Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

"EFECTO DEL SONICADO DE PLAQUETAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE *Cavia porcellus*"

TESIS I

AUTORES

Huari Marín, Gloria Amanda

Graos Ávila, Adela Marilú

ASESOR

Q.F. Silva Correa Carmen Rosa

Co-ASESOR

Mg. Cruzado Rasco José Lizardo

TRUJILLO-PERÚ

2014

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajo la misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

JURADO DICTAMINADOR

PROF. SALOMÓN ALVA BAZÁN

PRESIDENTE

PROF. ROGER RENGIFO PENADILLOS

MIEMBRO

PROF. CARMEN ROSA SILVA CORREA

MIEMBRO

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO

Dando cumplimiento a lo establecido por el reglamento de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a vuestra honorable consideración y elevado criterio el presente Informe de Tesis tipo I, titulado:

"Efecto del sonicado de plaquetas sobre el sistema inmune de *Cavia porcellus"*

Es propicia la oportunidad para evidenciar el más sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y toda su plana docente que con su capacidad, buena voluntad y enseñanzas que se imparten día a día contribuyen positivamente a nuestra formación profesional.

Señores miembros del Jurado dejamos a vuestra consideración la calificación del presente trabajo.

Los Autores

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

DEDICATORIA

Damos infinitamente gracias a nuestro DIOS
por amarnos a pesar de nuestras debilidades y errores,
por darnos fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se nos presentaban,
y porque sabemos que nos brindará su protección para superar los obstáculos a lo largo de toda nuestra vida.

Amanda y Adela

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

Agradezco la confianza y el apoyo brindado por parte de mis padres Jesús y Susana quienes han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

Adela

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

La culminación de este trabajo se lo debo también a lo más generoso que Dios me ha dado, mis padres:
Godofredo y Gloria.
Por ser quienes me dieron vida, educación, apoyo, consejos,
Por preocuparse por mí en todo momento y
Por la paciencia y dedicación en creer que voy a ser exitosa.

Amanda

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

A mis hermanos:

Godofredo y Matilde

Gracias por ser mis hermanos y mucho más por ser mis amigos, porque me ayudan a disfrutar mejor de las alegrías y hacen menos difícil mis tristezas. El apoyo y confianza que depositan en mí será productivo.

Que Dios siempre los ilumine con sabiduría para que decidan de lo bueno, lo mejor.

Amanda

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

A mis hermanos Ronal, Alicia, Angélica, Vilma, Milner y Mirian quienes siempre han estado junto a mí brindándome consejos y apoyo que me ha ayudado a afrontar los retos que se me han presentado

Adela

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

Nuestro especial reconocimiento a nuestros asesores:

Q.F. CARMEN SILVA CORREA

MG. LIZARDO CRUZADO RASCO

Por la paciencia y los sabios consejos brindados, por su invalorable dedicación y por motivarnos a ser mejores cada día.

Que Dios les bendiga siempre con buena salud y felicidad.

Amanda y Adela

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

INDICE

		Pg.
I.	INTRODUCCION	1
	PROBLEMA	6
	HIPOTESIS	6
II.	MATERIAL Y METODO	
	MATERIAL	7
	METODO	9
	ANALISIS ESTADISTICO	14
III.	RESULTADOS	15
IV.	DISCUSION	21
V.	CONCLUSIONES	26
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27
VII.	ANEXOS	32

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto del sonicado de plaquetas sobre el sistema inmune de *Cavia porcellus*. Se utilizaron dieciséis especímenes entre machos y hembras, de tres a cuatro meses de edad con peso entre 700 a 800 g y fueron distribuidos al azar en grupos testigo y problema. Al grupo testigo se le administró vía endovenosa 0,5 mL NaCl 0,9% por 20 días y al grupo problema 0,5 mL de sonicado de plaquetas en las mismas condiciones. La respuesta del sistema inmune fue evaluada por prueba de inmunoprecipitación y prueba de hemoaglutinación directa, también se realizó el recuento plaquetario antes y después de la exposición al sonicado de plaquetas para evaluar su efecto sobre el número de plaquetas. Se concluye que el sonicado de plaquetas generó síntesis de anticuerpos antiplaquetas en el sistema inmune de *Cavia porcellus*, presentando título de anticuerpo de 1/8 y disminución del número de plaquetas con significancia estadística ($p < 0,05$).

Palabras claves: *sonicado, plaquetas, sistema inmune, inmunoprecipitación, hemoaglutinación directa, recuento plaquetario.*

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ABSTRACT

In the present investigation was determined the effect of platelet sonicate on the immune system of *Cavia porcellus*. Sixteen specimens were used, males and females, from three to four months of age, with weights from 700 to 800 g, and were randomized into control and problem groups. The control group was administered intravenously 0,5 mL NaCl 0,9 % for twenty days and the problem group 0,5 mL of platelet sonicate under the same conditions. The immune system was evaluated by immunoprecipitation test and direct hemagglutination test; also, it was performed the platelet count before and after exposure to platelet sonicate to evaluate the effect on the number of platelets.

It is concluded that platelet sonicate generated antiplatelet antibodies synthesis in the immune system of *Cavia porcellus*, presenting 1/8 antibody titer and decreased platelet count with statistical significance ($p < 0,05$).

Keywords: sonicate, platelet, immune system, immunoprecipitation, direct hemagglutination, platelet count.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

I. INTRODUCCION

El sistema de hemostasis es una maravilla de la naturaleza con mecanismos complejos, implican combinar las plaquetas con los factores de la coagulación que son sintetizados en el hígado y transportados repetidamente por los vasos sanguíneos a todas partes del cuerpo. El sistema hemostático consta de cuatro fases: vasoconstricción localizada en el área afectada; formación de un agregado o trombo de plaquetas sobre la superficie vascular lesionada; formación de fibrina que refuerza el trombo plaquetario, y la eliminación de los depósitos de fibrina o fibrinólisis[1, 2].

Primero, la vasoconstricción reduce el flujo sanguíneo a la zona dañada y facilita las fases hemostáticas siguientes como la acumulación plaquetaria. Luego, debido a la adhesión de las plaquetas al colágeno que solo se produce con la ayuda del factor von Willebrand (vWf) y de la glucoproteina Ib (GPIb) receptor específico de membrana de plaquetaria, se desencadena una serie de cambios morfológicos y funcionales conocidos como activación (como en la bioquímica metabólica, la forma, los receptores de superficie y la orientación de los fosfolípidos de membrana). Las plaquetas activadas se convierten en esferas con pseudópodos y secretan por el sistema canalicular sustancias activas almacenadas en sus gránulos. Algunas de estas sustancias aceleran la formación del coágulo plaquetario (agonistas) y la reparación tisular; cada agonista plaquetario (epinefrina, trombina, ADP, TxA_2, colágeno y FAP) tiene un receptor específico en otras plaquetas[2, 3, 5].

Las plaquetas en reposo tienen concentraciones muy escasas de calcio iónico en el citoplasma, pero cuando hay presencia de productos de las enzimas de

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

membrana (la fosfolipasa C, la fosfolipasa A_2 y la adenilciclasa) causan un movimiento rápido de los iones de calcio intracelular a partir de los sitios de almacenamiento en el sistema tubular denso, así como el trasporte del exterior a través de la membrana y en el interior del citoplasma. Expresando una correlación directa entre la cantidad de calcio citoplásmico y el grado de estimulación [2, 5].

Se considera que cuando la fosfolipasa C escinde al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3)y diacilglicerol (DG), este último activa la proteína cinasa C que desencadena la fosforilación, conduciendo a la secreción a partir de los gránulos y a la aparición del receptor del fibrinógeno, la glicoproteína IIb/IIIb. En el caso de la fosfolipasa A_2, es estimulada por el incremento del calcio citoplásmico e hidroliza los a partir del segundo carbono del esqueleto glicerol del fosfatidilinositol y de la fosfatidilcolina para liberar ácido araquidónico (AA). La enzima ciclooxigenasa convierte al ácido araquidónico en prostaglandinas inestables que se convierten en TxA_2, agonista plaquetario y el vasoconstrictor más potente que se conoce. La tercera enzima de membrana, la adenilciclasa, se estimula por los agentes inhibidores de la agregación de plaquetas y se bloquea por muchos agonistas promotores de dicha agregación. Las concentraciones internas del calcio aumentan por esta acción[2,4,5].

La membrana de las plaquetas activadas ofrece el medio ideal para acelerar la generación de fibrina, al proveer los fosfolípidos necesarios para las reacciones de la fase fluida, principalmente una lipoproteína denominada factor plaquetario; además contiene otros fosfolípidos, ligandos para los factores Va y VIIIa. Así se

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

genera la superficie ideal para las reacciones hemostáticas, se acelera y localiza la activación del FII y FX en el sitio de lesión vascular y se protege al FXa de la inhibición por AT-III. También, varios factores hemostáticos como FXI y FV se encuentren dentro de las plaquetas y la secreción de estos factores aumenta el coágulo[3, 6].

Para la agregación plaquetaria y la formación del coágulo se requiere la proteína insoluble fibrina, ésta se obtiene a partir del fibrinógeno por catalización de la trombina, que deriva del zimógeno denominado protrombina o FII. La formación de trombina se realiza mediante la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca se activa cuando la sangre se pone en contacto con los tejidos, (tromboplastina tisular o factor tisular) y se examina con la prueba del tiempo de protrombina (TP). La vía intrínseca se inicia al contacto del FXII con superficies extrañas a la pared vascular y se explora con la prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (TPPa). La diferencia entre ambas vías es la manera de activar el FX, ya que luego de activar a este factor ambas comparten una vía común para activar a la protrombina [3, 7].

La disolución de coágulo o fibrinólisis impide la obstrucción del flujo sanguíneo; sin embargo, la lisis prematura del coágulo se traduce clínicamente en hemorragia. Este proceso depende la plasmina, una enzima que su sitio de unión esta mediado por lisina, el cual se une a la fibrina y a la α2-antiplasmina. Aunque otras enzimas también tienen efectos fibrinolítico, ninguna lo tiene como la plasmina. La plasmina es una proteasa de serina que hidroliza la fibrina y el fibrinógeno, existen dos tipos de activadores del plasminógeno, intrínsecos y extrínsecos, los primeros son proteínas sanguíneas que convierten el

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

plasminógeno en plasmina cuando la sangre tiene contacto con superficies extrañas, mientras que los activadores extrínsecos están fuera de la sangre y se distribuyen en casi todos los tejidos, incluyendo el endotelio[3].

Un componente importante del sistema hemostático son las plaquetas, estas son fragmentos del citoplasma, se producen en la médula ósea a partir de la misma célula progenitora (UPC-GEMM) donde se originan las series linfoide y mieloide. Bajo influencia hormonal (trombopoyetina), esta célula progenitora se diferencia en células progenitoras megacariotas, la célula progenitora inmadura megacariocito (UFB-Meg) y la célula progenitora megacariocito asignada (UFB-Meg). El megacariocito experimenta en su maduración una serie de endorreducciones, en virtud de las cuales su núcleo se va dividiendo sin hacerlo el citoplasma, lo que da lugar a una célula que puede estar dotada de hasta 64 núcleos, aunque es más habitual verla con menos, ocho o dieciséis[4, 5].

Las plaquetas se distinguen en la circulación sanguínea por su forma discoide y tamaño aproximado de 1 a 3µm de diámetro; normalmente sobreviven de 9 a 10 días y, cuando aumenta su utilización o destrucción también lo hace su producción. Se estima que de 1 000 a 5 000 plaquetas pueden ser producidas por cada megacariocito y se ha calculado que se producen 35 000 plaquetas/mm^3por día, lo que puede incrementarse hasta ocho veces durante el tiempo de mayor demanda. El recuento de plaquetas en el ser humano normal muestra una amplia variación, abarcando desde 150 000 hasta 450 000/µL, o también 150 000 a 450 000/mm^3, o 150-450 x 10^9/L, que de las tres formas se puede expresar[4, 8, 9].

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

Hay una gran cantidad de factores que pueden alterar la función plaquetaria, tales como fármacos, enfermedades renales o hepáticas, sepsis, aumento de la degradación del fibrinógeno, circulación extracorpórea y trastornos primarios de la médula ósea. Mientras que la alteración en el número de plaquetas puede ser por la falta de producción se suele presentar en aplasias medulares, como la anemia, o en invasiones medulares por procesos cancerosos como leucemias, linfomas u otros cánceres; o su excesiva destrucción como puede ocurrir cuando se fabrican anticuerpos contra las plaquetas equivocadamente. Ello es conocido como púrpura trombocitopenia inmune (PTI) [10, 11, 12].

La PTI es definida como enfermedad autoinmune con trombocitopenia aislada (recuento de plaquetas < 100 x 10^9/L) sin causas y trastornos asociados, adquirida de curso clínico muy variable, en la que hay una destrucción acelerada y una producción inadecuada de plaquetas. La PTI afecta a personas de ambos sexos y todas las edades, no existen pacientes típicos de PTI, se estima que la PTI afecta a 3.3/100 000 adultos por año y entre 1.9 y 6.4/100 000 niños por año. El diagnóstico sigue siendo de exclusión, cursa con un aumento del riesgo de hemorragia, aunque no siempre hay manifestaciones hemorrágicas. Según el tiempo de evolución (<3 meses, 3-12 meses y >12 meses) se proponen los términos de PTI de reciente diagnóstico, PTI persistente y PTI crónica, respectivamente[13, 14, 15].

La transfusión de plaquetas es una herramienta esencial en la medicina moderna, por lo que existe una demanda creciente de concentrados de plaquetas (CPs). Permiten la restauración del volumen, la restauración de la capacidad de

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

transporte de oxígeno y la restauración de la función hemostática, en caso que se transfunda sangre extraída en menos de 24 horas[16, 17, 18].

El concentrado de plaqueta es un tratamiento transitorio de vida corta y autolimitada en enfermos oncohematológicos no trasplantados y en casos donde existan trastornos de la coagulación, siendo una de las reacciones adversas la púrpura trombocitopenia inmune; ésto constituye un motivo de gran importancia contribuir a la investigación del estudio de fisiopatología plaquetaria para poder trazar posibles soluciones a la mencionada patología es necesario diseñar un método de inducción de púrpura trombocitopenia inmune en *Cavia porcellus*, por lo que se plantea la siguiente pregunta:

1. **PROBLEMA**:

   ¿Cuál es el efecto del sonicado de plaquetas sobre el sistema inmune de *Cavia porcellus*?

2. **HIPOTESIS**:

   El sonicado de plaquetas por tener epítopos de la membrana de plaquetas inducen la síntesis de anticuerpos antiplaquetarios, produciendo disminución de la concentración sérica de plaquetas en *Cavia porcellus.*

BIBLIOTECA - FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

II. MATERIAL Y METODO

1.- MATERIALES

1.1.Material Biológico

Se emplearon 16 especímenes de *Cavia porcellus***,** hembras y machos de 3 - 4 meses de edad, aparentemente sanos procedentes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con un peso corporal promedio entre 700 –800 g con alimentación integral y agua *ad libitum*.

1.2.Material de laboratorio

- Tubos de ensayo con anticoagulante EDTA.
- Eppendorf de 1,5 mL.
- Placas de microhemaglutinación.
- Láminas portaobjetos.
- Matraz aforado 100 mL y 250 mL.
- Tubos de centrífuga.
- Embudo.
- Gradillas.
- Micropipetas BRAND 20- 200 µL
- Puntas de micropipetas desechables
- Pipeta Pasteur
- Cámara de Neubauer
- Jeringas de 1 mL, 3 mL y 5 mL

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

1.3.Equipos

- Sonicador TRANSSONIC 460/H, Marca Elma, Model n°9303-1, Serial n°0303-0002.
- Centrifugadora Power spin ™ LX _ CENTRIFUGUE UNICO(R) M.W. Kessel S.A.
- Microscopio binocular Marca ZEISS, Modelo Primo Star Serie 3127001493
- Equipo de baño maría

1.4.Reactivos

- Solución Alsever constituido por glucosa 15,0 g, citrato de sodio 4,8 g, ácido cítrico 2,33 g, cloruro de sodio 2,52 g, y aguas destilada c.s.p. 600 mL. Esta solución se esteriliza a 121 º C y 15 lb de presión
- Solución buffer de fosfato a pH 6,4 y 7,2
- Cloruro de Sodio 0,9 % del laboratorio BRAUN.
- Ácido tánico al 1/20 000 en NaCl 0,9 %.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

1.5.Ambiente

Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

2. METODO:

2.1.Obtención del material biológico[19]

Se emplearon 16 especímenes *Cavia porcellus***,** hembras y machos de 3-4 meses de edad, aparentemente sanos con peso corporal promedio entre 800 – 900 g, procedentes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Ver ANEXO N° 01

2.2. Extracción de la muestra sanguínea

Con jeringa estéril y 1,5mL de EDTA$(Na)_3$ estéril se extrajo 3 mL de sangre por punción cardiaca de *Cavia porcellus*, previa asepsia con alcohol yodado. Luego se transvasó a tubos estériles de 100 x 13. La extracción de las muestras sanguíneas fue realizada con el mismo método para preparar el inóculo, recuento plaquetario basal y después de exposición, prueba de inmunoprecipitación y prueba hemoaglutinación. Ver ANEXO N° 02

2.3.Preparación del inóculo

2.3.1. Suspensión de las plaquetas

Las plaquetas se separaron de los demás cuerpo formes del tejido sanguíneo a través de la centrifugación a 3 000 rpm por 15 min; con posterior extracción del sobrenadante con jeringa estéril y transvaso al eppendorf de 1,5mL. Ver ANEXO N° 02

2.3.2. Sonicación de las plaquetas

La sonicación del sobrenadante aislado se realizó por un tiempo de 5 minutos en el equipo sonicador TRANSSONIC460/H modelo 9303-1,

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

serial 0303-0002. La conservación del preparado fue a -40°C hasta su uso. Ver ANEXO N° 03

2.4.Recuento plaquetario basal[20]

Se mezcló bien la muestra de sangre obtenida con EDTA $(Na)_3$, agregándose a 100µL de esta muestra 1,9 mL de reactivo oxalato de amonio al 1%. Se dejó reposar a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos para hemolizar, montándose a continuación en cámara de Neubauer con el fin de sedimentar las plaquetas. Luego, fue llevado a cámara húmeda (caja de Petri con algodón humedecido con agua destilada), seguido de un reposo a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos. Finalmente, el recuento de plaquetas fue realizado en el cuadrante central y en los cuatro cuadrantes de los extremos. Ver ANEXO N° 04

2.5.Tratamiento de los grupos de experimentación

- **GRUPO TESTIGO:**

  A los especímenes se les administró 0,5mL de NaCl 0,9 % por vía endovenosa y su alimentación integral diaria, durante todo el desarrollo de la investigación.

- **GRUPO PROBLEMA:**

  Se les administró a los especímenes el sobrenadante producto del sonicado de plaquetas a volumen de 0,5mL por vía

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

endovenosa donde la sangre y suero serán evaluadas después de 15 a 20 días de incubación.

2.6.Evaluación después de la exposición

A los 15 a 20 días posteriores a la administración del sobrenadante, producto del sonicado de plaquetas de *Cavia porcellus*, se evaluó los siguientes puntos:

2.6.1. Recuento plaquetario[20]

El recuento plaquetario se realizó con el procedimiento según lo detallado en el punto 2.4 de la Metodología de Trabajo. Ver ANEXO N° 04

2.6.2. Reacción Antígeno- Anticuerpo

2.6.2.1.Separación del suero[22]

Las muestras fueron colocadas en reposo por un lapso de 24 horas, el suero obtenido se recogió en viales esterilizados, los mismos que fueron llevados a congelación para su posterior tratamiento.

2.6.2.2.Prueba de Inmunoprecipitación

En una lámina portaobjetos fue añadida I gota del sonicado de plaquetas (Ag), (obtenido según lo detallado en el punto 2.3.2),y I gota del suero de un espécimen (Ac), (obtenido según lo detallado en el punto 2.6.2.1), mezclándose con sutileza. Después de 20 minutos se observó la reacción, donde la precipitación – aglutinación se denota como respuesta positiva. El procedimiento

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

fue realizado para cada espécimen del grupo problema y testigo.

Ver ANEXO N° 05

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

2.6.2.3.Prueba de Hemaglutinación[23]: Ver ANEXO N° 06

a) Suspensión de Hematíes

La sangre de carnero fue recolectada asépticamente en volúmenes iguales en solución Alsever estéril y sometida a refrigeración por tres días. Luego, los glóbulos rojos de carnero (GRC) fueron lavados 3 veces con NaCl 0,9 %, centrifugándose a 3 000 rpm durante 10 minutos; a continuación los GRC fueron suspendidos al 2,8% en buffer fosfato pH 7,2 mezclándose con una pipeta para resuspender las células eritrocíticas, finalmente centrifugando a 2 000 rpm.

b) Tanización de los Glóbulos Rojos

Se mezcló 5ml de GRC con 5ml de una solución de ácido tánico diluido a 1/20 000 e incubó en baño maría a 37°C durante 10 minutos. Después de centrifugar a 2 000 rpm durante 7 minutos se decantó el sobrenadante y resuspendió el sedimento en 10 mL buffer fosfato pH 7,2 para luego volver a centrifugar a 2 000 rpm durante 7 minutos. Finalmente se decantó el sobrenadante y resuspendió en 5ml de NaCl 0,9 %.

c) Sensibilización de los Globulos Rojos Tanizados

Para la sensibilización de los GRC tanizados, se mezcló 2 mL del sonicado de plaquetas (Ag) con 2 mL de GRC tanizados. Al mismo tiempo se prepararon GRC control mezclando 2 mL de buffer fosfato pH 6,4 con 2 mL de GRC tanizados. Ambos tubos fueron incubados a 37 °C durante 20 minutos.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

La centrifugación de los tubos a 2 000 rpm durante 7 minutos fue seguida por la resuspensión en solución diluyente, para después centrifugar en las mismas condiciones y resuspender el sedimento en 5 ml de solución diluyente.

d) Prueba de Hemaglutinación.

En las placas de hemaglutinación que tienen 12 excavaciones en cada fila, la forma de trabajo fue la siguiente:

Se midió con micropipeta 25µL NaCl 0,9 % y colocó en cada uno de los 12 pocillos de la placa de hemaglutinación. Luego fue agregado 25µL de glóbulos rojos sensibilizados de carnero, en cada uno de los 12 pocillos de la placa de hemaglutinación, para después añadir en la primera columna de pocillos 25µL del suero problema (obtenido según lo detallado en el punto 2.6.2.1), con microdilutores o puntas de pipetas diferentes; una por cada suero a estudiar.

Se hizo una dilución a partir de la columna 1 pasando los microdilutores de: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1 024.

Finalmente, se homogeneizó los pocillos de la placa de hemaglutinación golpeando suavemente en los bordes laterales, para dejar en reposo durante 120 minutos a temperatura ambiente. A partir de este momento se realizó las lecturas evaluando a las

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

aglutinaciones como respuestas positivas y a las precipitaciones como respuestas negativas.

2.7.Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se usó el paquete SPSS ver. 21, donde los resultados se analizan con la prueba t-student el cual determina si hay diferencia entre el grupo TESTIGO y el grupo PROBLEMA., utilizando un nivel de confianza de 95% y diferencia mínima significativa de $p<0,05$.

2.8.Ética en Investigación.

Toda la información utilizada en este estudio se conservará bajo los principios de máxima confidencialidad, el uso de la misma será únicamente con fines científicos.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, se exponen en las tablas 01, 02 y se ilustran con las figuras 01, 02, 03, 04, 05, 06.

En la tabla 01 se muestran las medias del número de plaquetas de *Cavia porcellus* del grupo testigo y problema, antes y después de la exposición al sonicado de plaquetas; observando en los especímenes del grupo problema antes de la exposición un promedio de 5,174 $x10^5$ plaquetas x mm^3 el cual disminuye a 2,96 x 10^5 plaquetas x mm^3 después de la exposición; comparado con el promedio en el grupo testigo donde se observa un ligero aumento de 4,89$x10^5$ plaquetas x mm^3 antes de la exposición a 4,98$x10^5$ plaquetas x mm^3 después de la exposición. (Ver datos completos en ANEXO N°07)

En la tabla 02 se observa el análisis cualitativo de la prueba de Inmunoprecipitación. Así mismo, en la figura 01 se observaron microscópicamente a los grumos de aglutinación Ag-Ac formado del enfrentamiento entre el suero de un espécimen *Cavia porcellus* del grupo problema (Ac) y el sonicado de plaquetas (Ag), obtenido mediante la prueba de Inmunoprecipitación mientras que en la figura 02 se realiza la visualización microscópica para el grupo testigo, observándose la no aglutinación.

Para el desarrollo de la titulación de anticuerpos contra el antígeno antiplaqueta por la técnica de hemaglutinación directa se realizó siguiendo el método de Jacobs y Lunde, evidenciando la presencia de anticuerpos mediante la lectura de los títulos correspondientes.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

En la figuras 03 y 05 se muestra el reporte porcentual de los títulos de anticuerpos contra el antígeno antiplaqueta inducido por el sonicado de plaquetas encontradas mediante la prueba de hemoaglutinación directa tanto del grupo testigo como del grupo problema. En el grupo problema el título de anticuerpos contra el anticuerpo antiplaquetario está comprendido entre 1/4 y 1/8, siendo el mayor porcentaje encontrado en 1/4 con 70%.

En las figuras 04 y 06 se observan los resultados de la sensibilización de los glóbulos rojos de carnero con el antígeno antiplaqueta enfrentados con los sueros de los especímenes *Cavia porcellus* del grupo testigo y del grupo problema respectivamente, encontrando un título de anticuerpo 1/4 para el grupo problema y sin presencia de anticuerpos para el grupo testigo.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

TABLA 01: Medias del Número de plaquetas/mm^3 de *Cavia porcellus* del Grupo Testigo y Problema antes y después de la exposición.

	ANTES DE LA EXPOSICION (plaquetas/mm^3)	DESPUES DE LA EXPOSICION (plaquetas/mm^3)
GRUPO TESTIGO	4,89x10^5	4,98x10^5
GRUPO PROBLEMA	5,174 x10^5	2,96 x10^5

FUENTE: Datos de experimentación, ver ANEXO N°07

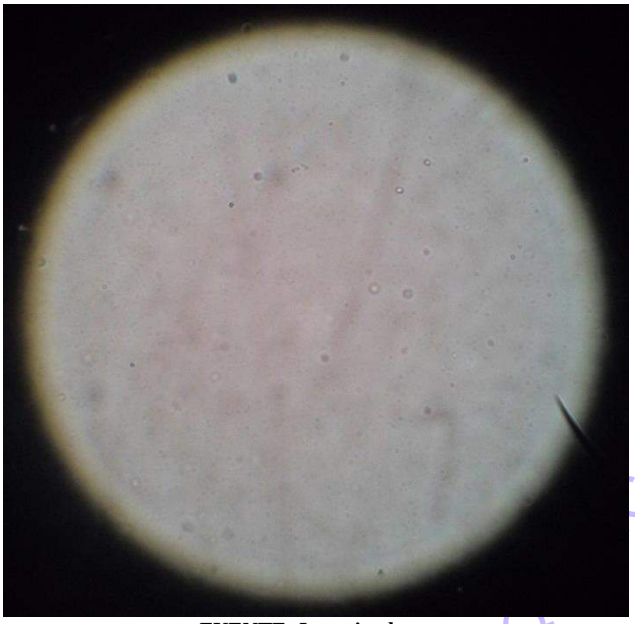
TABLA 02: Reacción Antígeno-Anticuerpo, obtenidos mediante la Prueba de Inmunoprecipitacion en suero de *Cavia porcellus* Grupo Problema y Grupo Testigo.

GRUPO DE EXPERIMENTACION	MUESTRA	REACCION Ag-Ac	PORCENTAJE DE REACCION POSITIVA
GRUPO TESTIGO	C1	-	0%
	C2	-	
	C3	-	
	C4	-	
	C5	-	
	C6	-	
GRUPO PROBLEMA	P1	+	100%
	P2	+	
	P3	+	
	P4	+	
	P5	+	
	P6	+	
	P7	+	
	P8	+	
	P9	+	
	P10	+	

FUENTE: Datos de experimentación

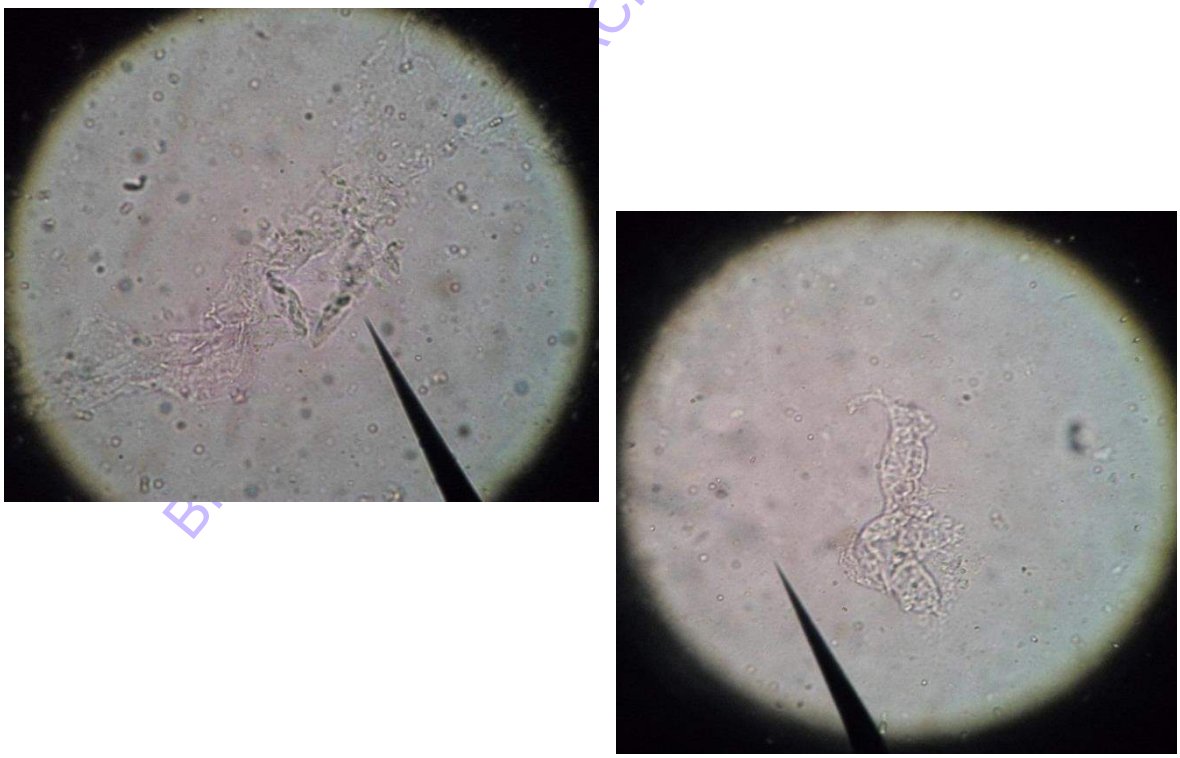
Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación



FUENTE: Investigadores

FIGURA 02: Vista microscópica de la prueba de Inmunoprecipitación en muestra del grupo testigo. Aumento 100x

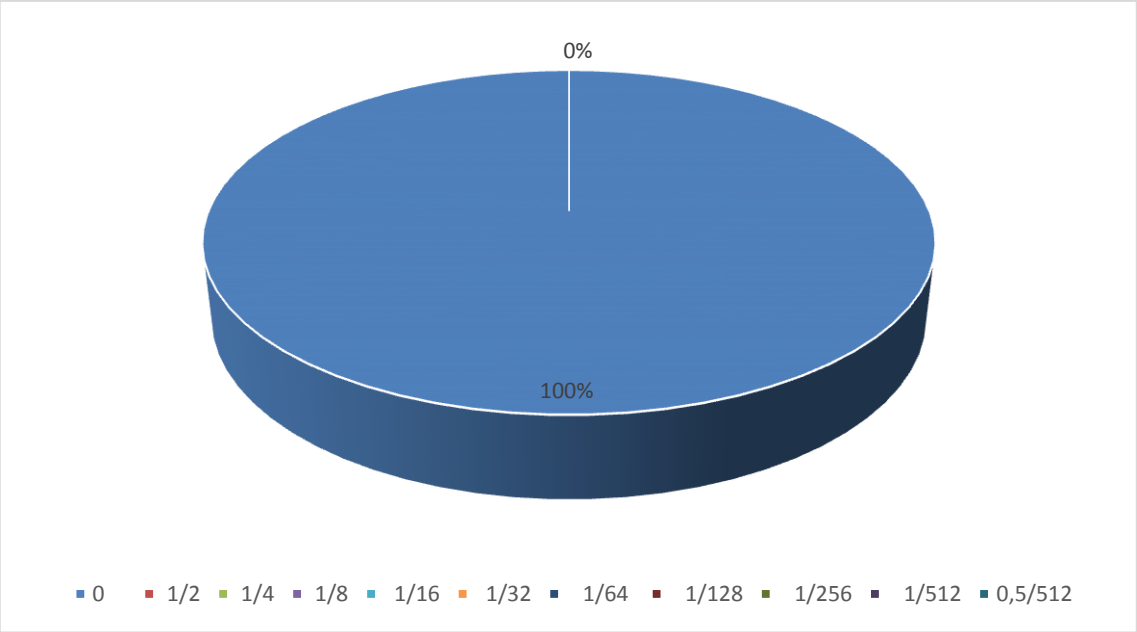


FUENTE: Investigadores

FIGURA 01: Vista microscópica de la prueba de Inmunoprecipitación en muestra del grupo problema. Aumento 100x

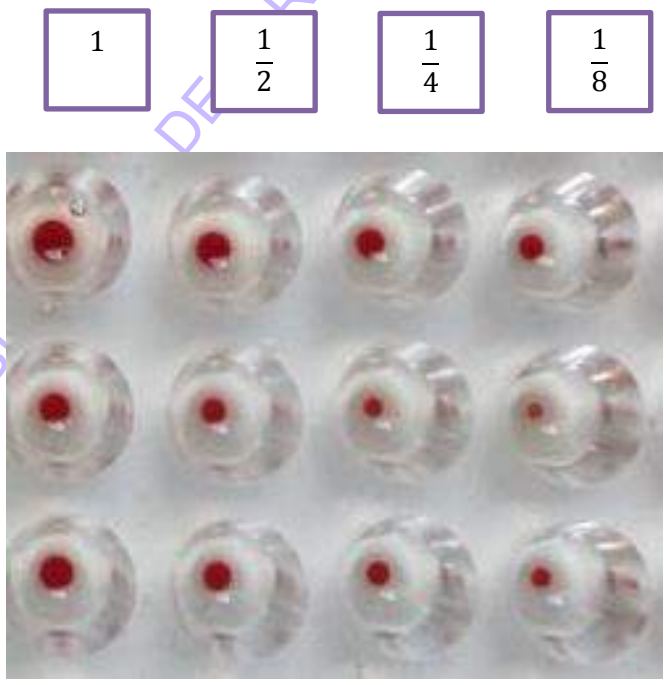
Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación



FUENTE: Datos de experimentación, ver ANEXO N°08

FIGURA 03: Título de Anticuerpos contra el Antígeno Antiplaqueta expresados en porcentajes como respuesta a la prueba de hemaglutinación directa en suero de *Cavia porcellus* del Grupo Testigo.

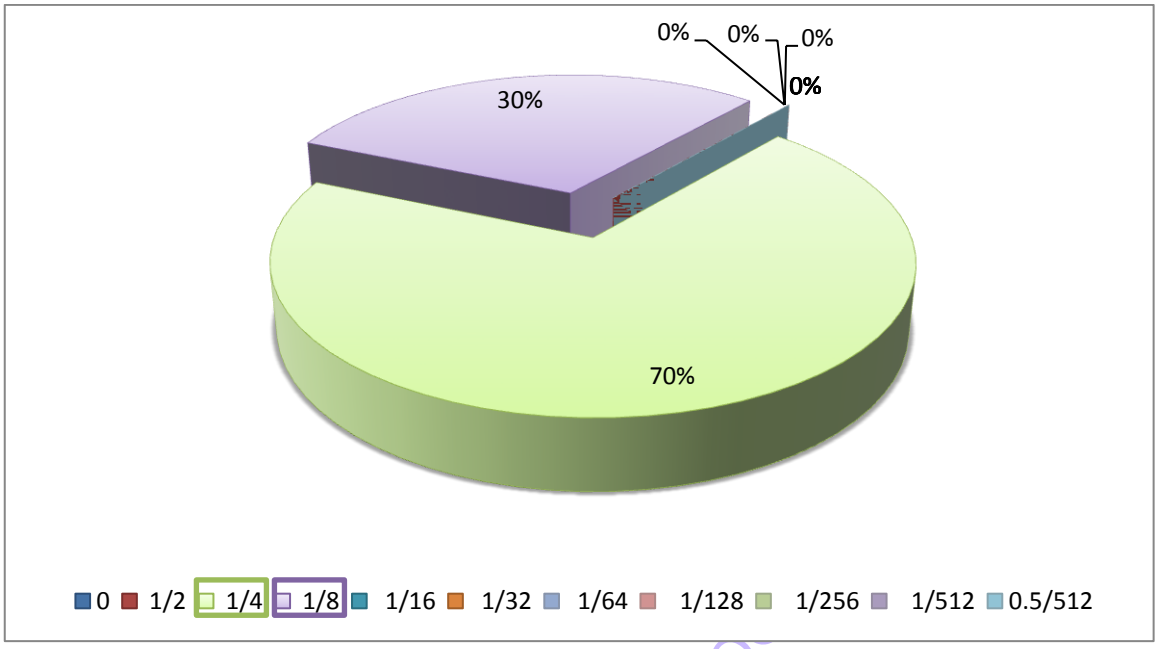


FUENTE: Investigadores

FIGURA 04: Resultado de la reacción de hemoaglutinación directa en muestra del grupo testigo.

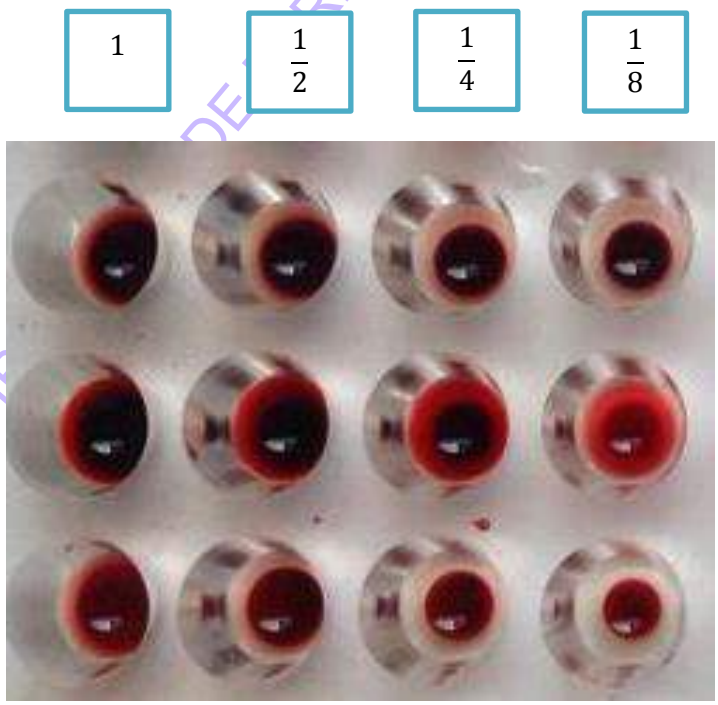
Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación



FUENTE: Datos de experimentación, ver ANEXO N°08

FIGURA 05: Título de Anticuerpos contra el Antígeno Antiplaqueta expresados en porcentajes como respuesta a la prueba de hemaglutinación directa en suero de *Cavia porcellus* del grupo problema.



FUENTE: Investigadores

FIGURA 06: Hemoaglutinación directa en muestra del grupo problema con efecto positivo: titulo 1/16

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

IV. DISCUSION

En el presente trabajo se utilizó el método de recuento en cámara de Neubauer; mediante el cual, el recuento plaquetario del grupo testigo fue medido antes y después de la exposición a NaCl 0,9% (pareado), donde la media del número de plaquetas es $4,89x10^5$ plaquetas/mm^3 y $4,98x10^5$ plaquetas/mm^3, respectivamente; en este caso se observa que la diferencia no es estadísticamente significativa $p>0,05$ (Ver análisis estadístico ANEXO N°09), por lo que se puede decir que el número de plaquetas se mantuvo constante. De igual manera se evaluó al grupo problema, siendo la media del número de plaquetas de $5,174x10^5$ plaquetas/mm^3 y $2,96x10^5$ plaquetas/mm^3, que según el análisis t-student la diferencia es estadísticamente significativa $p<0,05$ (Ver análisis estadístico ANEXO N° 10). Al comparar las medias del recuento plaquetario del grupo problema con el grupo testigo después de la exposición al antígeno (grupo no pareado), el resultado obtenido es que en el grupo problema existe disminución significativa expresado en $p=0,000$ (ver análisis estadístico ANEXO N°11); sin embargo, si se analiza el resultado con el rango normal de número de plaquetas ($3,4 – 10 \times 10^5$ plaquetas/mm^3) se observa que el sonicado de plaquetas si genera trombocitopenia pero en forma leve.

Un antígeno es una sustancia de alto peso molecular, con cierta rigidez estructural y que tiene la particularidad de ser parcialmente metabolizado por células especializadas llamadas macrófagos, por lo tanto es capaz de generar una respuesta inmune en un organismo que la detecte como un agente extraño. Mientras que un anticuerpo es una glicoproteína, producida por linfocitos B activados, llamados células plasmáticas, como respuesta a la presencia de un antígeno en el organismo, a su vez los anticuerpos pueden ser producidos por líneas celulares in vitro, se

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

presentan en cinco clases principales, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que se diferencian entre sí por sus características físicas, químicas y biológicas. Considerando esta respuesta, se utiliza como antígeno el sonicado de plaquetas para generar la síntesis de anticuerpos antiplaquetarios. Cuando la acción del anticuerpo está dirigida a antígeno que están en la superficie o forma parte de la membrana de un microorganismo o de una célula, el anticuerpo produce su agregación, dando lugar al fenómeno visible llamado aglutinación. Los anticuerpos aglutinantes actúan en solución, dependiendo de la estructura molecular de anticuerpo (IgG o IgM) y por tanto, de su valencia, de la densidad antigénica en la superficie de las células y del propio medio (fuerza iónica) [24, 25, 26].

Por tal motivo, para detectar la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios, se realiza la prueba de inmunoprecipitación, donde se observó en microscopio la respuesta positiva (ver figura 01) en el 100% de los casos de las muestras del grupo problema, descrita en las precipitaciones en forma de mallas, y en el 0% del grupo testigo (ver tabla 02),donde no se aprecia precipitaciones considerado como respuesta negativa (ver figura 02); lo que indica la presencia del anticuerpo antiplaquetario, los que produjeron la trombocitopenia leve descrita anteriormente.

Para ver la concentración de anticuerpo expresado en el título de anticuerpo se realizó la prueba de hemaglutinación. En la placa de hemaglutinación se enfrentaron antígenos y anticuerpos teniendo como soporte eritrocitos provenientes de sangre de carnero que sirvieron para la adsorción del antígeno y posterior reacción Ag-Ac. Los resultados obtenidos en la prueba de hemoaglutinación directa del grupo problema fueron 100% positivos a la presencia de anticuerpos antiplaquetarios, encontrándose

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

un porcentaje de 70% y 30% en los títulos de anticuerpos 1:4 y 1:8 respectivamente, como producto de la exposición al antígeno sonicado de plaquetas, es decir el método usado es sensible y encuentra un porcentaje considerable de anticuerpos en las muestras del grupo problema como se puede observar en las figura 05, mientras que en grupo testigo los resultados fueron negativos en 100% mostrados en la figura 03.

Los anticuerpos son detectados fácilmente mediante la técnica de hemoaglutinación directa, en este proceso los antígenos fijados en la membrana de los hematíes reaccionan con los anticuerpos y el resultado de la reacción es la formación de grumos de hematíes o aglutinados. Las diluciones que no aglutinan, por falta de antígeno, permite que los eritrocitos sedimenten. La existencia de una precipitación óptima para una relación antígeno - anticuerpo muy precisa puede explicar por un modelos sencillo, según el cual el numero de un nivel máximo en el que se forma una red; la adición suplementaria de antígenos provoca la disociación de la red, por saturación de los sitios de anticuerpos con antígeno. Para que sea posible la formación de precipitados el antígeno ha de ser polivalente [25, 27, 28].

En la figura 05 se observa aglutinación de los glóbulos rojos de carnero hasta el cuarto posillo (título 1/8) en muestras del grupo problema, visualizándose por la formación de malla o red; esto es producido cuando reacciona el antígeno-anticuerpo dando lugar a una “reacción de hemoaglutinación”, demostrándose la presencia de anticuerpos, a diferencia de lo que se observa en la figura 04 que muestra del grupo testigo, en donde no es posible observar la reacción de hemoaglutinación por ausencia de anticuerpos.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

Las plaquetas expresan una variedad de receptores incluyendo GP Ib-IX-V, VI GP, GP Ia-IIa y GP IIb-IIIa. Un aspecto de esta complejidad de la función es la variedad de defectos hereditarios de la función plaquetaria. Los primeros estudios y muchos ya han sugerido que en la mayoría de los pacientes, ITP es causada por un anticuerpo antiplaquetario. Una de las preguntas que se han formulado últimamente es por qué sólo estos pacientes producen anticuerpos que resultan en trombocitopenia clínicamente significativa permanece sin explicación [29, 30, 31].

Hay evidencia de un trastorno de células B en algunos pacientes, sin embargo, por otra parte, una variedad de anormalidades de células T y citoquinas se han reportado, lo que sugiere que las células T es probable que sean involucrados en la mayoría de los casos de PTI. Esto podría ocurrir ya sea por un efecto citotóxico directo sugerido como recientemente o tal vez con más frecuencia por la estimulación inapropiada de células B autoinmunes por sobre las células T activadas. Además, las células T podría mediar el daño de la plaqueta que posteriormente da lugar a anticuerpos antiplaquetarios están formando. La susceptibilidad genética está bien documentada sólo hasta el momento en lo que se refiere a polimorfismos FcR, que puede resultar una manipulación anormal de patógenos específicamente relacionada con su procesamiento por las células presentadoras de antígeno. En el contexto del ajuste genético apropiado modulada por influencias ambientales, como la dieta, las drogas o el efecto de la toxina, el incidente final que resulta en trombocitopenia inmune puede ser desencadenada por un evento externo [33].

Como se mencionó anteriormente, las células T y B autorreactivos escapan de la deleción central (tolerancia central) y por lo general se mantienen inactiva por falta de estimulación: el antígeno deberá presentarse y se requiere la co-estimulación

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

simultánea. Alternativamente, las células T regulatorias (CD4 + CD25 +) Pueden mediar control de periféricos de células T citotóxicas. La presentación de antígenos de plaquetas pueden estimular la proliferación de estas células. A su vez, este proceso puede reclutar células T y Células B autorreactivas, mientras que la difusión de epítopo puede ocurrir de forma concomitante. Finalmente, la activación de macrófagos y el aumento de la fagocitosis podrá tomar una trombocitopenia inmune leve, subclínica y convertirlo en serio PTI crónica[32, 33].

La PTI es mediada por anticuerpos, son principalmente IgG y ocasionalmente IgM e IgA. Los anticuerpos que reaccionan a las plaquetas se unen a las glucoproteínas GPIIb-IIIa, pero también pueden unirse a otros antígenos como Ib-IX, Ia-IIa, IV y V, así como a otros determinanates antigénicos. Así las plaquetas opsonizadas con el autoanticuerpo IgG tiene una depuración acelerada por el sistema fagocítico mononuclear a través de los receptores Fc expresados sobre la superficie de macrófagos tisulares principalmente del bazo y del hígado los anticuerpos son generados por un solo clon de células B, mediado por un antígeno específico, bajo el control de las células T cooperadoras y las citosinas que ellos producen como IL-2, interferón gamma (IFN γ) y reducción de IL-4 e IL-5 [34, 35].

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

V. CONCLUSIÓN

El sonicado de plaquetas por tener epítopos de la membrana de plaquetas inducen la síntesis de anticuerpos antiplaquetarios, produciendo disminución de la concentración sérica de plaquetas en *Cavia porcellus*.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grañena A. Enfermedades de la sangre. Capítulo 11. [Internet] Seattle, 2010 [actualizada 13 enero 2010, consultado 20 marzo 2013].Disponible en: http://www.medicinadelcant.com/cast/12.pdf
2. Farreras, R. Medicina Interna. 17a ed. España: ELSERVIER, 2012.
3. Lewis S, Bain B, Bates I. Dacie y Lewis. Hematología Práctica. 10a ed. España: ELSERVIER, 2008.
4. McKensie S. Hematología Clínica. 2a ed. México: Manual Moderno, 2000.
5. Perez L. Identificar Leucemias y Realizar Técnicas de Valoración Hemostática, trastorno de la hemostasia. [Internet] Perú, 2011[actualizada 24 noviembre 2011, consultado 21 marzo 2013]. Disponible en: http://leucemiashemostasia.blogspot.com/2011/11/trastornos-de-la-hemostasia.html
6. Porth C. FISIOPATOLOGÍA Salud enfermedad: un enfoque conceptual. 7 ed. México: PANAMERICANA, 2006.
7. Nicieza L. Antiagregantes plaquetarios en atención primaria. [internet] España, 2003 [actualizada 24 octubre 2009, consultado 02 enero 2014]. Disponible en : http://princast.es/salud/bols_info/42003.pdf
8. Perumal M Thiagarajan D. Platelet Disorders Overview of platelet disorders [Internet] Estados Unidos, 2010 [actualizado 22 marzo 2013, consultado 09 enero 2014]. Disponible en: http://emedicine.medscape.com/article/201722-overview#aw2aab6b5

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

9. Gallastegui C, Bernárdez B, Regueira C, Dávila C. Inmunología.- Farmacia. Hospitalaria. [Internet] México, 2008 [actualizado 20 diciembre 2013, consultado 09 enero 2014]. Disponible en: http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP11.pdf

10. Barbolla I, Pujol M. Transfusión de concentrados de plaquetas, plasma y componentes plasmáticos, y granulocitos. Capítulo 7. [Internet] España, 2008 [actualizado 22 febrero 2010, consultado 09 enero 2014]. Disponible en: http://www.sehh.es/archivos/informacion_fehh_fondo_capitulo02.pdf

11. Sans-Sabrafen J, Besses R, Vives J. Hematología Clínica. 5 ed. España: EL SERVIER, 2006.

12. Comité Nacional de Hematología, Púrpura Trombocitopénica Inmune. Guia de diagnóstico y tratamiento, Arch. Argent. Pediatr., 2010, 108: 173-177. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: a critical review of published reports. Am Hematol 2010; 85(3):174-180

13. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood 2010; 115: 168-86.

14. Directrices de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI: Documento de Consenso, SEHH. España, 2011.

15. Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Púrpura Trombocitopénica Inmunológica, México; Secretaría de Salud, 2009. www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

16. Rodak, F. Bernadette. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2°Ed. Buenos Aires: Panamericana, 2004.
17. Manual de Hemoterapia. Ministerio de Salud. Instituto Nacional Materno Perinatal. Departamento de Anatomía Patológica y Patología Clínica. Servicio De Patología Clínica. Unidad de Hemoterapia y Banco De Sangre. 1a Ed. Lima, 2008.
18. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón. Ministerio de Salud. Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima, 2008.
19. Muñoz M, Morón C. Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnica Básica de hematología. Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Series de normas Técnicas N° 40. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud Centro Nacional de Salud Pública. 2005.
20. Organización Panamericana de la Salud. Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. Washington: OPS, 1983. Publicación Científica N° 439
21. Gad S. Animal Models in Toxicology, 2 ed. Taylor & Francis Group CRC. United States of America, 2007. Pp: 333-339.
22. Esparza A. Antígenos solubles de formas flagelares de Leishmania sp. Y reacción de hemaglutinación pasiva directa. [Tesis para optar el grado académico de bachiller] Perú: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 1987. Pp. 5-7, 9-11.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

23. Ministerio de Salud. Manual de Procedimientos para el Diagnostico Serológico de las Zoonosis Parasitarias. Ed. Instituto Nacional de Salud. Perú, 2002.

24. Harrison P, Kenneth A, Chapman S. An interlaboratory Study of a candidate Reference Method for Platelet Counting. Am J Clin Pathol 2001; 115:448-459

Coll J. Técnicas de diagnóstico en virología. Editorial Diaz de Santos. España. pp.191-193

25. Stites D, Terr A; Parslow T. Inmunología Básica y Clínica. 10° Edición. MANUAL MODERNO, 2003.

26. Federación Argentina de Cardiología. "Estudio Multicéntrico Epidemiológico Chagásico Argentino". Comité de Enfermedad de Chagas. Argentina. Abril de 2001.

27. Franco E. "Microplacas; Aplicación en Inmunohematología Básica de Banco de Sangre: Reacción Serológica de Aglutinación". Banco de Sangre de Balears. España, 1998.

28. González R, Tarazona R, Galiani, G, Espinosa M. Y Peña J. "Métodos Basados en la unión Ag-Ac". Revista PHADIA. 2006.

29. Ramasamy I. Trastornos de la coagulación: trastornos de adhesión y agregación plaquetaria. Departamento de Patología Química, Newham General Hospital, Glen Road, Londres E13 8RU, Reino Unido. Crit Rev Oncol Hematol [revista en Internet]. 2004 JUNIO; [acceso 24 de diciembre de 2013] 49 (1):1-35. Disponible en:

BIBLIOTECA DE FARMACIA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734152

30. Cuellar F. Fundamentos de la Medicina: Hematología, 6° Ed: Corporación para investigaciones biológicas, pp: 215-216.
31. Salazar M. Guías para la transfusión de sangre y sus componentes. [internet]. . [acceso: El 20 de marzo del 2013].Disponible en: http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v13n2-3/15737.pdf
32. Cooper Nichola, Bussel James. 2006 Blackwell Publishing Ltd, British Journal of Haematology, 133, 364–374
33. Guía De Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Púrpura Trombocitopénica Inmunológica, México; Secretaría de Salud, 2009. www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
34. Rose N, Mackay I. The Autoimmune Diseases, 4º Ed, ELSERVIER, 2006

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXOS

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXO N°01: MATERIAL BIOLÓGICO

GRUPO TESTIGO

6 *Cavia porcellus*

GRUPO PROBLEMA

10 *Cavia porcellus*

DE FARMACIA Y BIO

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXO N°02: PUNCIÓN INTRACARDIACA – EXTRACION DE LA MUESTRA SANGUINEA

Jeringas estériles y jeringa estéril

Cavia porcellus

Agitación para aumentar el latido

Asepsia con alcohol yodado

Búsqueda del corazón

Localización del

PUNCIÓN INTRACARDIACA

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

Extracción de la sangre

10 mL de sangre

SANGRE CON EDTA($Na)_3$

MUESTRAS

Centrifugación a 3 000 rpm por 15 min

Extracción del sobrenadante con jeringa estéril

Transvaso al eppendorf de 1.5mL

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXO N°03: SONICACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE LAS PLAQUETAS

MUESTRA

Centrifugación a 3 000 rpm por 15 min

Extracción del sobrenadante con jeringa estéril

Sonicador

Preparación del equipo

5 minutos en el equipo sonicador

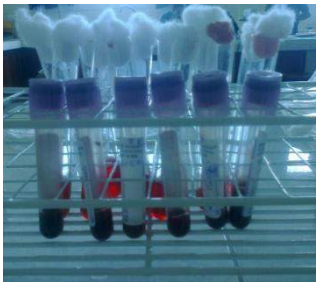
Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXO N° 04: RECUENTO PLAQUETARIO

PROCEDIMIENTO

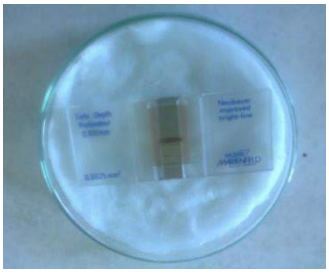
Dilución de 100uL sangre de cobayo con 1.9mL de oxalato de amonio al 1%



Incubación a temperatura ambiente (dejar en reposo) de 10 a 15 minutos para hemolizar

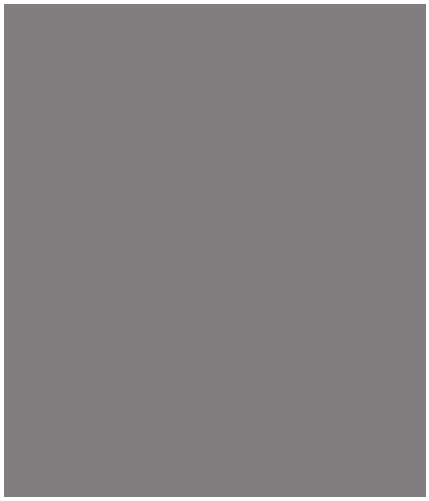
Suspensión en cámara de Neubauer

Cámara húmeda (caja de Petri con algodón humedecido con agua destilada)



Incubación a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos en la atmosfera húmeda

Recuento de plaquetas

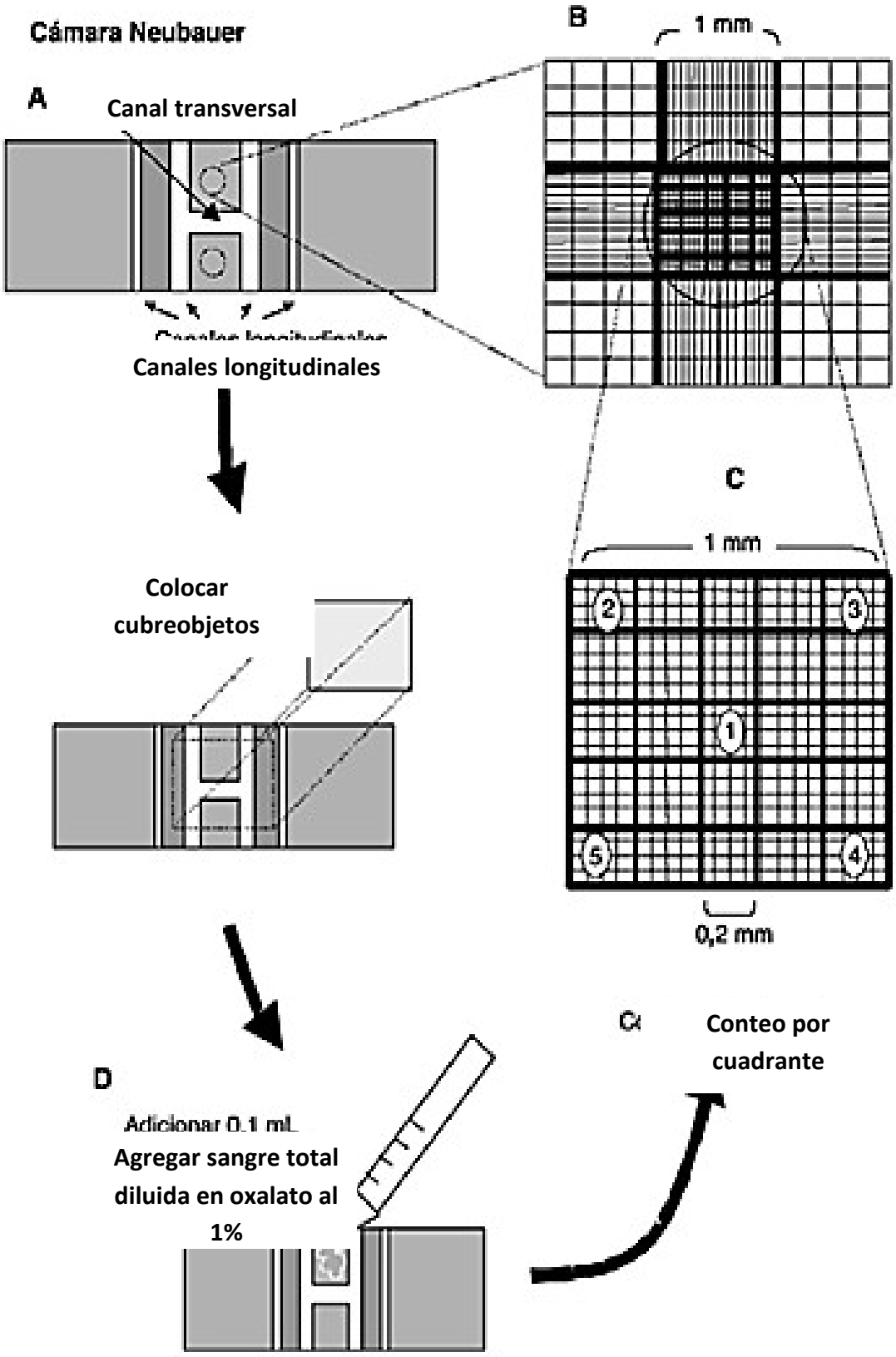


Observación : Aumento 100x

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú. Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

RECUENTO PLAQUETARIO EN CÁMARA DE NEUBAUER



Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

Cálculo del número total de plaquetas

$$N° \, de \, plaquetas \, x \, mm^3 = \frac{plaquetas \, contadas \, en \, los \, 5 \, cuadrantes}{(Altura)(Dilución)(Área)}$$

$$N° \, de \, plaquetas \, x \, mm^3 = \frac{plaquetas \, contadas \, en \, los \, 5 \, cuadrantes}{\left(\frac{1}{10}\right)\left(\frac{1}{20}\right)\left(\frac{1}{5}\right)}$$

$$N° \, de \, plaquetas \, x \, mm^3 = \frac{plaquetas \, contadas \, en \, los \, 5 \, cuadrantes}{\left(\frac{1}{1\,000}\right)}$$

$$N° \, de \, plaquetas \, x \, mm^3 = plaquetas \, contadas \, x \, 1\,000$$

Valores de referencia[21]**:** 3,4 – 10 x 10^5 plaquetas/mm^3

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

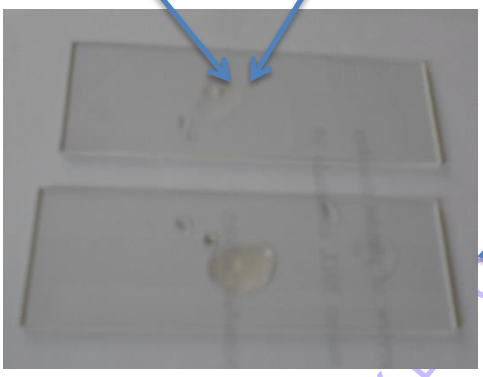
Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

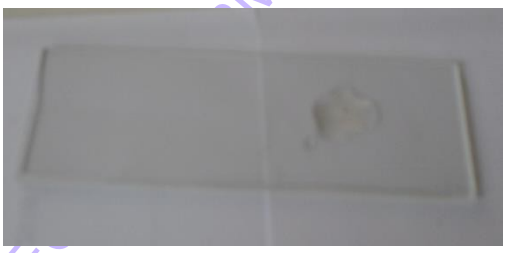
ANEXO N°05: PRUEBA DE INMUNOPRECIPITACION

I gota del suero de un espécimen (Ac)

I gota del sonicado de plaquetas (Ag)



Mezcla con sutileza



Después de 20 minutos se realiza la lectura

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXO N°06: PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN

A.- SUSPENSIÓN DE HEMATÍES

Sangre de carnero +

Solución de alselver

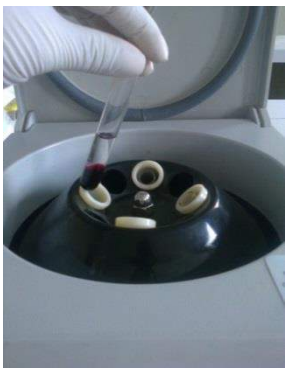
3 000 rpm x 10 min

Lavar 3 veces con NaCl 0.9%

Suspensión G.R. al 2.8% en buffer fosfato pH 7.2

Resuspención de las células eritrocíticas

Centrifugación nuevamente a 2 000 rpm.



Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

B.- TANIZACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS

5mL de GRC

5mL ácido tánico

Incubación a baño maría a 37°C durante 10 minutos

Centrifugación a 2 000 rpm. Durante 7 min

Decantación el sobrenadante

Resuspención el sedimento en 10mL buffer fosfato pH 7.2

Centrifugación a 2 000 durante 7 min

Decantación del sobrenadante y Resuspención en 5mL se NaCl 0.9%.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

C. SENSIBILIZACIÓN DE LOS GLOBULOS ROJOS TANIZADOS

2 mL de GRC

2 mL del sonicado de

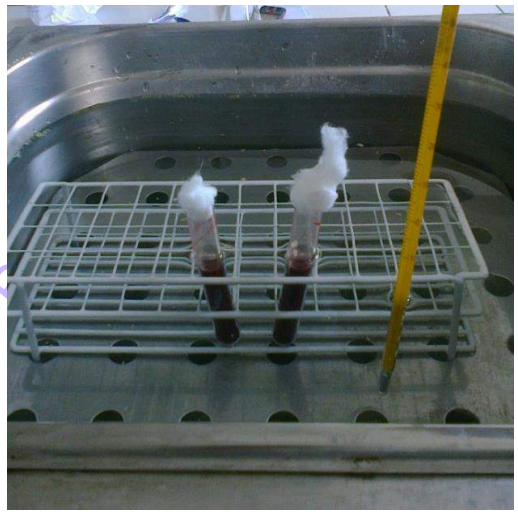
TUBO PROBLEMA

2 mL de GRC

2 mL buffer fosfato pH 6.4

TUBO TESTIGO

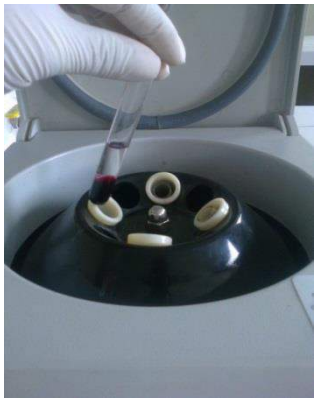
Incubación de tubos a 37 °C durante 20 minutos



Centrifugación a 2 000 durante 7 min

Resuspención en solución diluyente

Centrifugación en las mismas condiciones y finalmente Resuspención

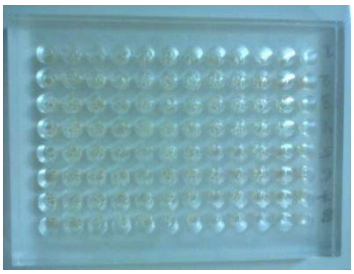


Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

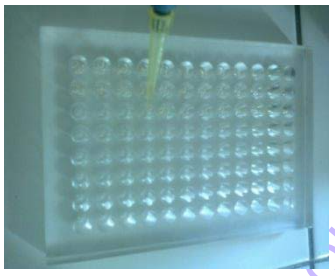
Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

D. PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN

Placa de hemaglutinación: 12 excavaciones en cada fila



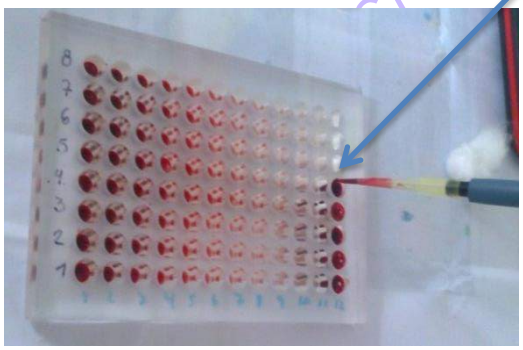
25µL de NaCl 0.9% en cada uno de los 12 pocillos de la placa de hemaglutinación



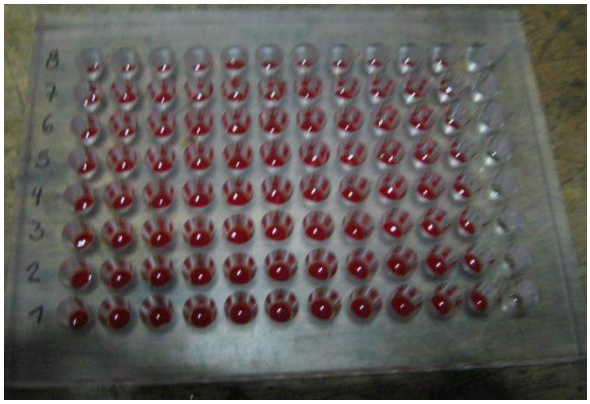
25µL del suero problema en la primera columna de pocillos

Dilución a partir de la columna 1 pasando los microdilutores de: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024

25µL de glóbulos rojos sensibilizados de *Ovis aries*, en cada uno de los 12 pocillos de la placa de hemaglutinación



Homogenización de los pocillos de la placa de hemaglutinación



Reposo durante 120 minutos a temperatura ambiente.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú. Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXOS N°07: NÚMERO DE PLAQUETAS/mm^3 DE *Cavia porcellus* DEL GRUPO PROBLEMA Y GRUPO TESTIGO ANTES Y DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN

TABLA 05: Recuento plaquetario de *Cavia porcellus* del grupo testigo antes de la exposición.

NOMBRE	I	II	III	IV	V	TOTAL	N°plaquetas x mm^3
C1	102	99	90	89	101	481	4,87 x 10^5
C2	89	100	98	102	95	484	4,84 x 10^5
C3	94	104	95	100	96	489	4,89 x 10^5
C4	95	100	84	97	101	477	4,77 x 10^5
C5	106	99	98	105	100	508	5,08 x 10^5
C6	93	104	98	95	99	489	4,89 x 10^5
MEDIA							4,89 x 10^5

FUENTE: Datos de experimentación.

TABLA 06: Recuento plaquetario de *Cavia porcellus* del grupo testigo después de la exposición.

NOMBRE	I	II	III	IV	V	TOTAL	N°plaquetas x mm^3
C1	101	100	107	107	112	527	5,27 x 10^5
C2	99	99	88	101	100	487	4,87 x 10^5
C3	89	99	100	92	95	475	4,75 x 10^5
C4	99	103	100	100	96	498	4,98 x 10^5
C5	103	99	103	99	106	510	5,10 x 10^5
C6	101	95	103	99	103	491	4,91 x 10^5
MEDIA							4,98 x 10^5

FUENTE: Datos de experimentación.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

TABLA 07: Recuento plaquetario de *Cavia porcellus* del grupo problema antes de la exposición.

NOMBRE	I	II	III	IV	V	TOTAL	N°plaquetas x mm^3
P1	105	*112*	99	89	104	509	$5,09 \times 10^5$
P2	111	102	109	107	113	542	$5,42 \times 10^5$
P3	109	97	103	101	108	518	$5,18 \times 10^5$
P4	105	101	100	97	101	504	$5,04 \times 10^5$
P5	98	110	113	99	104	524	$5,24 \times 10^5$
P6	103	113	105	105	99	525	$5,25 \times 10^5$
P7	115	102	100	89	104	510	$5,10 \times 10^5$
P8	112	92	109	100	103	516	$5,16 \times 10^5$
P9	107	97	105	101	109	519	$5,19 \times 10^5$
P10	105	100	104	97	101	507	$5,07 \times 10^5$
MEDIA							**$5,174 \times 10^5$**

FUENTE: Datos de experimentación.

BIBLIOTE

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

TABLA 08: Recuento plaquetario de *Cavia porcellus* del grupo problema después de la exposición.

NOMBRE	I	II	III	IV	V	TOTAL	N° plaquetas x mm^3
P1	85	61	62	78	51	337	$3,37 \times 10^5$
P2	60	72	71	63	73	339	$3,39 \times 10^5$
P3	61	57	56	60	59	293	$2,93 \times 10^5$
P4	55	*62*	60	56	63	296	$2,96 \times 10^5$
P5	58	58	55	59	61	291	$2,91 \times 10^5$
P6	59	59	63	60	55	296	$2,96 \times 10^5$
P7	53	61	58	61	51	284	$2,84 \times 10^5$
P8	61	57	56	58	56	288	$2,88 \times 10^5$
P9	56	62	55	59	60	292	$2,92 \times 10^5$
P10	48	45	52	41	58	244	$2,44 \times 10^5$
MEDIA							$2,96 \times 10^5$

FUENTE: Datos de experimentación.

BIBLIO

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXOS N°08: TÍTULO DE ANTICUERPOS CONTRA EL ANTÍGENO ANTIPLAQUETA INDUCIDO POR EL SONICADO DE PLAQUETAS, OBTENIDOS MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN DIRECTA EN SUERO DE *Cavia porcellus DEL* GRUPO PROBLEMA Y GRUPO TESTIGO.

TABLA 09: Título de Anticuerpos contra el Antígeno Antiplaqueta inducido por el sonicado de plaquetas, obtenidos mediante la prueba de hemaglutinación directa en suero de *Cavia porcellus* Grupo Problema.

TITULO DE ANTICUERPOS	CANTIDAD DE MUESTRAS	PORCENTAJE
0	0	0%
1:2	0	0%
1:4	0	70%
1:8	7	30%
1:16	3	0%
1:32	0	0%
1:64	0	0%
1:128	0	0%
1:256	0	0%
1:512	0	0%
1:1024	0	0%
TOTAL	**10**	**100%**

FUENTE: Datos de experimentación.

Se observa respuesta positiva a la presencia de anticuerpos con un alto porcentaje en el título 1:8 como producto de la exposición al antígeno antiplaqueta inducido por el sonicado de plaquetas.

TABLA 10: Título de Anticuerpos contra el Antígeno antiplaqueta inducido por el sonicado de plaquetas, obtenidos mediante la prueba de hemaglutinación directa en suero de *Cavia porcellus* Grupo Testigo.

TITULO DE ANTICUERPOS	CANTIDAD DE MUESTRAS	PORCENTAJE
0	6	100%
1:2	0	0%
1:4	0	0%
1:8	0	0%
1:16	0	0%
1:32	0	0%
1:64	0	0%
1:128	0	0%
1:256	0	0%
1:512	0	0%
1:1024	0	0%
TOTAL	**6**	**100%**

FUENTE: Datos de experimentación.

No se encuentra evidencia de anticuerpos contra el antígeno antiplaqueta inducido por el sonicado de plaquetas en muestras de suero de Cavia porcellus.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXOS N°09: ANÁLISIS ESTADÍTICO T-STUDENT DEL GRUPO TESTIGO - PAREADO

HIPOTESIS NULA (H_0): $X_1 = X_2$

α=0,05

H_0= El Número de plaquetas del grupo testigo antes y después de la exposición son iguales.

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): $X_1 \neq X_2$

H_1= El Número de plaquetas del grupo testigo antes y después de la exposición no son iguales.

FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANALISIS T-STUDENT

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas		t	gl	Sig. (bilateral)	Sig. (Valor p)
	95% de intervalo de confianza de la diferencia					
	Superior					
PlaquetasAntes - PlaquetasDespues	,10734		-1,172	5	,294	,651

Según el análisis t-student con un nivel de confianza de 95%, α=0,05 y la diferencia mínima significativa de p>0,05; la H_0 se acepta lo que indica que el número de plaquetas del grupo testigo antes y después de la exposición son iguales.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXO N°10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO T-STUDENT DEL GRUPO PROBLEMA –PAREADO

HIPOTESIS NULA (H_0): $X_1 = X_2$

α=0,05

H_0= El Número de plaquetas del grupo problema antes y después de la exposición son iguales.

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): $X_1 \neq X_2$

H_1= El Número de plaquetas del grupo problema antes y después de la exposición no son iguales.

FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANALISIS T-STUDENT

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas	t	gl	Sig. (bilateral)	Sig. (Valor p)
	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
	Superior				
PlaquetasAntes - PlaquetasDespues	2,38245	29,732	9	,000	,000

Según el análisis t-student con un nivel de confianza de 95%, α=0,05 y la diferencia mínima significativa de p<0,05; la H_0 se rechaza lo que indica que el número de plaquetas del grupo problema antes y después de la exposición no son iguales y tampoco se deben al azar.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANEXOS N°11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GRUPOS NO RELACIONADOS

PRUEBA F PARA VARIANZAS DE DOS MUESTRAS

HIPOTESIS NULA (H_0): $X_1 = X_2$

α=0,05

H_0= La varianza del número de plaquetas del grupo problema testigo y problema después de la exposición son iguales.

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): $X_1 \neq X_2$

H_1= La varianza del número de plaquetas del grupo problema testigo y problema después de la exposición no son iguales.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

	N° plaquetas después de la exposición testigo	N° plaquetas después de la exposición problema
Media	4.98	2.96
Varianza	0.03368	0.07213333
Observaciones	6	10
Grados de libertad	5	9
F	0.46691312	
P(F<=f) una cola	0.20788077	
Valor crítico para F (una cola)	0.2095353	

Según el análisis F para varianza de dos muestras con α=0,05 la H_0 se rechaza, por lo que se asume varianzas no iguales.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/

Biblioteca Digital - Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación

ANALISIS T-STUDENT

HIPOTESIS NULA (H_0): $X_1 = X_2$

α=0,05

H_0= El Número de plaquetas del grupo testigo y problema después de la exposición son iguales.

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): $X_1 \neq X_2$

H_1= El Número de plaquetas del grupo testigo y problema después de la exposición no son iguales.

Y BIOQUIMICA

	prueba t para la igualdad de medias		prueba t para la igualdad de medias				
	t	gl	Sig.	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
						Inferior	Superior
No se asumen varianzas iguales	17,836	13,616	,000	2,02000	,11325	1,77645	2,26355

Según el análisis t-student cuando las varianzas no son iguales, considerando un nivel de confianza de 95%, α=0,05 y diferencia mínima significativa de $p<0,05$; la H_0 se rechaza lo que indica que el número de plaquetas del grupo testigo y problema después de la exposición son diferentes y no se deben al azar.

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Compartir bajola misma licencia 2.5 Perú.
Para ver una copia de dicha licencia, visite http://creativecommons.org/licences/by-nc-sa/2.5/pe/