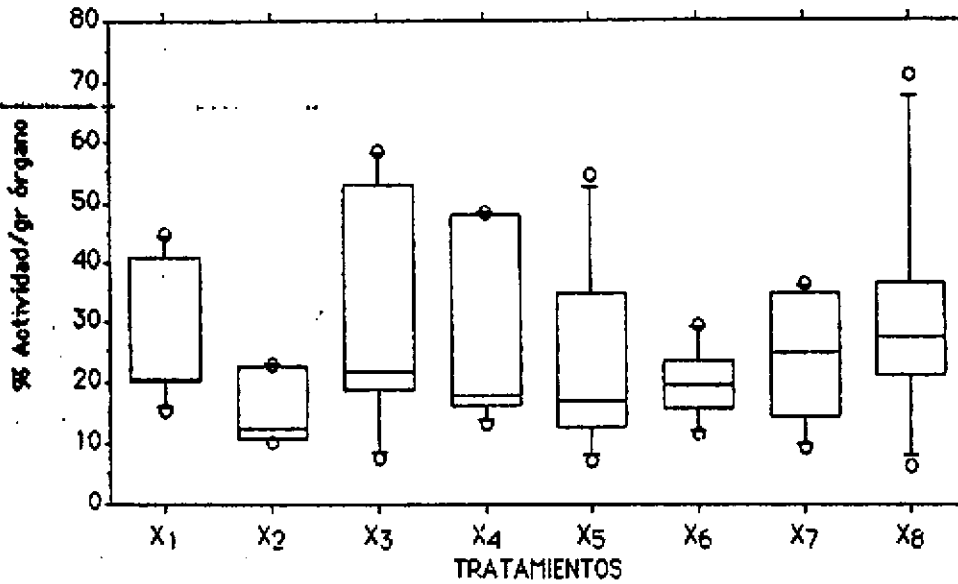
X1=C-SANGRE
X2=C-PULMON
X3=C-HIGADO
X4=C-BAZO
X5=T-SANGRE
X6=T-PULMON
X7=T-HIGADO
X8=T-BAZO

TABLA No. 13
ANALISIS ESTADISTICO DEL MINUTO 30 EN RELACION A LOS DIFERENTES ORGANOS
DEL GRUPO CONTROL Y TRATADO

Source:	df.	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	4.687E-4	4.687E-4	1.986E-6	.9989
ORGANOS (B)	3	927.504	309.168	1.31	.2846
AB	3	270.516	90.172	.382	.7665
Error	40	9441.405	236.035		

ORGANOS:		Sangre	Pulmón	Hígado	Bazo	Totals:
GRUPOS	Control	6 27.142	6 15.457	6 30.318	6 27.078	24 24.999
	Tratado	6 24.02	6 20.063	6 24.197	6 31.74	24 25.005
	Totals:	12 25.581	12 17.76	12 27.258	12 29.409	48 25.002

GRAFICA No. 6
COMPARACION DEL TRATAMIENTO 30 MINUTOS EN LOS DIFERENTES ORGANOS DEL
GRUPO CONTROL Y EL TRATADO



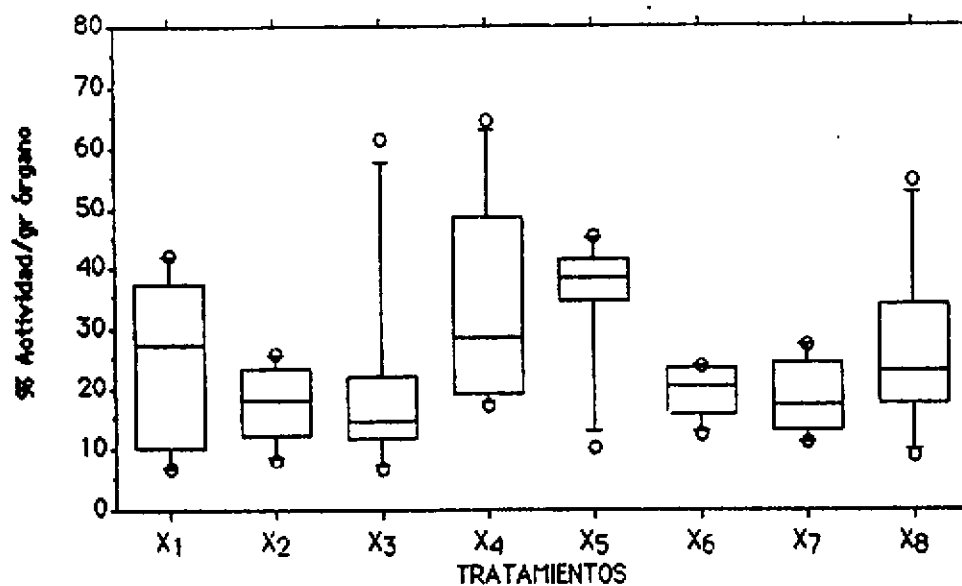
X1=C-SANGRE
X2=C-PULMON
X3=C-HIGADO
X4=C-BAZO
X5=T-SANGRE
X6=T-PULMON
X7=T-HIGADO
X8=T-BAZO

TABLA No. 16
ANALISIS ESTADISTICO DEL MINUTO 45 EN RELACION A LOS DIFERENTES ORGANOS
DEL GRUPO CONTROL Y EL TRATADO

Source:	df:	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	2.083E-6	2.083E-6	1.129E-8	.9999
ORGANOS (B)	3	1440.993	480.331	2.604	.0651
AB	3	489.999	163.333	.885	.4569
Error	40	7379.074	184.477		

ORGANOS.		Sangre	Pulmón	Hígado	Bazo	Totals:
GRUPOS	Control	6 25.335	6 17.93	6 22.107	6 34.627	24 25
	Tratado	6 34.813	6 19.613	6 18.568	6 27.002	24 24.999
Totals:		12 30.074	12 18.772	12 20.337	12 30.814	48 24.999

GRAFICA No. 7
COMPARACION DEL TRATAMIENTO 45 MINUTOS EN LOS DIFERENTES ORGANOS DEL
GRUPO CONTROL Y EL TRATADO



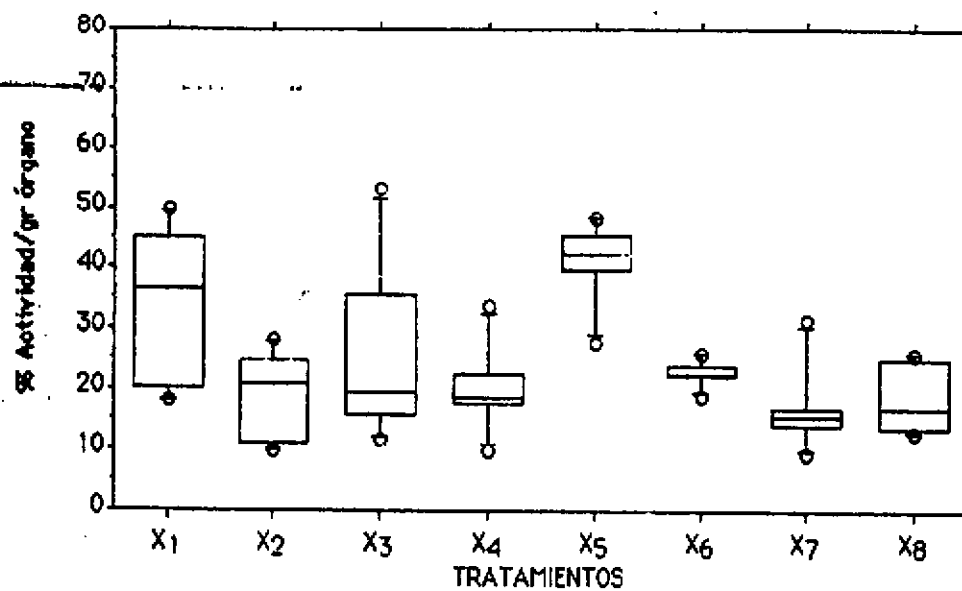
-X1=C-SANGRE
X2=C-PULMON
X3=C-HIGADO
X4=C-BAZO
X5=T-SANGRE
X6=T-PULMON
X7=T-HIGADO
X8=T-BAZO

TABLA No. 17
ANALISIS ESTADISTICO DEL MINUTO 60 EN RELACION A LOS ORGANOS DEL GRUPO CONTROL Y EL TRATADO

Source:	df:	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
GRUPOS (A)	1	.083	.083	.001	.9754
ORGANOS (B)	3	2619.799	873.266	10.164	.0001
AB	3	409.657	136.552	1.589	.207
Error	40	3436.862	85.922		

ORGANOS.		Sangre	Pulmón	Higado	Bazo	Totals:
GRUPOS	Control	6 34.337	6 19.368	6 25.985	6 20.305	24 24.999
	Tratado	6 41.192	6 22.97	6 17.362	6 18.803	24 25.082
Totals:		12 37.764	12 21.169	12 21.673	12 19.554	48 25.04

GRAFICA No. 8
COMPARACION DEL TRATAMIENTO 60 MINUTOS EN LOS DIFERENTES ORGANOS DEL
GRUPO CONTROL Y EL TRATADO



X1=C-SANGRE
X2=C-PULMON
X3=C-HIGADO
X4=C-BAZO
X5=T-SANGRE
X6=T-PULMON
X7=T-HIGADO
X8=T-BAZO

Tabla No. 18
 Resultados de la aglutinación de suero del ratón con
 eritrocitos humanos O positivo

COMPONENTE SANGUINEO	ERITROCITOS HUMANOS O POSITIVO		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRAS
SUERO DE RATON			
Ratón 1	Negativo	Negativo	Negativo
Ratón 2	Negativo	Negativo	Negativo
Ratón 3	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla No. 15
 Resultados de la aglutinación de suero humano con
 eritrocitos de ratón


COMPONENTE SANGUINEO	ERITROCITOS DE RATON		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
SUERO HUMANO DE SANGRE O POSITIVO			
SUERO 1	Positivo	Positivo	Positivo
SUERO 2	Positivo	Positivo	Positivo
SUERO 3	Positivo	Positivo	Positivo


Milton Stuardo Chacón del Cid
INVESTIGADOR


Licda. Diana Freire de Nave
ASESOR


Lic. Oscar Federico Nava Herrera
ASESOR


Licda. Heidi Logemann Lima
DIRECTORA


Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
DECANA