



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Estudio hematológico de sangre de perro
tratada con Soluciones Electrolizadas de
Superoxidación”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JESSICA ARELI REYES AYALA

Asesores: Q.F.B. René Damián Santos

Q.F.B. José Ángel Reyes Garcés

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en C. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio hematológico de sangre de perro tratada con soluciones electrolizadas de superoxidación

Que presenta la pasante: Jessica Areli Reyes Ayala

Con número de cuenta: 303232847 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de febrero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Francisco López Mejía	
VOCAL	QFB. René Damián Santos	
SECRETARIO	QFB. Verónica Ruiz Solorio	
1er. SUPLENTE	QFB. Beatriz Lucía González Maldonado	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

AGRADECIMIENTOS

*A ti **dios** por bendecirme para llegar a la meta en este gran proyecto, por haberme dado sabiduría, fortaleza, salud, coraje, no dejarme sola en los momentos difíciles, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias, felicidad y sobre todo... por regalarme una familia maravillosa!*

*A mis **papas Lupita y Raúl**, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, por depositar su entera confianza en mí, por promover la unión familiar, y porque hoy puedo ver alcanzada mi meta ya que siempre estuvieron impulsándome con su ejemplo digno de superación y responsabilidad, pero sobre todo gracias por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. Que esta sea la recompensa a tantos años de entrega y desvelos. Gracias por todo su amor. Los amo inmensamente!*

*A mis **hermanos** por apoyarme en todo momento y por su constante amor. Gracias **Richie** por ser un ejemplo de desarrollo laboral y superación, por darme el coraje para alcanzar mis sueños y aferrarme a un propósito. Gracias **Lalo** "Cuchurrumin" por ser un ejemplo de estudio y perseverancia, se que algún día también veraz reflejados tus esfuerzos culminando con satisfacción tus estudios universitarios. Este logro también es suyo, me siento muy orgullosa de tenerlos como hermanos. Gracias por creer en mí. Los adoro!*

*A mi "**Osito**", porque eh tenido la fortuna de tenerte como un fiel amigo y compañero, gracias por permitirme formar parte de tu vida, por ser el hombre con los mejores sentimientos que eh conocido, por presionarme para terminar este proyecto, por motivarme hacer las cosas de la mejor manera, por aguantarme en mis momentos de histeria y sobre todo por hacerme vivir los mejores momentos de mi vida con ese sentido del humor que muchas veces me liberaron de las presiones y el estrés. Gracias "Osito" por tu amor y comprensión, porque sé que siempre contaré contigo. Te amo demasiado!*

*A mis **amigos, Carolina, Paulina, Montserrat, Roxana, Paty, Alejandra, Toño, Susana, Jacqueline, Yalid y Migue**, quienes compartimos mañanas, tardes y noches de estudio, momentos de nerviosismo en exámenes parciales y finales, por todas las veces que me explicaron, por su paciencia, sus consejos, regaños, por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare. Pero sobre todo por forjar esta gran amistad. Los quiero mucho!*

*A mi mejor amigo **Juan Pablo**, gracias porque siempre estuviste apoyándome, motivándome a salir a delante, porque a pesar de los pequeños desacuerdos que teníamos siempre estuviste a mi lado cuando te necesitaba, eres un ejemplo de superación y lucha, pero sobre todo gracias por hacer de mi vida una locura.
TQM.*

*A mi amiga **Diana** porque a pesar de la distancia, nuestra amistad prevalece, eres un digno ejemplo de fortaleza y determinación. Gracias por incitarme a cumplir mis objetivos, por escucharme, por depositar tu confianza en mí y sobre todo por pasar momentos tan inolvidables durante estos años de amistad.
T.Q.M.*

*A mis tíos **Pepe, Gela y Rosa** quienes me han brindado todo su cariño y con los cuales he pasado momentos inolvidables. Porque de una u otra forma, con su apoyo moral me han incentivado a seguir adelante a lo largo de toda mi vida. Los quiero mucho.*

*A mis primos **Yeni, Irlis, Israel, Tita, Vero y Gustavo**. Gracias por las experiencias divertidas que hemos compartido, el apoyo y el cariño que me han demostrado, pero sobre todo por forjar esa linda unión familiar. Gracias también a **Fany, Willi, Pedro, Luis y Ricardo** porque aunque no estemos cerca saben que los adoro con todo mi corazón y son parte fundamental en mi vida.*

*A mis sobrinos, **Alexis, Sofía y Paola** porque llenan de alegría cada día de mi vida. Los amo.*

*A la **Sra. Hilda Marina**, gracias por abrirme las puertas de su casa y considerarme como parte de su familia, por darme apoyo moral para alcanzar esta meta tan anhelada, gracias por tomarse el tiempo para escucharme, pero sobre todo por depositar su confianza en mí. La admiro y respeto mucho. Gracias por su cariño.*

*A los **Sr. Javier y Juan Garcés Reyes** porque me han hecho sentir en familia y porque de igual manera me han dado su apoyo moral para la culminación de este proyecto, además de compartir conmigo experiencias de vida y anécdotas. Los quiero mucho.*

*A mi asesor, **Q.F.B. René Damián Santos**, por su amabilidad, buena disposición, paciencia, por el tiempo que me dedico para que este trabajo culminara exitosamente, mi sincero agradecimiento.*

Al M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez, gracias por haber puesto su confianza en mí y por su generosa disposición para dirigir en todo momento este proyecto, por su amabilidad, su experiencia, paciencia, consejos, por sus invaluable conocimientos, enseñanzas y por su motivación para que pudiera lograr este sueño tan anhelado. Lo respeto y admiro mucho pero sobre todo lo estimo demasiado.

En especial deseo agradecer al Sr. Mario Valbuena Moctezuma por abrirme las puertas de la empresa mexicana Estheripharma en donde pude realizar este gran proyecto y por proporcionarme todas las facilidades para su desarrollo. Muchas gracias!

Al Dr. David Páez Equifiano, al Dr. José Alberto Cano Buendía y a la M.V.Z. Sandra Martínez Vidal por el gran apoyo brindado durante mi proyecto, por estar al pendiente de mis avances y por sus valiosas aportaciones. Muchas gracias!

Al M. en C. Marco Antonio de Paz Campos, coordinador general del Hospital de Pequeñas Especies, por facilitarme la donación de muestras de sangre de canino utilizadas durante este proyecto de tesis. Muchas gracias!

Al M.V.Z. Luis Fernández de Córdoba, por el interés prestado desde un principio en este trabajo y por el apoyo recibido. Gracias!

Al Q.F.B. José Ángel Reyes Garcés, por su compañerismo, consejos y orientación en todo el proceso de investigación, y además por estar siempre al pendiente de mis avances.

A las Q.F.B. Claudia y Lety con las que he tenido la fortuna de convivir, les agradezco sus valiosas enseñanzas, su paciencia, sus consejos, pero sobre todo por su gran apoyo moral. Las estimo mucho chicas.

A mis sinodales, por el tiempo que han dedicado para llevar a cabo la revisión y corrección, pero sobre todo por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo. Mil gracias!

*Finalmente a la UNAM y especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo uno por haberme brindado una formación profesional y una educación de calidad y hacerme una persona útil para la humanidad; ya que todos somos seres con la misma capacidad de triunfar, la diferencia consiste en las oportunidades que se tienen en la vida...**Por mi raza hablará el espíritu.***

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de...

*Mis abuelitos Margarita Valdés Jaramillo, Ricardo Ayala Góngora,
Elvira Flores Ambriz y Gregorio Reyes Estrada.*

Mi bisabuelita Elena Valdés Torres

*Mis tíos Margarita Ayala Valdés, Magdalena Ayala Valdés,
Ricardo Ayala Valdés y Fernando Jaramillo Valdés.*

Porque ustedes son mis ángeles de luz, que desde el cielo me bendicen y cuidan, sé que comparten este gran orgullo e inmensa alegría. No saben cuánto los extraño...les envié mi eterno amor infinito !

INDICE GENERAL

Índice general.....	I
Índice de ilustraciones.....	IV
Índice de fotos.....	V
Índice de tablas.....	VII
Índice gráficas.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	X
1. Introducción.....	1
1.1 Solución Electrolizada de Superoxidación.....	1
1.1.2 Antecedentes historicos.....	4
1.1.3 Usos como agente desinfectante y microbicida.....	5
1.1.4 Uso como agente terapéutico.....	6
1.1.5 Uso en el área agroveterinaria y otras.....	6
1.1.6 Mecanismo de acción.....	7
1.2 Diarrea en caninos.....	8
1.3 Sangre.....	10
1.3.1 Funciones de la sangre.....	11
1.3.2 Plasma.....	11
1.3.3 Elementos formes de la sangre.....	12
1.3.3.1 Eritrocitos.....	12
1.3.3.2 Leucocitos.....	12
1.3.3.3 Plaquetas.....	16
1.4 Hematopoyesis.....	16

2. Objetivo general	19
2.1 Objetivos particulares	19
3. Justificación	20
4. Hipótesis.....	20
5. Materiales.....	21
5.1 Material.....	21
5.2 Reactivos.....	22
5.3 Soluciones.....	22
5.4 Equipo	22
5.5 Material biológico.....	22
6. Metodología.....	23
6.1 Diagrama general de trabajo	23
6.2 Determinación de pH y ORP de SSF, SH y SG con SES.....	24
6.3 Determinación de ppm de cloro total de SSF, SH y SG con SES.	25
6.4 Reto microbiano	26
6.5 Determinación de pH y ORP de cada solución	27
6.6 Recolección de muestras de sangre de canino	28
6.7 Prueba de lisis en placa	28
6.8 Preparación de diluciones con SSF, SH y SG mas SES de pH neutro	29
6.9 Biometría hemática.....	29
6.9.1 Cuenta de eritrocitos	30
6.9.2 Hematocrito	31
6.9.3 Hemoglobina: método de la cianometahemoglobina.....	32
6.9.4 Cuenta de leucocitos	33
6.9.5 Recuento diferencial de leucocitos	34
6.9.6 Cuenta de plaquetas	35

6.10 Prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) por el método de Gel-Clot	36
7. Resultados	37
7.1 Determinación de pH, ORP y ppm de SSF, SG, SH y SES	37
7.2 Determinación de ORP, pH y ppm de SSF con SES.....	38
7.3 Determinación de ORP, pH y ppm de SH con SES	39
7.4 Determinación de ORP, pH y ppm de SG con SES	40
7.5 Reto microbiano <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> vs VeteriBac [®] mascotas (SES)	41
7.6 Reto microbiano <i>S. aureus</i> vs VeteriBac [®] mascotas (SES) + SSFE dilución 1:8	43
7.7 Prueba de lisis en placa	45
7.8 Observación macro y microscópica de SSF, SH y SG con SES dilución 1:8	46
7.9 Hemograma.....	47
7.9.1 Cuenta leucocitaria.....	48
7.9.2 Cuenta eritrocitaria	49
7.9.3 Hemoglobina	50
7.9.4 Hematocrito	51
7.9.5 Conteo plaquetario	52
7.9.6 Cuenta diferencial leucocitaria.....	53
7.10 Método estadístico t de Student para muestras apareadas	57
7.11 Observación de células en cuenta diferencial de sangre con SES	58
7.12 Prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) por el método Gel-Clot.	59
8. Discusión de Resultados	60
9. Conclusiones.....	68
10. Perspectivas.....	68
11. Referencia bibliográfica	69

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema del proceso de obtención de la SES	1
Ilustración 2. Representación esquemática de la membrana y pared celular bacteriana	7
Ilustración 3. Representación de la estructura de un virus desnudo y envuelto.....	8
Ilustración 4. Componentes de la sangre	10
Ilustración 5. Eritrocitos caninos	12
Ilustración 6. Neutrófilo en banda y segmentado de canino	13
Ilustración 7. Eosinófilo de canino	14
Ilustración 8. Basófilo de canino	14
Ilustración 9. Monocito de canino	15
Ilustración 10. Linfocito de canino	15
Ilustración 11. Plaquetas de canino	16
Ilustración 12. Esquema de la producción, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas.....	18
Ilustración 13. Cuadrantes de la cámara de Neubauer donde se realiza el conteo de globulos rojos	30
Ilustración 14. Segmentos obtenidos en capilar después de la centrifugación en la prueba de hematocrito	31
Ilustración 15. Cuadrantes primarios de la cámara de Neubauer donde se realiza el conteo de globulos blancos	33
Ilustración 16. Células sanguíneas encontradas dentro de un frotis sanguíneo.....	34
Ilustración 17. Cuadrantes de la cámara de Neubauer donde se realiza el conteo plaquetario.....	35

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Resultado de la cuenta viable de <i>E.coli</i> ATCC 11229.	41
Foto 2. Resultado del reto VeteriBac [®] mascotas vs <i>E. coli</i> ATCC 11229	41
Foto 3. Resultado del control del medio para métodos estándar	41
Foto 4. Resultado de la cuenta viable de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	41
Foto 5. Resultado del reto VeteriBac [®] mascotas vs <i>S.aureus</i> 6538	41
Foto 6. Resultado de la cuenta viable inicial de <i>S.aureus</i> 6538.....	43
Foto 7. Resultado del reto VeteriBac [®] mascotas(SES)+SSF vs <i>S.aureus</i> 6538.....	43
Foto 8. Resultado del control del medio para métodos estándar	43
Foto 9. Resultado de la prueba de lisis de SSF con SES a distintas diluciones	45
Foto 10. Resultado de la prueba de lisis de SH con SES a distintas diluciones	45
Foto 11. Resultado de la prueba de lisis de SG con SES a distintas diluciones	45
Foto 12. Vista macroscópica en tubo de SSF con SES dilución 1:8.....	46
Foto 13. Vista microscopica de SSF con SES dilución 1:8.....	46
Foto 14. Vista macroscópica en tubo de SG con SES dilución 1:8.....	46
Foto 15. Vista microscopica de SG con SES dilución 1:8.....	46
Foto 16. Vista macroscópica en tubo de SH con SES dilución 1:8	46
Foto 17. Vista microscopica de SH con SES dilución 1:8.....	46
Foto 18. Neutrófilo banda . Frotis de sangre canina (40X) tratada con SES. .	58
Foto 19. Eosinófilo. Frotis de sangre canina (40X) tratada con SES.....	58

Foto 20. Eosinófilos. Frotis de sangre canina (40X) tratada con SES	58
Foto 21. Neutrófilo segmentado. Frotis de sangre canina (40X) tratada con SES.....	58
Foto 22. Neutrófilo banda y linfocito. Frotis de sangre canina tratada con SES.	58
Foto 23. Monocito. Frotis de sangre canina tratada con SES.....	58
Foto 24. Resultado de la prueba de LAL para endotoxinas por el método de Gel-Clot.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectividad de la SES sobre microorganismos que tienen relevancia respecto de la morbilidad y mortalidad del país	5
Tabla 2. Valores hematológicos de referencia en caninos adultos aparentemente sanos.....	47
Tabla 3. Resultados de la cuenta leucocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES	48
Tabla 4. Resultados de la cuenta eritrocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES	49
Tabla 5. Resultados de la concentración de hemoglobina en sangre canina no tratada y tratada con SES	50
Tabla 6. Resultados del porcentaje de hematocrito en sangre canina no tratada y tratada con SES	51
Tabla 7. Resultados del conteo plaquetario de sangre canina no tratada y tratada con SES	52
Tabla 8. Valores relativos obtenidos en la cuenta diferencial en frotis de sangre no tratada y tratada con SES	53

INDICE DE GRAFICAS

Gráfico No.1	Determinación de pH en SSF, SG, SH y SES.....	37
Gráfico No.2	Determinación de ORP en SSF, SG, SH y SES	37
Gráfico No.3	Determinación de ppm de cloro en SSF, SG, SH y SES	37
Gráfico No.4	Determinación de ORP de SSF con SES a diferentes diluciones ...	38
Gráfico No.5	Determinación de pH de SSF con SES a diferentes diluciones	38
Gráfico No.6	Determinación de ppm de cloro total en SSF con SES a distintas diluciones	38
Gráfico No.7	Determinación de ORP en SH con SES a distintas diluciones.....	39
Gráfico No.8	Determinación de pH en SH con SES a distintas diluciones	39
Gráfico No.9	Determinación de ppm de cloro total en SH con SES a distintas diluciones	39
Gráfico No.10	Determinación de ORP en SH con SES a distintas diluciones....	40
Gráfico No.11	Determinación de pH en SG con SES a distintas diluciones.....	40
Gráfico No.12	Determinación de ppm de cloro total en SG con SES a distintas diluciones	40
Gráfico No.13	Comparación de la cuenta leucocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES.....	48
Gráfico No.14	Comparación de la cuenta eritrocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES.....	49
Gráfico No.15	Comparación de la concentración de hemoglobina en sangre canina no tratada y tratada con SES	50
Gráfico No.16	Comparación del porcentaje de hematocrito en sangre canina no tratada y tratada con SES	51
Gráfico No.17	Comparación de la cuenta plaquetaria en sangre canina no tratada y tratada con SES.....	52
Gráfico No.18	Comparación de la cuenta diferencial de linfocitos en sangre no tratada y tratada con SES	55
Gráfico No.19	Comparación de la cuenta diferencial de monocitos en sangre no tratada y tratada con SES	55

Gráfico No.20 Comparación de la cuenta diferencial de neutrófilos segmentados en sangre no tratada y tratada con SES.....	55
Gráfico No.21 Comparación de la cuenta diferencial de neutrófilos banda en sangre no tratada y tratada con SES.....	56
Gráfico No.22 Comparación de la cuenta diferencial de eosinófilos en sangre no tratada y tratada con SES	56
Gráfico No.23 Comparación de la cuenta diferencial de basófilos en sangre no tratada y tratada con SES	56

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitro
Abs	Absorbancia
NaCl	Cloruro de Sodio
SES	Solución Electrolizada de Superoxidación con pH Neutro
SSF	Solución Salina Fisiológica
SG	Solución Glucosada
SH	Solución Hartmann
ORP	Potencial Oxido Reducción
ppm	Partes por millón
HClO	Acido hipocloroso
CLA	Cloro Libre Activo
NaClO	Hipoclorito de Sodio
LAL	Lisado de Amebocitos de <i>Limulus</i>
mm ³	Milímetro cúbico
mm	Milímetro
rpm	Revoluciones por minuto
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
μl	Microlitro
mg	Miligramo
dl	Decilitro
°C	Grado Celsius
pH	Potencial de Hidrógeno
UFC	Unidad Formadora de Colonias

1. INTRODUCCION

1.1 SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN (SES)

Las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) son soluciones con efecto desinfectante, esterilizante y antiséptico. Son fabricadas a partir de agua común (purificada a través de osmosis inversa) más la adición de NaCl grado reactivo. Esta solución se hace pasar a través una cámara que cuenta con dos electrodos, uno positivo (ánodo) y otro negativo (cátodo), divididos por una membrana diafragmática, y a la que se le induce corriente eléctrica.⁶⁴

Esto genera que el cloruro de sodio en el agua se disocie en cloro cargado negativamente, así como en sodio e hidrógeno cargados positivamente. Los iones hidroxilo y cloro son absorbidos por el ánodo, mientras liberan un electrón para transformarse en radicales.⁶⁴ Los radicales cloro e hidroxilo se combinan formando ácido hipocloroso (HClO) que se separa del ánodo, mientras que en el lado del cátodo cada sodio cargado positivamente recibe un electrón y se vuelve sodio metálico; éste se combina con moléculas de agua formando hidróxido de sodio y gas hidrógeno.¹³

Tras el proceso de electrólisis diafragmática se obtienen dos soluciones: agua electrolizada ácida o agua electrolizada oxidante, generada en la cámara del ánodo, y agua electrolizada básica o agua electrolizada reducida, generada en la cámara del cátodo. Posteriormente, estas dos soluciones pueden combinarse dando lugar al agua electrolizada neutra.^{13,64}

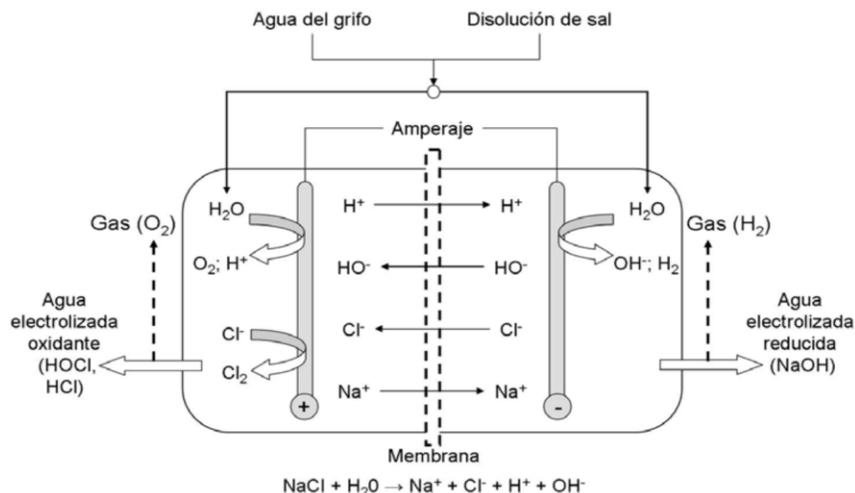
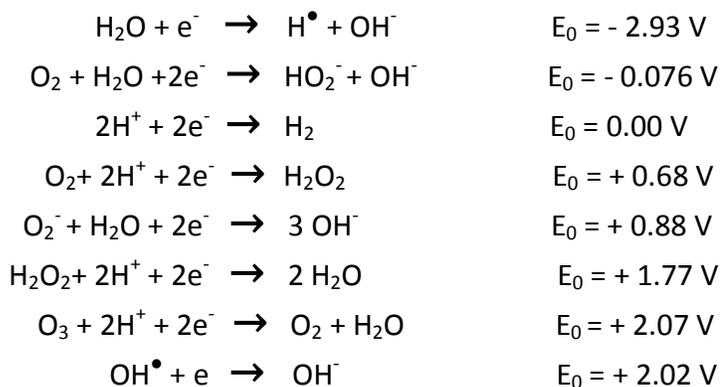


Ilustración 1. Esquema del proceso de obtención de la SES (Tebernero de Paz, 2013)

Debido a que se tiene H₂O y NaCl en la solución inicial, algunas de las especies que pueden formarse se señalan en las siguientes ecuaciones.

- ✓ Especies formadas por la separación iónica del agua.



Estos son algunos ejemplos de las semi-reacciones que pueden ocurrir, siendo notable que la electrólisis del agua produce iones H⁺ e OH⁻, radicales H[•] e OH[•] y especies neutras como H₂, O₂, HO₂ y O₃.

La adición de cloruro de sodio (NaCl) conlleva a la formación de intermediarios tanto en el cátodo como en el ánodo, que a su vez son capaces de reaccionar con las especies previamente formadas por la separación iónica del agua, dando lugar a compuestos altamente reactivos. Estas reacciones y sus productos son descritos por las siguientes ecuaciones.⁵⁴

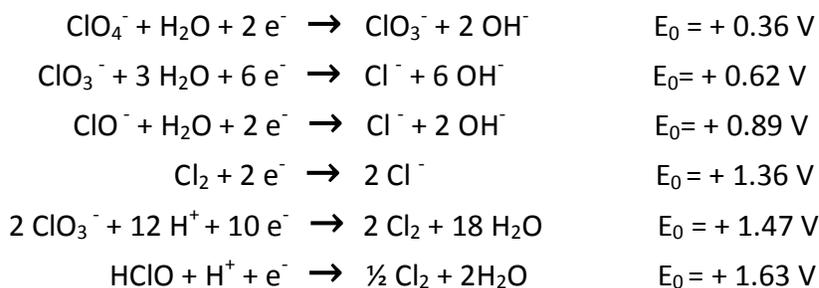
- ✓ Intermediarios formados en el cátodo (reducción)



- ✓ Intermediarios formados en el ánodo (oxidación)



- ✓ Especies formadas por la presencia de los intermediarios



Al final de este proceso se realiza una concentración controlada de volúmenes obteniendo la neutralidad del pH (6.4 a 7.5) ,un Potencial Oxido Reducción (ORP) de 800-900 mV; el cual relaciona la concentración de oxidantes o reductores en una solución, y su fuerza o actividad, dando una idea de la capacidad oxidante o reductora de la misma.^{23,58}

El pH neutro y el ORP son características que le confieren una mayor estabilidad frente a condiciones ambientales con rangos de iones dentro de estándares conocidos y permitidos para fines terapéuticos.¹³

Asimismo se obtiene una solución incolora, insabora, con un ligero olor a cloro y con un alto contenido de HClO (ácido hipocloroso), que es el responsable de la actividad microbicida de estas soluciones.⁶⁵ Además ha demostrado ser seguro, fácil de manipular, relativamente barato y ecológico.⁵⁴

Cabe mencionar que existen algunas diferencias entre las SES acidas y alcalinas obtenidas en el proceso de electrolisis. Las SES ácidas (pH 2-4) son agentes microbicidas activos como resultado de la alta cantidad de cloro libre activo (CLA), el cual es superior a las 650 ppm⁵⁴; además tienen un rango variable de ORP, desafortunadamente, las SES ácidas son altamente corrosivas para los metales, por lo que se volvió poco practica para esterilizar instrumental critico y especializado, además son muy inestables por lo que su vida en anaquel es extremadamente corta (horas).^{16, 28}

En contraste la concentración de cloro libre activo (CLA) en las SES disminuye dramáticamente conforme se incrementa el pH, desde la región ácida (pH 2.5) hasta la alcalina (pH > 9.0); no obstante, las SES alcalinas también mantienen propiedades antimicrobianas aunque también son muy inestables y tal vez no sean tan eficaces como las SES ácidas.^{35, 54}

Debido a estos inconvenientes, su campo de aplicación se vio limitado a la desinfección de algunas áreas, pero a pesar de tales desventajas poseían una elevada capacidad desinfectante e incluso son catalogadas como desinfectantes de alto nivel, motivo por el cual se le dio continuidad a las investigaciones sobre el desarrollo de dichas soluciones y surgieron las SES con pH neutro.^{13, 54}

1.1.2. Antecedentes Históricos

El cloro (hipoclorito de sodio, NaClO) fue utilizado por primera vez como desinfectante en un hospital de Viena, por el Dr. Ignaz Semmelweis, en 1846. Su uso y aplicación ha evolucionado a través de la historia como germicida de alto nivel con efecto residual importante. Sin embargo, este tipo de soluciones cloradas a base de hipoclorito, presentan limitaciones importantes en su aplicación como agentes antimicrobianos en la terapéutica médica dado su poder oxidante y su toxicidad a nivel tisular.^{51,52}

Las soluciones electrolizadas, que incluyen en su formulación algunas especies de hipoclorito, se desarrollaron en 1964 como resultado de investigaciones en la NASA para esterilizar material recuperado del espacio.⁵⁴

A partir de 1996 fueron descritas como soluciones electrolizadas de superoxidación (SES), confiriéndoles una alta capacidad desinfectante, y una completa atoxicidad.⁶⁵

En el año 2003 una compañía de California (Oculus Innovative Sciences) logró, por primera vez, mantener estable y activa un agua de superoxidación de pH neutro (Microdacyn 60 MR) por más de 18 meses.^{1,54}

En el 2004, una empresa norteamericana introdujo en México una nueva tecnología japonesa para la síntesis de agua electrolizada.⁵⁴ Ésta ofrecía nuevas expectativas de aplicación en medicina dadas sus características de pH neutro, estabilidad (hasta por más de 18 meses) y resultados de pruebas de bioseguridad en animales que demostraron ausencia de irritación en la piel, en heridas y globo ocular, además de ausencia de toxicidad a la ingesta y en inyección intraperitoneal.^{52, 54}

En nuestro país se utilizó por primera vez en tratamientos médicos junto con el desarrollo de múltiples investigaciones.¹³

Posteriormente, surgieron más empresas en el país (Esteripharma) con tecnologías similares para sintetizar agua electrolizada², algunas con el propósito de realizar proyectos de investigación científica e innovación tecnológica en conjunto con el CONACyT y diversas universidades del país. Dado que el efecto germicida de la solución SES ha sido ampliamente documentado y avalado por COFEPRIS⁷³, actualmente se estudian sus efectos analgésicos, hemostáticos y de regeneración tisular.

1.1.3. Usos como agente desinfectante y microbicida.

Durante los últimos 20 años, se ha demostrado la propiedad antimicrobiana de las SES para diversos usos, sea como desinfectantes o antisépticos. Por ejemplo se han utilizado como desinfectantes para instrumentos, áreas y superficies inanimadas en hospitales.^{17, 54} Este método de descontaminación y esterilización ha cobrado importancia sobre todo en el procesamiento de los equipos de endoscopia, a los que de alguna manera se les atribuye parte del incremento de algunas infecciones cruzadas y contaminaciones iatrogénicas^{45,46}. También se han recomendado para el lavado y la desinfección de manos en personal médico. Además de ser de fácil manejo en el almacenamiento, uso y desecho.^{48, 61}

Las SES ejercen actividad microbicida contra distintas cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus resistentes a vancomicina*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Streptococcus pyogenes*, in vitro. Destruyen esporas de *Bacillus anthracis* (anteriormente *B. subtilis*) y *B. cereus*.^{9, 31, 39, 50, 58, 65, 69,71} También ejercen actividad contra los virus de hepatitis B (VHB), poliovirus, norovirus, así como la infectividad del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) en forma dependiente de tiempo y concentración.⁴²

De acuerdo con la NMX-BB-040-SCFI-1993 (donde se establece el criterio para catalogar una solución como germicida; se requiere una disminución en la concentración del microorganismo de 99,999 % en 30 segundos), los resultados reportados por laboratorios de tercera de las pruebas *in vitro* realizadas con la SES contra algunas cepas bacterianas son los siguientes:⁴⁹

Microorganismo	Tiempo	% de Reducción
<i>S. aureus</i>	30 segundos	99.999
<i>P. aeruginosa</i>	30 segundos	99.999
<i>E. coli</i>	30 segundos	99.999
<i>C. albicans</i>	30 segundos	99.999
<i>K. pneumoniae</i>	30 segundos	99.999
<i>M. tuberculosis</i>	5 minutos	99.999

Tabla 1. Efectividad de la SES sobre microorganismos que tienen relevancia respecto de la morbilidad y mortalidad del país.

1.1.4. Uso como agente terapéutico

La literatura también ha descrito el uso de las SES para diversos problemas clínicos en humanos, como lo son: procesos infecciosos en piel, tejidos y úlceras; en la irrigación del mediastino después de cirugía a corazón abierto; en el tratamiento de peritonitis; durante el proceso de lubricación, humectación, desbridamiento y cicatrización de heridas⁵¹, así como en quemaduras de segundo y tercer grado, en abscesos intraperitoneales; en úlceras de pie diabético (UPD); en úlceras varicosas; durante las etapas de preoperatorio, transoperatorio y posoperatorio, en irrigación supra y subgingival, en infecciones asociadas al catéter intravenoso entre otras.^{1,2,48, 54}

1.1.5. Uso en el área Agroveterinaria y otras.

La efectividad de la SES abarca la desinfección de alto nivel en instalaciones pecuarias e industriales, esterilización en frío de equipo y material pecuario y alimenticio, antiseptia para la salud animal, así como profiláctico para la limpieza de heridas, laceraciones en piel, mucosas, dermatología, otitis, conjuntivitis ; en el manejo pre, trans y postquirúrgico; en lavado peritoneal y profilaxis dental; en quemaduras, abscesos; en desinfección y conservación de alimentos en el sector agroalimentario, en las áreas avícola, acuícola, porcina, equina, bovina y pequeñas especies; investigación en hortalizas y floricultura; y efectividad de la solución en rastros bovinos porcinos y avícolas. Por todo lo anterior la SES es de gran utilidad ya que ha demostrado ser de acción inmediata, de fácil aplicación, no causa dolor o molestia al animal y no irrita piel ni mucosas, además de ser inocua, atóxica y biodegradable.^{14,15,24}

Asimismo se han realizado pruebas de utilización del agua electrolizada de superoxidación (SES) en animales de producción y otras especies domésticas, que han mostrado efectos interesantes sobre la fisiología y sanidad de los animales. En granjas de cría de broilers (pollos de engorde) se observó que utilizando una solución ligeramente ácida de agua electrolizada como agua de bebida los animales con problemas intestinales (diarrea) se restablecían en horas o en un día como máximo.^{63, 64}

En un ensayo realizado en 27 explotaciones japonesas de vacas lecheras se observó que los animales a los que se suministró agua electrolizada neutra como única fuente de agua de bebida, en comparación con los que bebían agua del grifo, presentaron un aumento de la producción de leche, que osciló entre un 18 y un 28 %, y una mejora notable de su calidad. Además los animales presentaron un aumento de la vida productiva, mayor fertilidad, reducción de los nacidos muertos, aumento notable del apetito, mejor

condición hepática y digestión del alimento. Además, los terneros recién nacidos que recibían agua neutra crecían más deprisa y presentaban menos casos clínicos de diarrea.^{12, 64}

También se ha constatado que el suministro de agua electrolizada neutra diluida al 3% (ácido hipocloroso, ORP 525 mV, pH 7,00) como agua de bebida para vacas lecheras en producción repercute sobre la calidad microbiológica de la leche, mejorando notablemente la calidad higiénico-sanitaria de la misma⁵ y produciendo un incremento significativo de su contenido en grasa, proteína y extracto seco magro, mientras que la lactosa y el punto crioscópico se ven disminuidos.^{19, 64}

1.1.6 Mecanismo de acción

El efecto bactericida del agua electrolizada se debe a su elevado potencial de oxidación y a la existencia de iones activos, controlados y estables que le confieren un amplio espectro de actividad.¹³

Su mecanismo de acción se atribuye al efecto de oxidación de los grupos sulfhídrido (-SH) y aminoácidos de la pared bacteriana, con lo que se afecta el proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, produciéndose oxidación de los componentes respiratorios e inhibición de la síntesis de proteínas por desnaturalización de las mismas, rompimiento de las cadenas de ARN y represión en la síntesis de moléculas del metabolismo celular, con disminución de la producción de ATP (adenosin trifosfato).^{9,45}

Tal vez se podría sintetizar en tres pasos, primero actividad contra proteínas de la pared y membrana celular o ambas, segundo acción sobre material genético y tercero acción sobre enlaces de alta energía, siendo estos dos últimos como de segundo término ya que al lisar a la bacteria ninguno de estos tiene relevancia.⁴¹

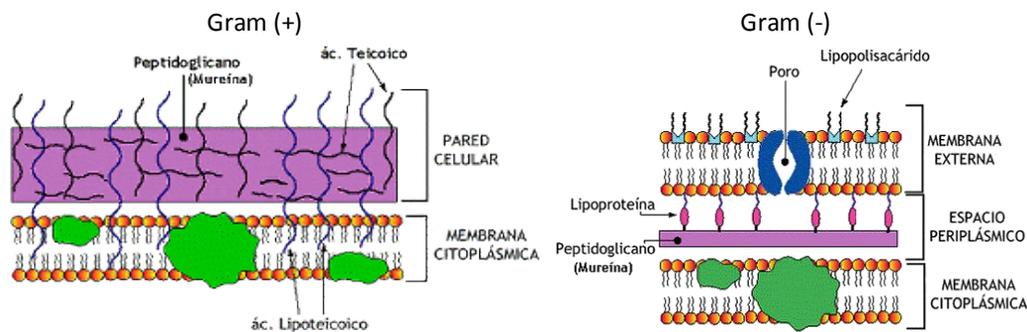


Ilustración 2. Representación esquemática de la membrana celular bacteriana y la pared de Gram (+) a la izquierda y Gram (-) a la derecha, nótese la diferencia en el espesor del peptidoglucano en ambas bacterias.

Por lo que respecta a las propiedades viricidas, el agua electrolizada produce alteración de la cápside, DNAsas y RNAsas víricas.⁹

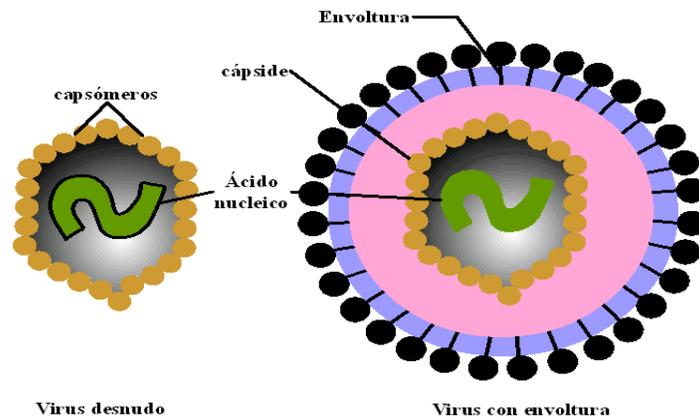


Ilustración 3. Representación de la estructura de un virus desnudo y envuelto.

1.2 DIARREA EN CANINOS

Una de las enfermedades más frecuentes que afectan a los perros es la diarrea, por lo que cada año mueren cientos de perros (sobre todo cachorros) en México. La diarrea es definida como la emisión de heces blandas o líquidas en mayor frecuencia y volumen, puede ser acompañada de sangre o moco, llevando a un cuadro de deshidratación severa por la reducción de electrolitos en la sangre.¹¹ El color negro de las heces se denomina "melena" y se asocia con graves sangrados digestivos cerca del estómago. Por diarrea no solo se debe entender la evacuación de heces líquidas, sino los distintos grados de ablandamiento que se pueden producir.¹⁸

La diarrea puede ser de repentina aparición y de corta duración, o también puede durar semanas o meses, o aparecer de forma intermitente. Un solo ataque de diarrea en los perros generalmente no es una causa de preocupación, pero si persiste por más de un día, puede conducir a la deshidratación, y podría indicar un problema de salud subyacente, por lo que debe ser revisado por un veterinario. Si la diarrea se combina con vómito, la deshidratación es mucha más rápida y grave.²⁹

La diarrea en cachorros y en razas pequeñas es especialmente grave, ya que aun no han adquirido la inmunidad necesaria para defenderse contra los diversos agentes que logren atacar su organismo y tienden a deshidratarse muy rápidamente y sufrir de choque hipovolémico, fríos e hipoglucemia, lo cual les puede causar la muerte de manera rápida.²

Las diarreas pueden presentarse por múltiples factores, ya sea como respuesta mecánica, o infecciosa (viral, parasitaria o bacteriana). Los agentes patológicos más frecuentemente asociados con la diarrea incluyen: ⁴

- Bacterias: Dentro de las diarreas infecciosas bacterianas las más comunes son producidas por: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella spp*, con excepción de la *Salmonella spp*, las demás bacterias por lo general están presentes como flora normal intestinal y generalmente se multiplican por algún desbalance digestivo o por inmunosupresión. Las diarreas varían de heces de menor consistencia, o blandas, a diarreas acuosas, mucosanguinolientas y en algunos casos con sangre fresca.
- Virus: La diarrea en los cachorros y jóvenes es motivo de especial preocupación, porque es a menudo el primer síntoma de algunas enfermedades virales graves y potencialmente mortales como el Parvovirus, Coronavirus y el Virus del Distemper Canino. Hace algunos años el asesino N°1 de los perros era el parvovirus, pero hoy en día es mucho menos común, gracias al uso extenso de las vacunas. Las diarreas pueden ser o no sanguinolentas según el tipo de virus que actúa.
- Parásitos: Los parásitos intestinales son una causa muy común de diarrea en perros. Hay muchos tipos de parásitos que pueden infestar a los perros, y la diarrea es con frecuencia uno de los síntomas más comunes de una infestación parasitaria, algunos de los parásitos más comúnmente encontrados son: *Ancylostoma*, *Strongyloides spp.*, *Toxocara spp.* y *Trichuris vulpis*.
- Protozoos: *Isospora*, *Criptosporidium*, *Giardia*, *Pentatrichomonas*, *Balantidium coli* y *Entamoeba histolytica*

Algo muy importante a tomar en cuenta, es que muchos de estos agentes son transmisibles al ser humano y algunos son incluso mortales. Todo perro con diarrea debe ser aislado de inmediato y se debe impedir el contacto con niños o personas con algún tipo de trasplante, diabetes, cáncer, SIDA etc.^{7,8} Lamentablemente no existe un tratamiento en específico que cure dicha patología, y por lo cual recurrentemente solo se cuenta con la administración de antibióticos, medicinas caseras (agua de pipa y agua de arroz con canela), cambio en la dieta, uso de suero oral, o el uso de sueros intravenosos o intraperitoneales en caso de deshidratación y vomito severo.¹⁸

Por ello un examen de heces doble parasitológico y bacteriológico es indispensable, además de la realización de un hemograma y química sanguínea.⁸

Por todo lo anterior es necesario contar con un tratamiento que sea vital y al que se recurra primeramente ante cualquier tipo de diarrea y que actúe de manera inmediata, por ello las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) mezcladas con soluciones intravenosas podrían ser un tratamiento alternativo para el control de diarreas en perros, ya que este actuaría de forma rápida teniendo un efecto bactericida y/o viricida.

Por ello para llevar a cabo un tratamiento eficaz hacia la diarrea canina es necesario realizar los estudios hematológicos correspondientes para evaluar los componentes de la sangre al tratar a los perros con SES combinadas con soluciones intravenosas y comprobar que no exista alguna alteración en las pruebas que componen un hemograma.

1.3 SANGRE

La sangre es un tejido conectivo, líquido que circula por capilares, venas y arterias. Su coloración rojiza es característica por la presencia del pigmento hemoglobínico contenido en los eritrocitos, es ligeramente alcalina (pH 7,4) y representa aproximadamente el 7% del peso corporal del animal.^{66,70}

La sangre tiene una fase sólida (elementos formes) que compone alrededor del 45%, constituida por una suspensión de diferentes tipos de células (glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas), y una fase líquida compuesta por el 55%, representada por el plasma sanguíneo, que actúa como la matriz extracelular del tejido.^{6,59}

Todas las células sanguíneas se encuentran en un número y porcentaje más o menos constante, que puede variar según la especie y la condición fisiológica o patológica del animal.⁶

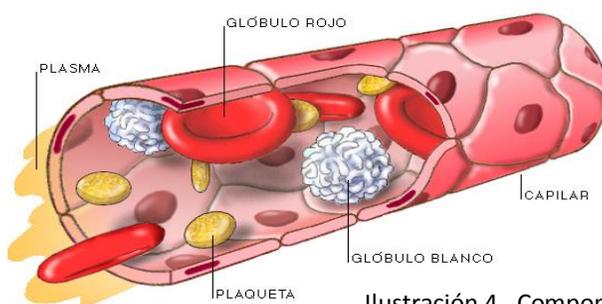


Ilustración 4. Componentes de la sangre

1.3.1 Funciones de la sangre

- Conduce productos de la actividad metabólica como el dióxido de carbono de los tejidos hacia los pulmones.
- Permite que células y distintas sustancias (aminoácidos, lípidos y hormonas) sean transportados entre tejidos y órganos.
- Transporta el oxígeno desde los pulmones al resto del organismo, vehiculizado por la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos.
- Transporta el anhídrido carbónico desde todas las células del cuerpo hasta los pulmones.
- Transporta los nutrientes contenidos en el plasma sanguíneo, como glucosa, aminoácidos, lípidos y sales minerales desde el hígado, procedentes del aparato digestivo a todas las células del cuerpo.
- Transporta mensajeros químicos, como las hormonas.
- Defiende el cuerpo de las infecciones, gracias a las células de defensa o glóbulo blanco.
- Responde a las lesiones que producen inflamación, por medio de tipos especiales de leucocitos y otras células.
- Coagulación de la sangre y hemostasia: Gracias a las plaquetas y a los factores de coagulación.
- Rechaza el trasplante de órganos ajenos y alergias, como respuesta del sistema inmunitario.
- Homeostasis en el transporte del líquido extracelular, es decir en el líquido intravascular.^{6, 59, 66, 70}

1.3.2 Plasma

El plasma es la porción líquida de la sangre en la que están inmersos los elementos formes, es el mayor componente de la sangre, es salado y de color amarillo transparente, y está compuesto por un 90% de agua, 9% de proteínas (fibrinógeno, albuminas y globulinas) y el 1% de sales inorgánicas, compuestos nitrogenados, nutrientes, gases, enzimas, hormonas, vitaminas y productos de desecho.^{6, 59} Además de transportar las células de la sangre, lleva los nutrientes y las sustancias de desecho recogidas de las células.⁶⁶

Cuando se coagula la sangre y se consumen los factores de la coagulación, la fracción fluida que queda se denomina suero sanguíneo.⁷⁰

1.3.3. Elementos formes de la sangre

1.3.3.1 Eritrocitos

Los eritrocitos maduros de perros tienen una vida media de 120 días, su tamaño es de 7µm de diámetro, son células anucleadas, muestran una coloración rojiza o rojizo-anaranjada, tienen una forma discoidal bicóncava, presentan una palidez central destacada; la cual se caracteriza por el área de coloración más clara en el centro de la célula; debida a una estrecha asociación de las membranas y a una cantidad disminuida de hemoglobina en la zona central del eritrocito.

Los eritrocitos tienen la función de transporte e intercambio de oxígeno y dióxido de carbono a los tejidos del organismo.^{6, 57, 62}

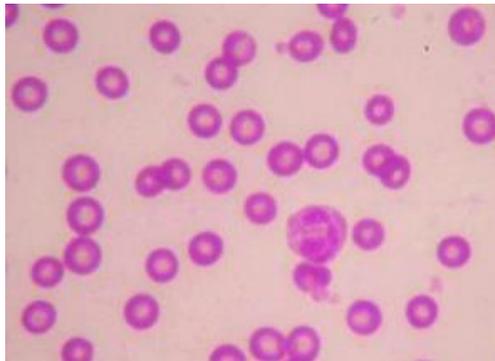


Ilustración 5. Eritrocitos caninos. Destacan los numerosos eritrocitos anucleados cuya parte central es clara, en el centro se observa un eosinófilo. Frotis de sangre canina; objetivo 100X.

1.3.3.2 Leucocitos

- **Neutrófilos Segmentados.** Son los leucocitos más comunes en la sangre periférica de todas las especies domésticas comunes (60-70% del total de leucocitos), tienen una vida media en sangre de 6-8 horas.⁶² Cuentan normalmente un diámetro de 10 a 12 µm y poseen un solo núcleo con varias muescas que son el resultado de la división del núcleo en múltiples lóbulos. Normalmente, hay de 3 a 5 lóbulos o segmentos de color púrpura. El tipo de cromatina del núcleo consiste en áreas muy oscuras y condensadas entremezcladas con pequeñas áreas claras. El citoplasma se tiñe ligeramente de azul o rosa según el tipo y la calidad de la tinción utilizada además de presentar una sutil eosinofilia (granulación).⁵⁷

- **Neutrófilos en Banda.** Estas células aparecen en cantidades reducidas (0-3%). Su núcleo no presenta lobulaciones y suele aparecer en forma de banda. Debido a que los neutrófilos en banda son un estado de la diferenciación gradual hacia la forma de neutrófilo segmentado, es posible que se observen ligeras muescas nucleares.⁵⁷ Los neutrófilos son la primera línea de defensa del organismo frente a las agresiones por agentes biológicos o físicos. Estas células se dirigen hacia el agente nocivo gracias a la presencia en el plasma de sustancias quimiotácticas y participan en la destrucción de dicho agente debido a la capacidad que tienen de fagocitar. Este proceso lo realizan mediante la ingestión por fagocitosis del agente y la descarga sobre la vacuola fagocítica de enzimas hidrolíticas. Estas células pueden producir sustancias como los leucotrienos, que participan en el inicio de la reacción inflamatoria. Igualmente, intervienen en la coagulación, fibrinólisis, activación de linfocitos y citotoxicidad. Una vez realizada su función estas células mueren, contribuyendo a la formación del pus, integrado por neutrófilos muertos, bacterias y restos tisulares.^{6, 62}



Ilustración 6. Neutrófilo en banda (izquierda) y neutrófilo segmentado (derecha).Frotis de sangre canina; objetivo 100X.

- **Eosinófilos.** Representan aproximadamente el 2-4 % de los leucocitos totales en animales sanos, tienen un tamaño de 10-14 μm de diámetro y una vida media en sangre de 24-35 horas.⁶ Presentan un núcleo bilobulado, el citoplasma se tiñe de azul pálido y tiene múltiples gránulos rojizos o rojizo-anaranjados. La cantidad y las formas de los gránulos son muy diversas en la mayoría de las especies domesticas comunes. Los gránulos de eosinófilo de perro son redondos y muy viables en tamaño y número. Asimismo, aparecen a menudo en el citoplasma múltiples vacuolas de tamaños variados.⁵⁷ La función de los eosinófilos es que Intervienen en procesos de alergia frente a parásitos, en reacciones de hipersensibilidad y fagocitosis de complejos Ag-Ac.^{6,62}

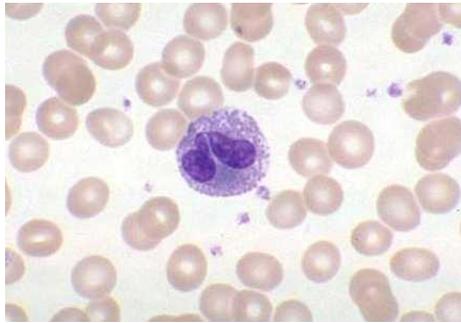


Ilustración 7. Eosinófilo. Frotis de sangre canina; objetivo 100X.

- **Basófilos.** Aparecen raramente en sangre periférica de todas las especies domesticas comunes (menos del 1% de los leucocitos), tienen unos 10 μm de diámetro.⁵⁷ Citoplasma color purpura, núcleo elongado y lobulado (normalmente tiene forma de S) y a veces, puede quedar oculto por la presencia de escasos gránulos citoplasmáticos pequeños, redondos y de color purpura. Los basófilos están implicados en reacciones alérgicas e inflamatorias.⁶



Ilustración 8. Basófilo. Frotis de sangre canina; objetivo 100X.

- **Monocitos.** Están ausentes o presentes en cantidades reducidas en la sangre periférica (representan aproximadamente el 5% de los leucocitos), son muy similares en todas las especies domesticas comunes. Tienen normalmente un diámetro de 15-20 μm , el núcleo es pleomorfo: ovales, alas de mariposa, forma de S y arriñonado. La cromatina nuclear tiene un aspecto finamente granular o en forma de encaje con solo unas pocas áreas de condensación. La cantidad moderada de citoplasma es normalmente azul-gris y puede tener vacuolas múltiples discretas de varios tamaños.⁵⁷

Su función es la fagocitosis (cuerpos extraños, células neoplásicas, eritrocitos anormales, hongos, etc.), se transforma en macrófago cuando migra a tejidos. Además participa en las reacciones inmunológicas (presentación de antígenos a linfocitos y producción de citoquinas que activan linfocitos T y B).⁶

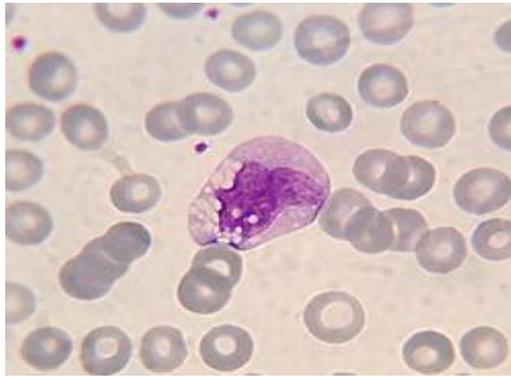


Ilustración 9. Monocito. Frotis de sangre canina; objetivo 100X

- **Linfocito.** Son el segundo tipo de célula más común en la sangre periférica de la mayoría de las especies domésticas, suponen aproximadamente el 20-25% de los leucocitos. Son células de unos 8-10 μm de diámetro, aunque también se diferencian linfocitos grandes 15-18 μm y medianos 12-15 μm . Tienen un núcleo redondeado que ocupa prácticamente la totalidad de la célula y con gran cantidad de heterocromatina. Su citoplasma apenas es perceptible y presenta algunos gránulos azurófilos.⁶ Dentro de los linfocitos T encontramos dos poblaciones: linfocitos T citotóxicos cooperadores. Los citotóxicos actúan frente a las células tumorales y células infectadas por virus. Los cooperadores modulan la respuesta inmune específica dependiendo de la naturaleza del agente frente al que actúen. Los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Parte de los linfocitos T y B se diferencian a células de memoria, cuya función es producir respuestas rápidas y de más intensidad ante una segunda exposición al antígeno.⁵⁷

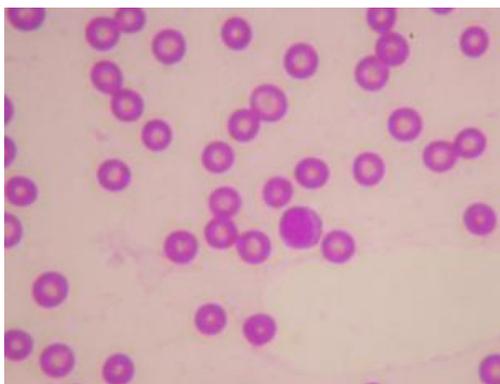


Ilustración 10. Linfocito. Frotis de sangre canina; objetivo 100X

1.3.3.3 Plaquetas

Conocidas también como trombocitos, son células pequeñas, anucleadas, de forma discoidal, que se tiñen de azul claro y pueden tener múltiples granos finos rosados o purpúreos en el citoplasma. Miden normalmente de 2-4 μ m de diámetro y tienen una vida media de 6-12 días.⁵⁷

Favorecen la coagulación sanguínea. Cuando las plaquetas contactan con el colágeno subendotelial, tras la rotura del endotelio, se activan y descargan el contenido de los gránulos, se adhieren a la pared (adhesión plaquetaria) y se adhieren entre sí (agregación plaquetaria), resultando la formación del coagulo sanguíneo por las interacciones entre los factores tisulares, factores transportados por el plasma y factores derivados de las plaquetas.⁶²

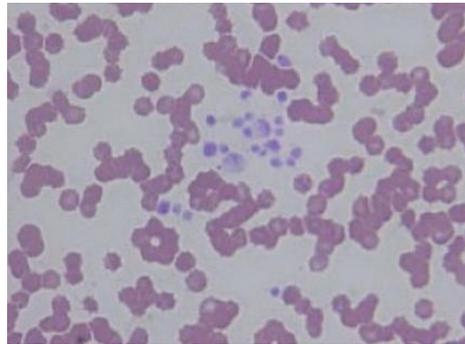


Ilustración 11. Plaquetas. Frotis de sangre canina; objetivo 100X.

1.4 HEMATOPOYESIS

Las células sanguíneas tienen una vida media finita, pero en los animales sanos el número de células en circulación se mantiene en un nivel constante. Para conseguirlo, las células que se hallan en circulación necesitan ser repuestas constantemente, y ello se consigue mediante la hematopoyesis la cual se define como el proceso mediante el cual se forman las células de la sangre en la medula ósea, a partir de una célula madre pluripotencial o *stem cell*.⁶² A partir de dicha célula se originan diferentes fases de células progenitoras, que posteriormente, se diferencian en células de la serie eritrocítica, granulocítica, megacariocítica y agranulocítica (monocitos y linfocitos). El resultado final de este proceso es la emisión de eritrocitos, leucocitos y de plaquetas al torrente sanguíneo.^{55, 56}

Los centros de producción en la medula ósea se conocen normalmente como lugares medulares. En momentos de una mayor demanda, la producción puede realizarse fuera de la medula ósea en lugares como el bazo, el hígado, y los ganglios linfáticos. Se trata de los llamados lugares extramedulares.

Para que la hematopoyesis ocurra se da lugar una serie de fenómenos concatenados que se inician a nivel unicelular con la autoduplicación, seguidos de diferenciación y maduración, culminando con la producción de las células maduras que serán liberadas a la circulación.^{47, 57}

Se considera la diferenciación como la secuencia de hechos genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos, los que le confieren potencialidad para determinada función. La maduración es la secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos iniciados por la diferenciación y que confieren capacidad funcional a la célula.⁶²

La célula madre pluripotencial o *stem cell* es capaz de autoduplicarse, resultando en células hijas que conservan la capacidad de la célula madre de dar origen a nuevos linajes celulares. Las células hijas denominadas células progenitoras unipotenciales o bipotenciales, tienen la información genética que les permitirá dar lugar a las células precursoras o blastos y así definirse hacia una serie celular. Esta serie de estados secuenciales de la hematopoyesis, de pluripotencial a bipotencial o unipotencial, es irreversible.⁵⁷

Las célula madre pluripotencial y la unipotencial son indistinguibles morfológicamente y se trata de células grandes de citoplasma escaso y basófilo con una relación núcleo/citoplasma alta. En el núcleo aparece la cromatina dispersa y con nucléolos prominentes. Las células precursoras o blastos son de menor tamaño y en ellas ya se distinguen algunas características morfológicas que caracterizan a los diferentes linajes.^{6, 47}

La célula madre da lugar a dos células hijas con linajes diferentes, el de las células linfoides, que dan lugar a los linfocitos, y el de las células mieloides, que originan los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), glóbulos rojos (eritrocitos), monocitos y plaquetas (trombocitos). (Imagen 12)⁵⁷

Las células sanguíneas derivadas de las células pluripotenciales mieloides permanecen en la medula ósea para completar su diferenciación y maduración, mientras que las células progenitoras de los linfocitos T abandonan la medula ósea y se dirigen al timo, donde proliferan y se diferencian. Los linfocitos B pueden formarse en lugares diversos como el tejido linfoide asociado al intestino, bazo y medula ósea considerándose este último lugar como el más importante.^{47, 56}

La hematopoyesis se encuentra regulada por citocinas y hormonas. Las citocinas actúan como factores de crecimiento sobre células madres, progenitoras y precursoras e inducen mitosis y crecimiento. Entre las hormonas, la eritropoyetina actúa en la proliferación y diferenciación de los eritrocitos y la trombopoyetina en la de las plaquetas.⁶

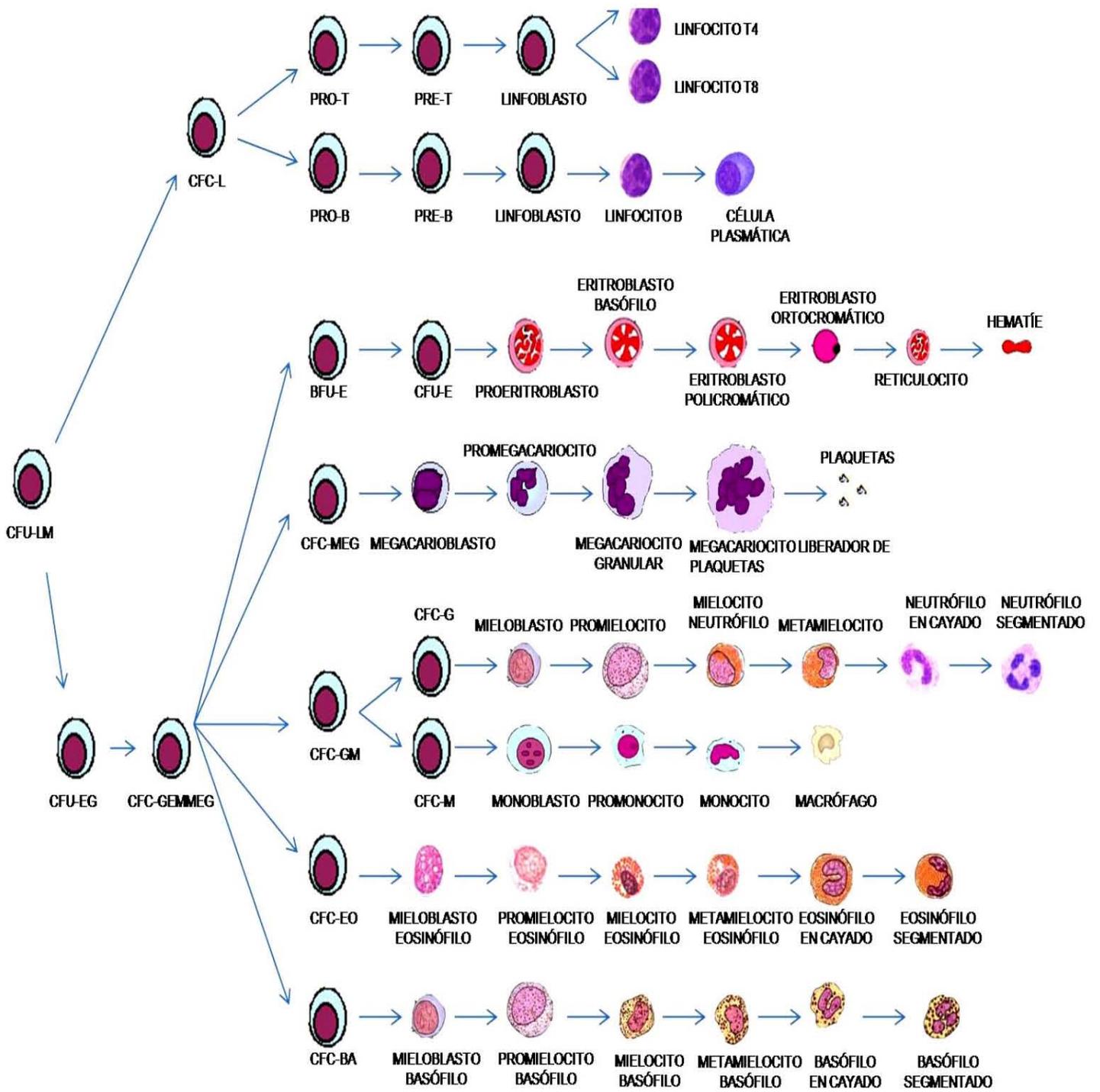


Ilustración 12. Esquema de la producción, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la solución electrolizada de superoxidación (SES) con pH neutro mezclada con sangre de perros, mediante la realización de una biometría hemática, para determinar que no exista algún cambio hematológico y poder proponerla como posible tratamiento en sueros intravenosos.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar ORP, pH y ppm de cloro de Solución Salina Fisiológica (SSF), Solución Hartmann, Solución Glucosada al 5% y solución electrolizada de superoxidación (SES) de pH neutro.
- Determinar ORP, pH y ppm de cloro de Solución Salina Fisiológica (SSF), Solución Hartmann, Solución Glucosada al 5% combinada con solución electrolizada de superoxidación (SES) de pH neutro.
- Evaluar el efecto de la SES en glóbulos rojos (lisis, crenación, hemolisis y morfología).
- Determinar posibles alteraciones en la concentración de hemoglobina, porcentaje de hematocrito y en el volumen de sedimentación globular.
- Determinar variaciones en la cuenta leucocitaria, eritrocitaria y plaquetaria.
- Mediante frotis sanguíneo realizar cuenta diferencial y evaluar morfología leucocitaria y eritrocitaria.
- Realizar prueba de lisis a sangre de perro con Solución Salina Fisiológica (SSF), Solución Hartmann y Solución Glucosada al 5% combinada con solución electrolizada de superoxidación (SES) a diferentes diluciones.
- Determinar la actividad microbicida de la SES vs SSF contaminadas con un número conocido de bacterias.
- Evaluar la presencia de endotoxinas en SES, SSF, SH, SG y en agua de grifo mediante la prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL).

3. JUSTIFICACIÓN

Lamentablemente no existe en México una estadística confiable que nos permita con exactitud establecer los porcentajes de incidencia y mortalidad de perros que sufren diarreas, las cuales, en algunas ocasiones, dependiendo de la gravedad de la enfermedad es necesaria la hospitalización para seguir con el control adecuado de dicha patología, lo cual con lleva a que el dueño pague un elevado costo por la permanencia hospitalaria, cuidados especiales y tratamiento, y/o en algunos casos la lamentablemente perdida de la mascota.

Cabe mencionar que a nivel mundial no se cuenta con un tratamiento específico para dicha patología, por ello es necesario contar con un tratamiento que sea vital y al que se recurra primeramente ante cualquier tipo de diarrea y que actúe de manera inmediata, por ello las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) de pH neutro mezclada con soluciones intravenosas podrían ser un tratamiento alternativo para coadyuvar a la recuperación de la salud de la mascota ya que este actuaría de forma rápida teniendo un efecto bactericida y/o viricida.

Por ello para llevar a cabo un tratamiento eficaz hacia la diarrea canina es necesario realizar los estudios hematológicos correspondientes para evaluar los componentes de la sangre, al tratar a los perros con solución electrolizada de superoxidación (SES) de pH neutro combinada con soluciones intravenosas y así comprobar que dicho tratamiento no sea dañino hacia las células sanguíneas y componentes de la sangre.

4. HIPÓTESIS

Si la solución electrolizada de superoxidación (SES) de pH neutro mezclada con sangre de perro *in vitro* no provoca cambios hematológicos y no pierde su capacidad microbicida, entonces podría ser una alternativa de tratamiento para perros que requieran sueros intravenosos.

5. MATERIALES

5.1 Material

- Tubos de Wintrobe (PIREX®)
- Portaobjetos de 25x75 mm (CORNING®)
- Tubos capilares para hematocrito 75mm x 1.5 mm (LAUKA®)
- Pipeta para glóbulos rojos (PROPPER)
- Pipeta para glóbulos blancos (PROPPER TROPHY modelo 6982)
- Cámara de Neubauer (HAUSSER SCIENTIFIC®)
- Tubos de ensaye (PIREX®)
- Vasos de precipitados de 50 ml (PIREX®)
- Pipeta de Salhi con manguera de succión (PROPPER TROPHY)
- Pipeta graduada de 5ml (PIREX®)
- Pipeta Pasteur (CORNING® modelo 7095B-5X)
- Matraz Erlen Meyer de 250 ml (KIMAX®)
- Probeta graduada de 250 ml (KIMAX®)
- Escala según Mc Farland
- Tubos de ensaye con tapón de rosca estériles de 13 x 100 (PYREX®)
- Pipetas graduadas desechables estériles de 5 y 10 ml)
- Agitador para pipetas de thoma
- Tubos al vacío tapón morado (BD Vacutainer®)
- Gradilla de sedimentación
- Pipetor (INTEGRA- PIPETBOY®)
- Gradillas
- Puntas amarillas para micropipeta estériles
- Mechero de Bunsen
- Asas Bacteriológicas
- Placas de cultivo celular de 96 pocillos fondo plano con tapa (MICROTEST™)
- Cajas Petri estériles desechables (S y M Laboratorios®)
- Gasas
- Papel parafilm
- Micropipeta de 100 µl (BIOHIT Proline®)
- Contador mecánico para células (LAB- COUNT DENOMINATOR)
- Vortex (Maxi-Mix II Thermolyne)
- Kit para la prueba de LAL (Lisado de Amebocitos de *Limulus*) (ENDOSAFE®)

5.2 Reactivos

- Líquido de Thurk (CTR-SCIENTIFIC®)
- Diluyente de Hayem (Fisher Scientific®)
- Agua destilada estéril
- Colorante azul de cresilo brillante (Fisher Scientific®)
- Colorante de Wright (HYCEL®-REACTIVOS QUIMICOS)
- Reactivo de Drabkin (Fisher Scientific®)
- Oxalato de amonio al 1%
- Aceite de inmersión (ZEIZZ- Immersol®518N)
- Alcohol al 70%

5.3 Soluciones

- Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro (VeteriBac®mascotas)(SES)
- Solución Salina Fisiológica 0.9% (PISA®)(SSF)
- Solución Glucosada al 5% (PISA®)(SG)
- Solución de Hartmann (PISA®)(SH)

5.4 Equipo

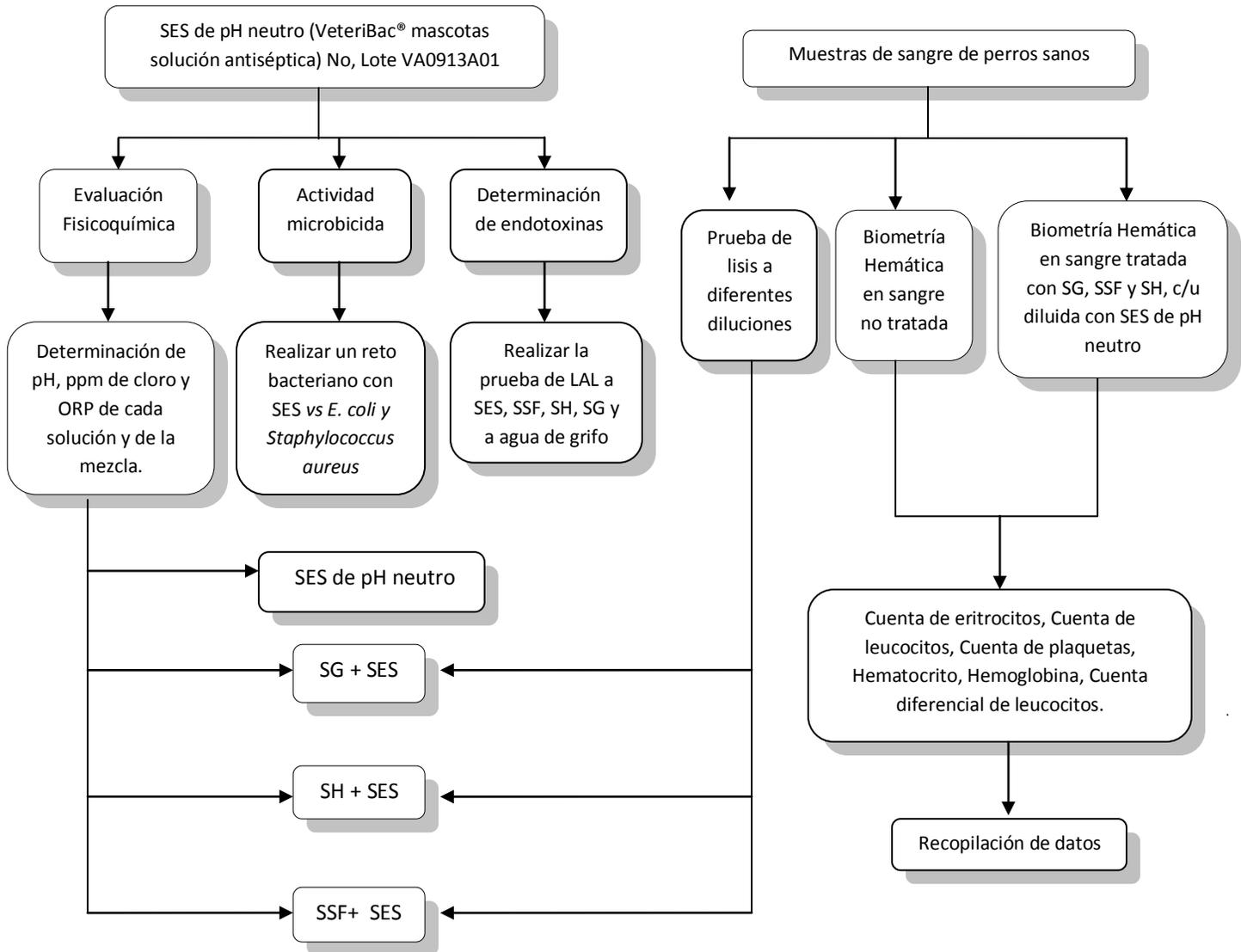
- Espectrofotómetro (COLEMAN-JUNIOR® II modelo 620)
- Centrifuga (SOLVAT®)
- Microscopio óptico (ZEIZZ modelo Axion Lab A1)
- Campana de Flujo Laminar Horizontal (ORGOS®)
- Estufa bacteriológica (RIOSSA®)
- Refrigerador (Pfizer®)
- Autoclave
- Equipo Free and Total Chlorine ISM HI 96771C (HANNA Instruments)
- pH-metro (pH/ORP & Temperature Meter HANNA instruments) Modelo HI 98121

5.5 Material biológico

- *E. coli* ATCC 11229
- *Staphylococcus aureus* ATCC6538
- Sangre de perros sanos

6. Metodología

6.1 Diagrama General de Trabajo



Acotaciones

LAL	Lisado de Amebocitos de Limulus
SES	Solución Electrolizada de Superoxidación
SSF	Solución Salina Fisiológica
SH	Solución Hartman
SG	Solución Glucosada

6.2 Determinación de pH y ORP de SSF, SH y SG con SES

Se prepararon una serie de diluciones dobles seriadas de la solución en estudio en un vaso de precipitados.

1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32

1. Se agregaron 25ml de SSF estéril en todos los vasos de precipitados (5)
2. Posteriormente se agregaron 25ml de SES de pH neutro al vaso de precipitados no. 1.
3. A partir del vaso no. 1 se tomaron 25ml de la dilución, transfiriendo al vaso no. 2, se mezcló y se realizó sucesivamente lo mismo en los siguientes vasos de precipitados hasta el no. 5, en donde se desecharon los últimos 25 ml.
4. Se colocó cada vaso de precipitados con 50 ml de la solución problema en un agitador magnético y se sumergió el pH-metro dentro de la solución de tal forma que los electrodos de vidrio estuvieran completamente cubiertos por la solución.
5. Con la solución en movimiento se espero el tiempo determinado para que la lectura de ORP se estabilizara.
6. Posteriormente se obtuvo la lectura de pH.
7. Terminada la lectura se enjuagaron los electrodos de vidrio con agua desionizada y se sacudieron con precaución para eliminar cualquier resto de líquido.
8. Se procedió a realizar el mismo procedimiento con Sol. Hartmann y Sol. Glucosada al 5% cada una más SES de pH neutro.

NOTA: Se realizó la determinación de ORP y pH de cada solución (SSF, SH, SG y SES de pH neutro), así como de las diferentes diluciones realizadas con SES.

Se realizaron las lecturas de ORP y pH por triplicado para obtener una mayor confiabilidad estadística en los resultados.

6.3 Determinación de ppm de cloro total en SSF, SH y SG con SES.

Se utilizó el Equipo Free and Total Chlorine ISM HI 96771C (HANNA Instruments), para la determinación de ppm de cloro total.

1. Se colocó el estándar cero (CAL CHECK ZERO(A)), en el porta celdas del instrumento. Después de unos segundos se mostró el valor del estándar; el cual fue de "-0.0-", lo cual indicó que el medidor esta en cero y listo para la validación.
2. Posteriormente se colocó en el porta celdas el estándar CAL CHECK CHLORINE LR Y CHLORINE UHR(B) para empezar la medición, al final de ésta se mostró el valor del estándar de validación; la lectura debe estar dentro de las especificaciones reportadas en el certificado del estándar.
3. Se procedió a agregar 10ml de la solución problema en el recipiente recolector.
4. A continuación se adicionó el contenido de los sobres Chlorine ULTRA HR Reagent A y Chlorine ULTRA HR Reagent B.
5. Se homogenizó perfectamente y se colocó el recipiente recolector en el porta celdas del instrumento. Después de unos segundos se mostró el valor de la solución problema.

NOTA: Se realizó la determinación de ppm de cloro total de cada solución (SSF, SH, SG y SES de pH neutro), así como de las diferentes diluciones realizadas con SES.

Se realizaron las lecturas de ppm por triplicado para obtener una mayor confiabilidad estadística en los resultados.

6.4 Reto microbiano

Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, incluyendo el material utilizado.

6.4.1 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba

1. Se tomó un inóculo de cada microorganismo de prueba (*E. coli* ATCC 1129 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) cada uno se depositó en un tubo de ensayo con 9ml de solución salina fisiológica estéril, se mezcló perfectamente en un vórtex y estandarizó al 7.0 de la escala de Mc Farland.
2. Posteriormente se centrifugó cada tubo estandarizado a 4,500 rpm /15 minutos. Se desecharon 6ml del sobrenadante y los 3ml restantes se mezclaron con ayuda de un vórtex.

6.4.2 Determinación de la cuenta viable inicial

1. Se agregaron 99 ml de solución salina fisiológica estéril a dos matraces Erlenmeyer, se tapó con papel parafilm y rotuló cada matraz como: *E. coli* y *Staphylococcus aureus*.
2. Se transfirió 1ml de la suspensión de los microorganismos de prueba a cada matraz Erlenmeyer, se agitó perfectamente y se efectuaron las siguientes diluciones decimales:

$$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} \text{ y } 10^{-5}$$

3. Se colocó en cajas Petri estériles, por duplicado 100µl de las diluciones:

$$10^{-3}, 10^{-4} \text{ y } 10^{-5}$$

4. Posteriormente se agregaron (15-18 ml) a cada placa de agar para métodos estándar, se homogenizó y dejó solidificar para incubar durante 48 hrs a 37°C.
5. Contar las UFC contenidas en cada una de las cajas, en una cuenta colonias.

6.4.3 Inoculación de la muestra

1. Para cada uno de los microorganismos de prueba se adicionaron 99 ml de SES a dos matraces Erlenmeyer.
2. Se transfirió 1ml de la suspensión de los microorganismos de prueba a cada matraz, se agitó perfectamente durante 30 segundos exactos.
3. Seguidamente se tomó 1 ml de la misma y se agregó a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución de paro (Dilución 10^{-1}).

4. A partir de la solución de paro (10^{-1}) se continuaron haciendo dos diluciones mas con Solución Salina Fisiológica Estéril hasta obtener las siguientes:

$$10^{-2} \text{ y } 10^{-3}$$

5. Posteriormente se transfirió por duplicado 100µl de cada dilución a cajas Petri estériles y se agregó medio agar para métodos estándar, se homogenizó y dejó solidificar para incubar durante 48 hrs a 37°C.
6. Contar las UFC contenidas en cada una de las cajas, en una cuenta colonias.

6.4.4 Expresión de resultados

1. Determinación del porcentaje de reducción

Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

Donde: S = células sobrevivientes UFC/ml

C.V. = cuenta viable inicial

6.5 Determinación de pH y ORP de cada solución.

1. Se agregaron 30 ml de Sol. Hartmann, Sol. Glucosada al 5%, Solución Salina Fisiológica (SSF) y Solución Electrolizada de Superoxidación (SES) de pH neutro (VeteriBac® mascotas) por separado en un vaso de precipitados de 50 ml.
2. Se colocó el vaso de precipitados en un agitador magnético y se sumergió el pH-metro dentro de la solución de tal forma que los electrodos de vidrio estuvieran completamente cubiertos por la solución.
3. Con la solución en movimiento se espero un tiempo determinado para que la lectura de ORP se estabilice.
4. Posteriormente se obtuvo la lectura de pH.
5. Terminada la lectura enjuagaron los electrodos de vidrio con agua destilada y se sacudieron con precaución para eliminar cualquier resto de líquido.
6. Continuar con la lectura de la solución siguiente.

NOTA: Se realizaron las lecturas de ORP y pH por triplicado de cada solución para obtener una mayor confiabilidad estadística en los resultados.

6.6 Recolección de muestras de sangre de perro

Las 30 muestras de sangre fueron proporcionadas por el Hospital de Pequeñas Especies de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, las cuales fueron extraídas de diferentes razas de perros, entre diversas edades y pesos. Las muestras fueron recolectadas en tubos al vacío con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), con ausencia de hemolisis y sin formación de coágulo.

Cabe mencionar que las muestras fueron transportadas en un contenedor especial y trasladadas al laboratorio, en donde fueron procesadas de tal forma que no pasara más de 1 día de haberse recolectado.

6.7 Prueba de lisis en placa

Se prepararon series de diluciones dobles seriadas de la solución en estudio en una placa de 96 pozos fondo plano:

1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64

6.7.1 Preparación de SSF + SES

1. Se adicionaron 150 μ l de SSF estéril de la columna 2-8, fila "A".
2. Después se adicionaron 150 μ l de SES en la columna 1 y 2 fila "A".
3. A partir de la columna 2 se tomaron 150 μ l de la dilución, transfiriendo a la columna 3, se mezcló y se realizó sucesivamente lo mismo en las siguientes columnas hasta la columna 7, en donde se desecharon los últimos 150 μ l.
4. Posteriormente se adicionaron 150 μ l de sangre de la columna 1-8.
5. A partir de que se adicionó la sangre dejar reposar la placa en el refrigerador durante 2 horas como máximo.
6. Al cabo de este tiempo realizar las lecturas visuales y determinar que dilución es la apropiada en donde no hay efecto lítico.

6.7.2 Preparación de Sol. Hartmann + SES

1. Se adicionaron 150 μ l de Sol. Hartmann en la columna 2-8, fila "H".
2. Después se adicionaron 150 μ l de SES en la columna 1 y 2 fila "H".

NOTA: A partir del paso 3 al 6 se sigue de la misma manera antes descrita.

6.7.3 Preparación de Sol. Glucosada al 5% + SES

1. Se adicionaron 150 μ l de Sol. Glucosada al 5% en la columna 12, de la fila "B" a la "H".
2. Después se adicionaron 150 μ l de SES en la columna 12, fila "A" y "B".
3. A partir de la fila "B" se tomaron 150 μ l de la dilución, transfiriendo a la fila, "C" se mezcló y se realizó sucesivamente lo mismo en las siguientes filas hasta la fila "G", en donde se desecharon los últimos 150 μ l.
4. Posteriormente se adicionaron 150 μ l de sangre de la fila "A" a la "H".

NOTA: A partir del paso 5 y 6 se sigue de la misma manera antes descrita.

6.8 Preparación de diluciones con Solución Salina Fisiológica 0.9%, Solución Hartmann y Solución Glucosada al 5% mas SES con pH neutro.

Se prepararon 100 ml de cada una de las soluciones con dilución 1:8 de la siguiente manera:

1. Se realizaron las diluciones en la Campana de Flujo Laminar Horizontal para tener un ambiente estéril y no contaminar las soluciones de trabajo.
2. Se agregaron 87.5 ml de SSF, Sol. Hartmann y Sol. Glucosada al 5%, y 12.5 ml de SES con pH neutro en tubos cónicos estériles de 50 ml.
3. Posteriormente se procedieron a homogenizar perfectamente las soluciones mediante inversión de los tubos cónicos para finalmente sellarlos con papel parafilm.
4. Guardar en refrigeración a 4 °C.

6.9 Biometría Hemática

Primeramente cada muestra de sangre se racionó en dos partes iguales para poder realizar la Biometría Hemática con sangre no tratada y tratada con SES de pH neutro. Las muestras de sangre no tratadas se procesaron de manera común; pero; las muestras tratadas fueron sometidas a una dilución con SSF mas SES de pH neutro (a partir de la solución preparada en el apartado 6.8), posteriormente se continuo con el procedimiento común de cada técnica, y finalmente se multiplico el resultado obtenido por la dilución realizada con SSF mas SES.

NOTA: Los volúmenes de sangre en cada muestra fueron distintos, por lo que se realizaron diferentes diluciones con SES y SSF.

La Biometría Hemática incluye los siguientes componentes: Cuenta de eritrocitos, Hematocrito, Hemoglobina, Cuenta de leucocitos, Recuento diferencial de leucocitos y Cuenta de plaquetas.

6.9.1 Cuenta de eritrocitos

1. Con la boquilla y la pipeta de Thoma para glóbulos rojos se aspiró sangre hasta la marca 0.5, evitando la formación de burbujas.
2. Con una gasa se limpió el exceso de sangre de la parte externa de la pipeta.
3. Posteriormente se aspiró el diluyente de Hayem hasta la marca 101 de la pipeta, evitando la formación de burbujas. Se genera una dilución de la muestra de 1:200.
4. Se sellaron los extremos de la pipeta con papel parafilm y se mezcló el contenido de la pipeta durante 1 minuto en el agitador para pipetas de Thoma.
5. Después se desecharon las 4 o 5 primeras gotas de la pipeta.
6. Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se llenó por capilaridad.
7. Se dejó en reposo 1 o 2 minutos con el fin de que los eritrocitos sedimentaran, seguidamente se colocó la cámara de Neubauer bajo el objetivo seco débil (10X) y enseguida enfocar con seco fuerte (40X).
8. El recuento se realizó en los cuadros más pequeños de la cámara, contando los hematíes localizados en los 4 cuadros de los extremos y en el del centro, haciendo un total de 5 cuadros. (Ver ilustración 13)
9. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de eritrocitos presentes:

Eritrocitos contabilizados X 10,000 = Numero de eritrocitos/ mm³

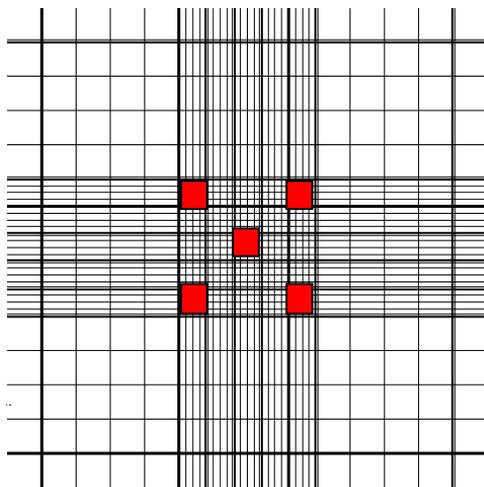


Ilustración 13. Cuadrantes de la cámara de Neubauer (marcados en rojo) donde se realiza el conteo de glóbulos rojos.

6.9.2 Hematocrito

1. Se llenó un capilar de 75 mm hasta $\frac{3}{4}$ partes por capilaridad con sangre perfectamente homogeneizada.
2. Posteriormente, se selló a la llama del mechero la punta del tubo capilar, evitando quemar el paquete globular.
3. Se centrifugó el capilar durante 5 min. a 10,000 rpm
4. Una vez terminada la centrifugación se observaron tres segmentos del capilar claramente diferenciados (Ver ilustración 14):
 - ✓ La parte superior, de un color amarillento, perteneció al plasma.
 - ✓ En la interface, de color blanco, correspondió a las plaquetas y leucocitos.
 - ✓ La parte inferior, de un color rojo oscuro, perteneció a los glóbulos rojos.
5. Finalmente con una regla se midió en mm el volumen total de glóbulos rojos y el volumen total de plasma más glóbulos rojos, y así utilizar la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de hematocrito} = \frac{\text{Volumen de eritrocitos (mm)}}{\text{Volumen total de plasma + globulos rojos (mm)}} \times 100$$

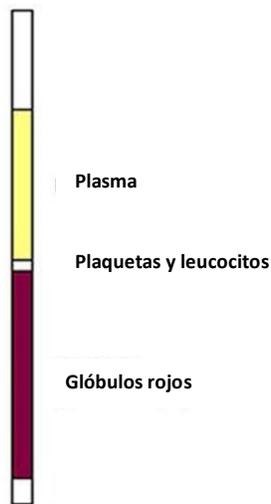


Ilustración 14. Segmentos obtenidos en capilar después de la centrifugación en la prueba de hematocrito.

6.9.3 Hemoglobina: Método de la cianometahemoglobina

Para la determinación de hemoglobina se utilizó el espectrofotómetro COLEMAN-JUNIOR® II modelo 620.

1. Primeramente se prendió el espectrofotómetro para que alcanzara la temperatura adecuada para su funcionamiento.
2. Se dispensaron exactamente 5ml de reactivo de Drabkin en 2 tubos de ensayo, rotulados uno como Blanco (B) y el otro como Problema (P).
3. Posteriormente se homogenizó perfectamente la muestra sanguínea.
4. Se procedió a aspirar exactamente 20 μ L (0.02 ml) de sangre con la pipeta de Salhi, y con una gasa se limpio el exceso de sangre de la parte externa de la pipeta.
5. Se introdujo la pipeta hasta el fondo del tubo de ensayo con reactivo de Drabkin para depositar la sangre, así mismo se procuro lavar las paredes internas de la pipeta mediante aspiraciones y expulsiones consecutivas de reactivo evitando la formación de burbujas.
6. Se tapó el tubo con papel parafilm y homogenizo la preparación en un vórtex.
7. A continuación se incubo 3 minutos a temperatura ambiente.
8. Después se transfirió la solución a las celdas del espectrofotómetro para su lectura la cual se realizó de la siguiente manera:
 - b. Se selecciono el haz de luz a 540 nm.
 - c. Se sitúo en una celda de lectura el reactivo del tubo “Blanco” y ajusto el aparato a “0” de absorbancia.
 - d. En otra celda se colocó el reactivo con la muestra “problema” y se procedió a leer la absorbancia obtenida.
9. Finalmente se calculó la concentración de hemoglobina utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Hemoglobina en mg/dl} = \text{Absorbancia problema} \times 36.8$$

Nota. Se usa el factor 36.8 (que resulta de considerar el coeficiente de extinción de la molécula)

6.9.4 Cuenta de leucocitos

1. Con la boquilla y la pipeta de Thoma para glóbulos blancos se aspiró sangre hasta la marca 0.5, evitando la formación de burbujas.
2. Se limpió cuidadosamente con una gasa el exceso de sangre de la parte externa de la pipeta.
3. Posteriormente se aspiró el reactivo de Turk hasta la marca 11 de la pipeta, evitando la formación de burbujas. Con ello se genera una dilución 1:20
4. Se sellaron los extremos de la pipeta con papel parafilm y se mezcló el contenido durante 1 minuto en el agitador para pipetas de Thoma.
5. Se procedió a desechar las 4 o 5 primeras gotas de la pipeta.
6. Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se llenó por capilaridad.
7. Seguidamente se dejó en reposo 1 o 2 minutos para que se asentaran los leucocitos.
8. Se contaron las células con el objetivo 10X en las cuatro cuadrículas primarias (Ver ilustración 15).
9. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes como se indica:

$$\text{Leucocitos contabilizados} \times 50 = \text{Numero de leucocitos/mm}^3$$

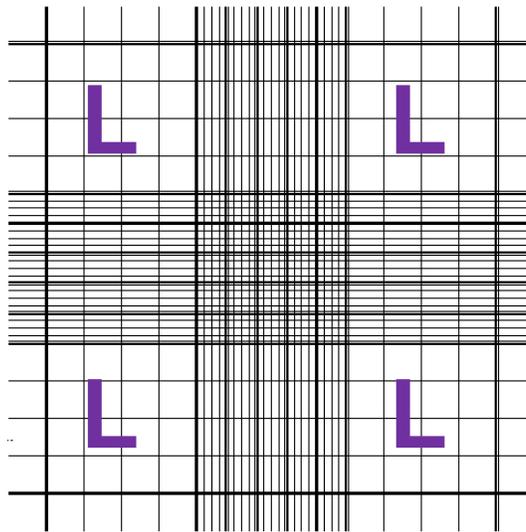


Ilustración 15. Cuadrantes primarios de la cámara de Neubauer (señalados con letra "L" en morado) donde se realiza en conteo de glóbulos blancos.

6.9.5 Recuento diferencial de leucocitos

1. Empleando una pipeta Pasteur, se depositó una pequeña gota de sangre en el extremo de un portaobjetos totalmente limpio.
2. Con el borde de otro portaobjetos a 20 o 30 grados se tocó la gota y espero a que la sangre se distribuyera por capilaridad en el extremo del portaobjetos extensor y se deslizó suave y firme sobre el otro portaobjetos, en sentido longitudinal hasta que la gota quedara bien extendida sobre la superficie del primer portaobjetos.
3. Se dejó secar el frotis para posteriormente teñirlo el de la siguiente manera:
 - a. Se cubrió el frotis totalmente con colorante de Wright durante 7 minutos, cuidando que el colorante no seicara.
 - b. Sin tirar el colorante se agregó agua destilada hasta la formación de una película metálica y se dejó actuar durante 15 minutos.
 - c. Posteriormente se enjuagó con agua corriente y dejó secar.
4. Después se agregó una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio con el objetivo de 100x.
5. A continuación se realizó un recuento de 100 células blancas con ayuda de un contador mecánico.
6. Se evaluó la morfología de eritrocitos, leucocitos y plaquetas para reportar anomalías.
7. Finalmente se obtuvo el porcentaje de células observadas.

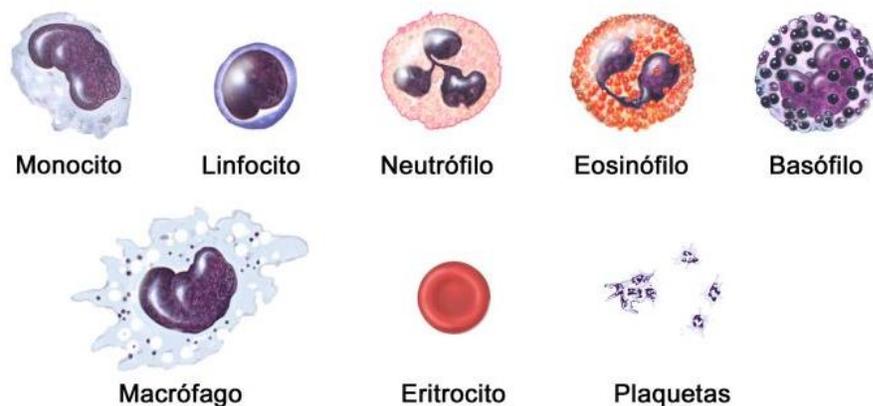


Ilustración 16. Células sanguíneas encontradas dentro de un frotis sanguíneo.

6.9.6 Cuenta de plaquetas

1. Con la boquilla y la pipeta de Thoma para glóbulos rojos se aspiró sangre hasta la marca de 1.0, evitando la formación de burbujas.
2. Se limpió cuidadosamente con una gasa el exceso de sangre de la parte externa de la pipeta.
3. Se procedió a aspirar oxalato de amonio al 1% hasta la marca 101 de la pipeta, evitando la formación de burbujas.
4. A continuación se sellaron los extremos de la pipeta con papel parafilm para mezclar el contenido durante 1 minuto en el agitador para pipetas de Thoma.
5. Se desecharon las 4 o 5 primeras gotas de la pipeta.
6. Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se llenó por capilaridad, evitando llenar en exceso o formación de burbujas.
7. Posteriormente se colocó la cámara de Neubauer ya cargada en el interior de una caja de Petri, con papel filtro humedecido en agua para evitar la evaporación y se dejó en reposo de 10 a 15 minutos.
8. Se observó al microscopio con el objetivo 40X ubicando la cuadrícula central (Ver ilustración 17). Las plaquetas se observan más pequeñas que los hematíes, redondas, alargadas u ovals, altamente refringentes
9. Finalmente se realizaron los cálculos correspondientes como se indica:

No. De plaquetas / μ l= No de plaquetas contadas X factor de **dilución (100)** X factor de corrección de volumen (10)= No de plaquetas contadas X 1000.

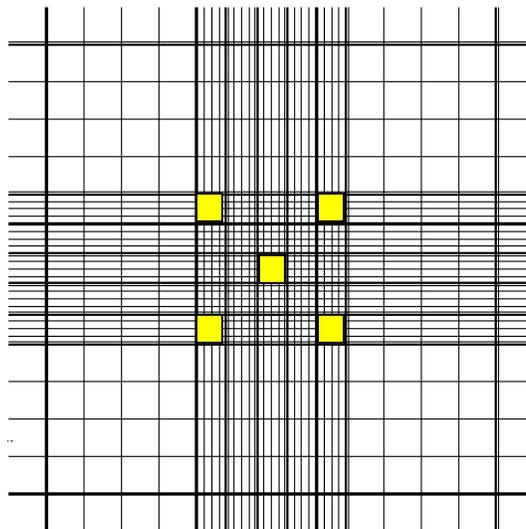


Ilustración 17. Cuadrantes de la cámara de Neubauer (marcados en amarillo) donde se realiza el conteo plaquetario.

6.10 Prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (*LAL*) por el método Gel-Clot.

1. Se realizó la prueba a las siguientes soluciones:
 - SES dilución 1:8 (triplicado)
 - SES concentrada
 - SSF (Solución Salina Fisiológica)
 - SH (Solución Hartmann)
 - SG (Solución Glucosada)
 - Agua de grifo
 - Control positivo (amebocitos con agua inyectable y endotoxina)
 - Control negativo (amebocitos suspendidos en agua inyectable)
2. Se agregó a cada tubo de 10 x 75 mm (libre de pirógenos) 100 µl de cada solución a evaluar.
3. Posteriormente se agregaron 100 µl de amebocitos en suspensión.
4. Se procedió a mezclar ligeramente de tal forma que no hubiera aparición de burbujas.
5. Para el control positivo se agregaron 100 µl de amebocitos y 100 µl de endotoxina (*E. coli* O 055).
6. Para el control negativo se agregaron 100 µl de amebocitos y 100 µl de agua inyectable.
7. Se mezclaron ambos controles cuidadosamente, para que no hubiera aparición de burbujas y no se lisaran los amebocitos.
8. Finalmente se llevó la serie de tubos perfectamente tapados a la estufa y se incubaron por un periodo de 1 hora a 37°C.
9. Al cabo de ese tiempo se procedió a la lectura cualitativa, inclinando el tubo para observar lo siguiente:
 - Formación de un gel solido indica presencia de endotoxinas.
 - Ausencia de gel solido indica inexistencia de endotoxinas.

7. Resultados

7.1 Determinación de pH, ORP y ppm de SSF, SG, SH y SES.

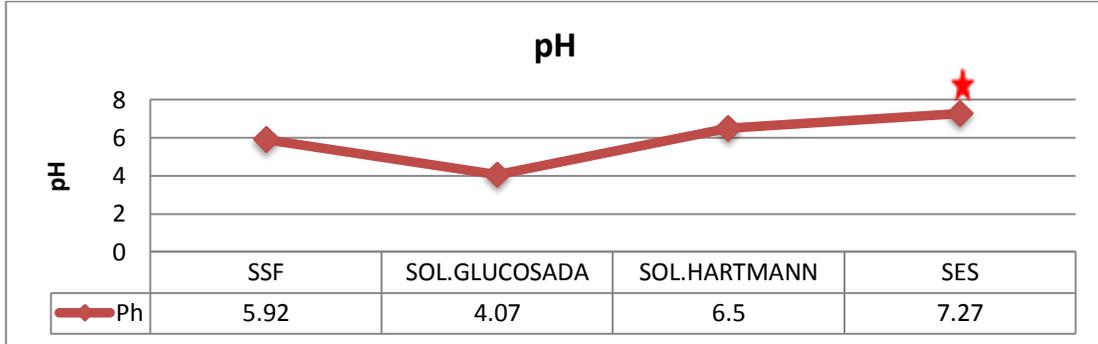


Gráfico 1. Determinación de pH de cada solución. Nótese que el pH de la SES (estrella roja) comparada con las otras soluciones llega a la neutralidad.

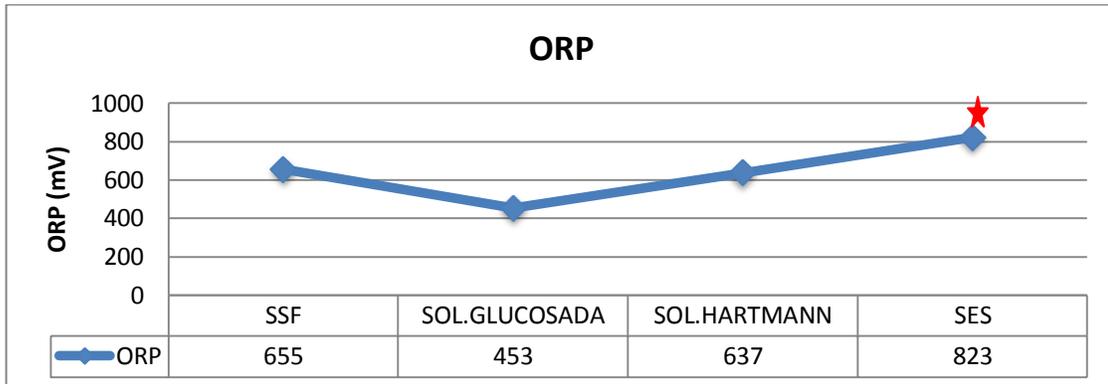


Gráfico 2. Determinación de ORP en SSF, SG, SH y SES. Obsérvese que el ORP de la SES (estrella roja) tiene mayor poder oxidativo que las otras soluciones.

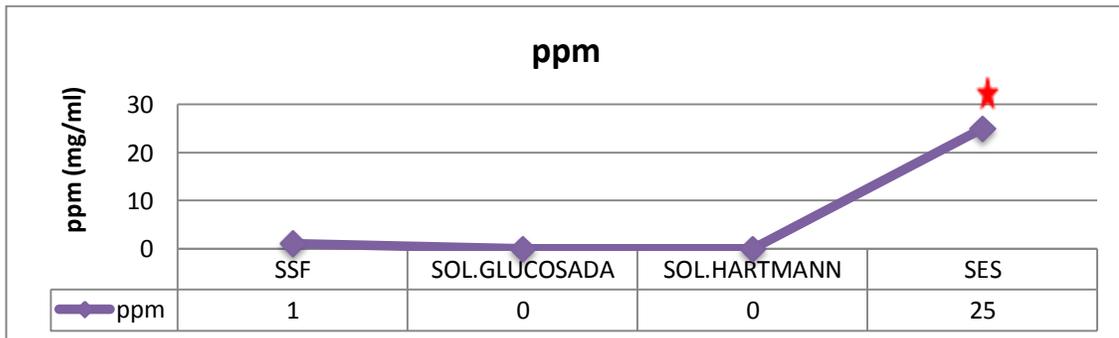


Gráfico 3. Determinación de ppm de cloro en SSF, SG, SH y SES. Nótese que las ppm de la SES (estrella roja) comparada con las demás soluciones es elevada.

7.2 Determinación de ORP, pH y ppm de SSF con SES.

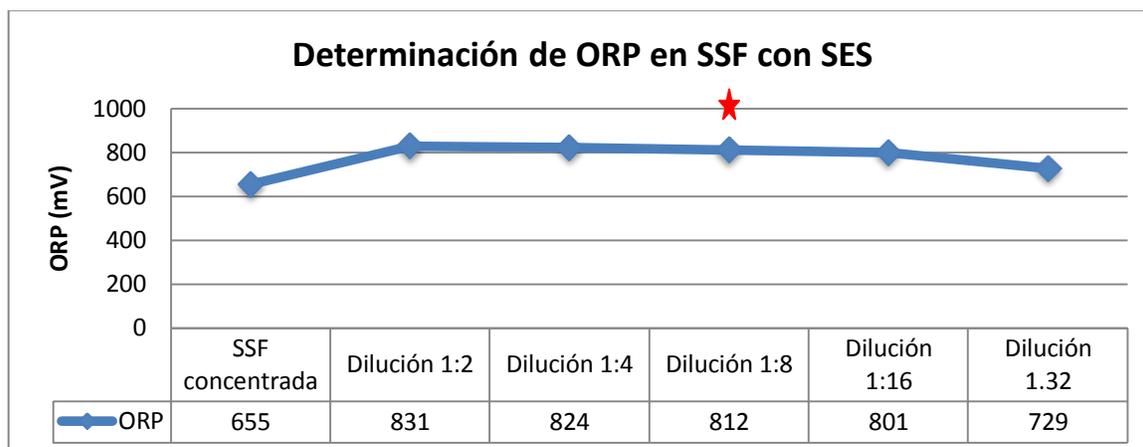


Gráfico 4. Determinación de ORP de SSF con SES a diferentes diluciones. Obsérvese que en la dilución 1:8 (estrella roja) se obtiene un ORP de 812, con ello se busca mantener un equilibrio no lítico y microbicida.

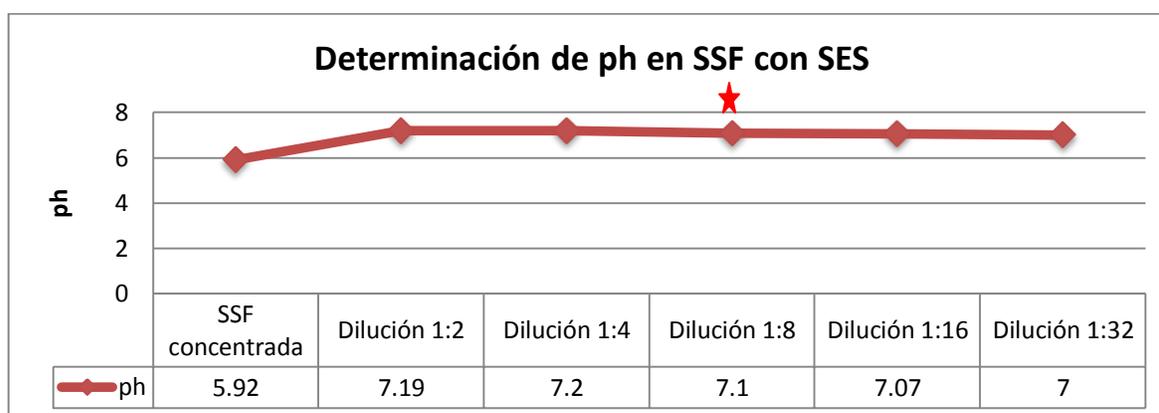


Gráfico 5. Determinación de pH de SSF con SES a diferentes diluciones. Obsérvese que con la dilución 1:8 (estrella roja) aun se mantiene el pH neutro.

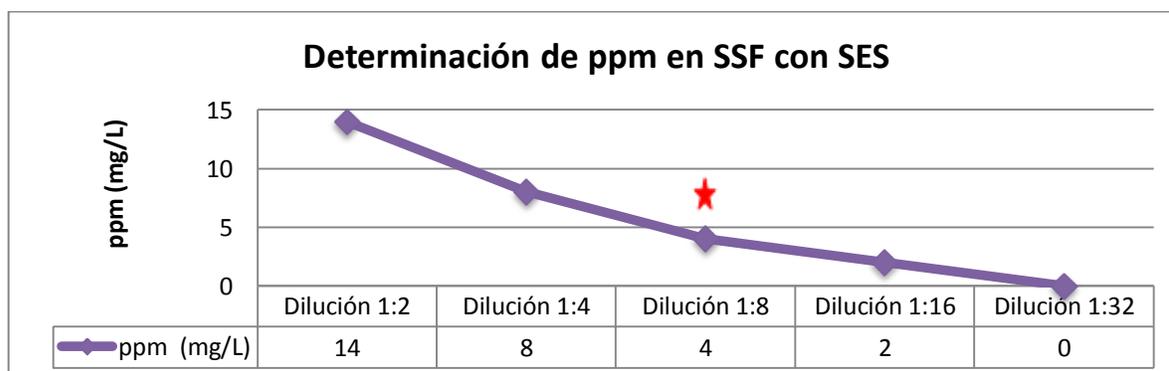


Gráfico 6. Determinación de ppm de cloro total en SSF con SES a distintas diluciones.

7.3 Determinación de ORP, pH y ppm de SH con SES.

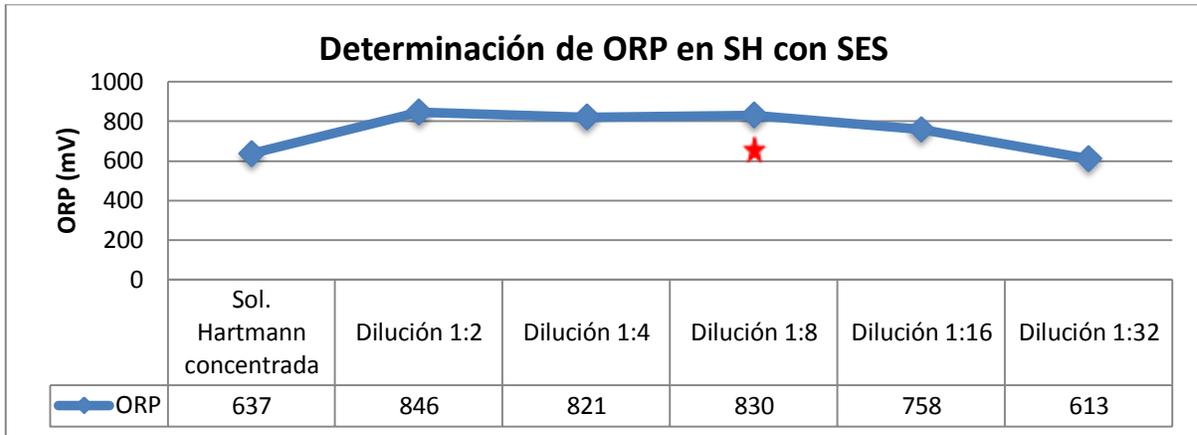


Gráfico 7. Determinación de ORP de SH con SES a diferentes diluciones. Nótese que con la dilución 1:8 aumenta el ORP a 830 mV.

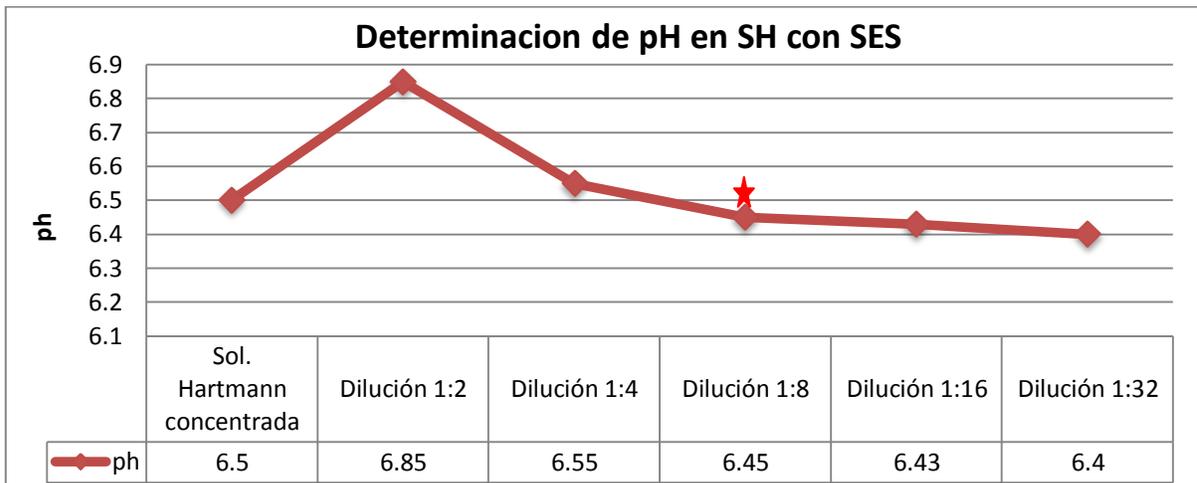


Gráfico 8. Determinación de pH de SH con SES a distintas diluciones. Nótese que el pH a dilución 1:8 (estrella roja) el pH aun permanece neutro.

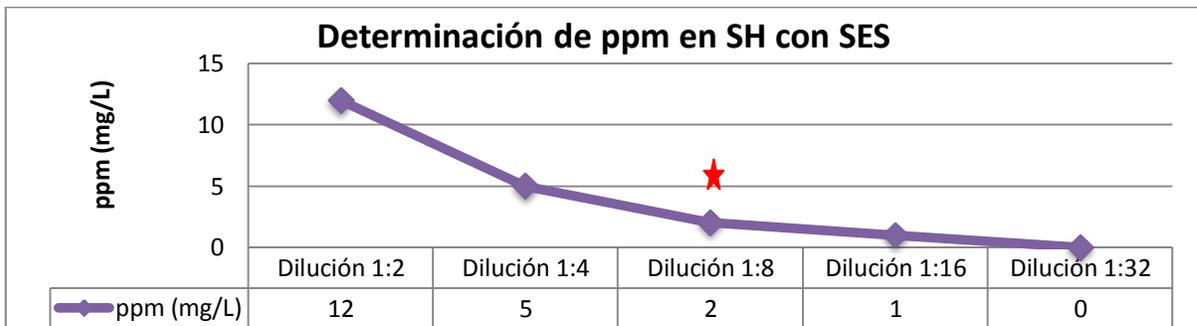


Gráfico 9. Determinación de ppm de cloro total en SH con SES a distintas diluciones.

7.4 Determinación de ORP, pH y ppm de SG con SES.

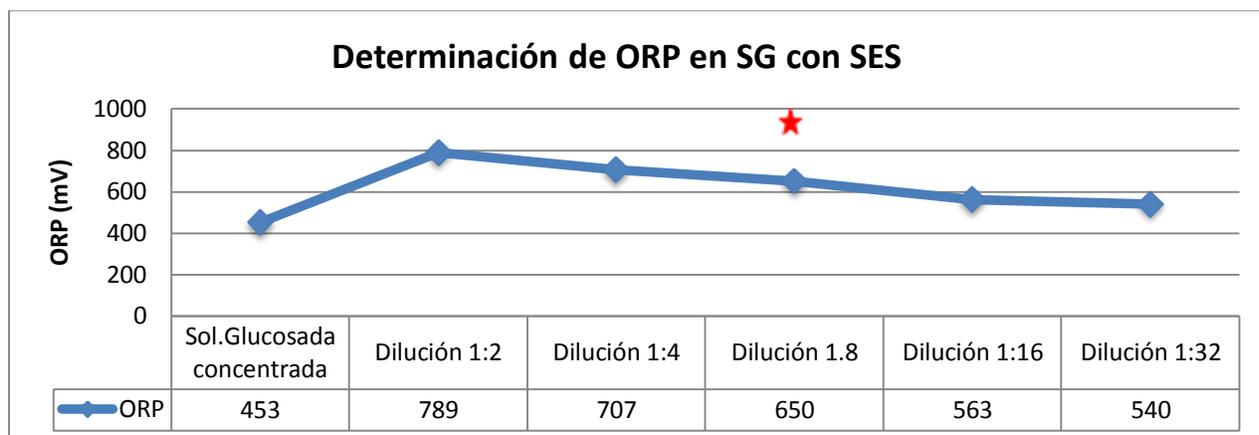


Gráfico 10. Determinación de ORP de SG a diferentes diluciones. Nótese que la dilución 1:8 no tiene un elevado ORP.

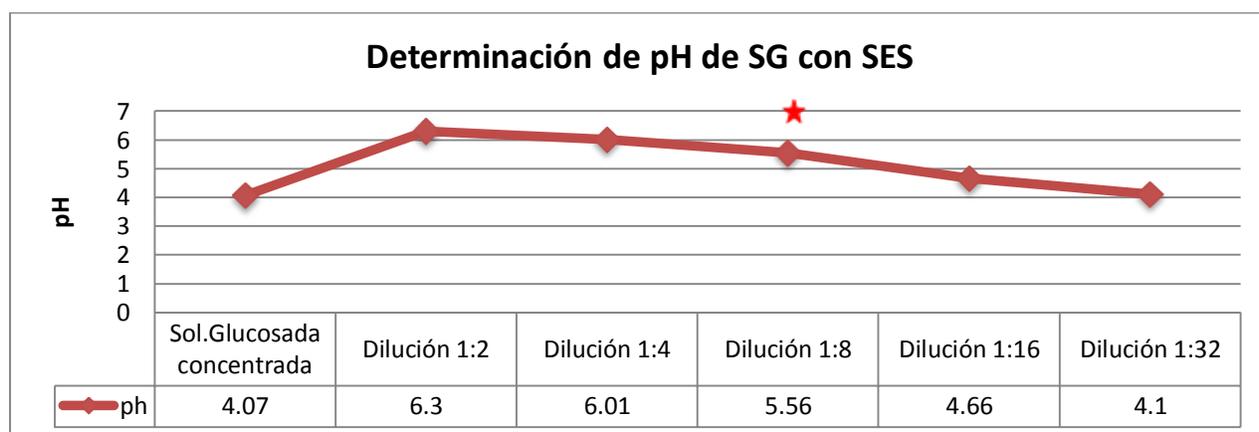


Gráfico 11. Determinación de pH de SG con SES a diferentes diluciones. Obsérvese que el pH de todas las soluciones no es neutro.

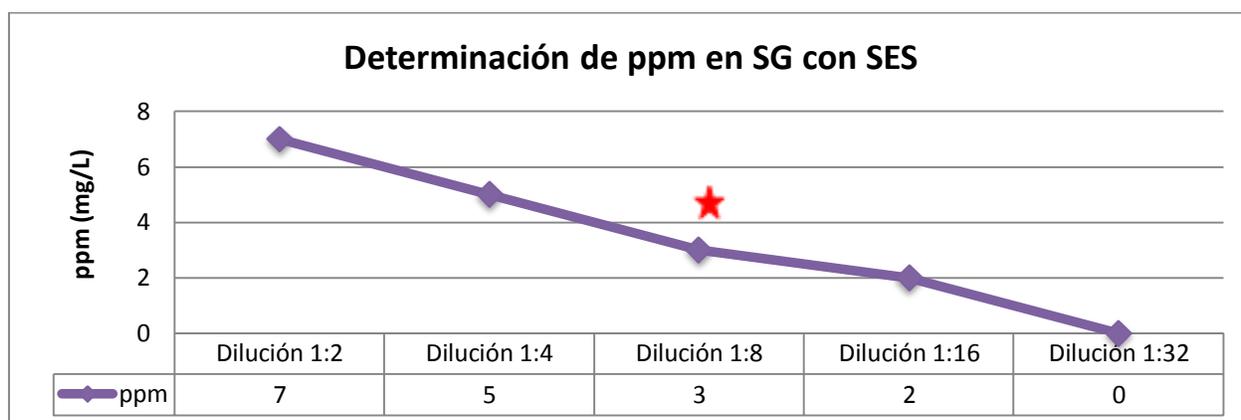


Gráfico 12. Determinación de ppm de cloro total en SG con SES a diferentes diluciones.

7.5 Reto microbiano *Escherichia coli* y *S.aureus* vs VeteriBac® mascotas

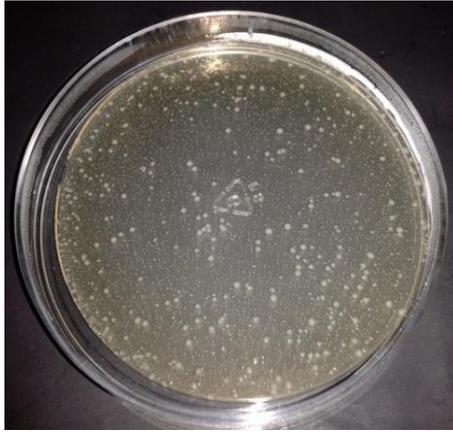


Foto 1. Resultado de la cuenta viable inicial de *E. coli* ATCC 11229. Nótese el crecimiento de las UFC

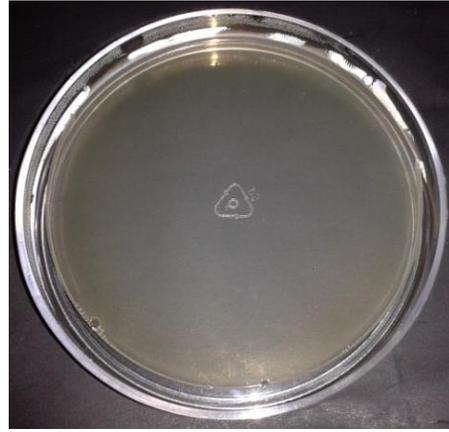


Foto 2. Resultado del reto VeteriBac® mascotas vs *E. coli* ATCC 11229. Obsérvese que no hay presencia de UFC.



Foto 3. Resultado del control del medio para métodos estándar. Nótese que no existe crecimiento de UFC.



Foto 4. Resultado de la cuenta viable inicial de *S. aureus* ATCC 6538. Nótese el abundante crecimiento de UFC



Foto 5. Resultado del reto VeteriBac® mascotas vs *S. aureus* ATCC 6538. Obsérvese que no hay presencia de UFC.

7.5.1 Determinación del porcentaje de reducción de *E. coli*

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

Donde: S = células sobrevivientes UFC/ml

C.V. = cuenta viable inicial

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{0 \times 100}{150,000,000} = 99.999\%$$

7.5.2 Determinación del porcentaje de reducción de *S. aureus*

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

Donde: S = células sobrevivientes UFC/m

C.V. = cuenta viable inicial

Cálculos:

$$20.5 \times 10 \left(\frac{205 \text{ UFC}}{100 \cancel{\mu\text{l}}} \right) \left(\frac{1000 \cancel{\mu\text{l}}}{1 \text{ ml}} \right) = 2050 \text{ UFC/ml}$$

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{2050 \times 100}{136,000,000} = 99.998\%$$

7.6 Reto microbiano *S.aureus* vs VeteriBac® mascotas (SES)+SSFE dilución 1:8



Foto 6. Resultado de la cuenta viable inicial de *S. aureus* ATCC 6538. Nótese el abundante crecimiento de UFC



Foto 7. Resultado del reto VeteriBac® mascotas (SES) + SSFE vs *S. aureus* ATCC 6538. Obsérvese que hay ligero crecimiento de UFC comparado con la cuenta viable inicial.



Foto 8. Resultado del control del medio para métodos estándar. Nótese que no existe crecimiento de UFC

7.6.1 Determinación del porcentaje de reducción de *S. aureus*

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V}$$

Donde: S = células sobrevivientes UFC/m

C.V. = cuenta viable inicial

Cálculos:

$$186 \times 10 \left(\frac{1860 \text{ UFC}}{100 \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \right) = 18,600 \text{ UFC/ml}$$

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{18600 \times 100}{124,000,000} = 99.985\%$$

7.7 Prueba de lisis en placa

7.7.1 SSF con SES

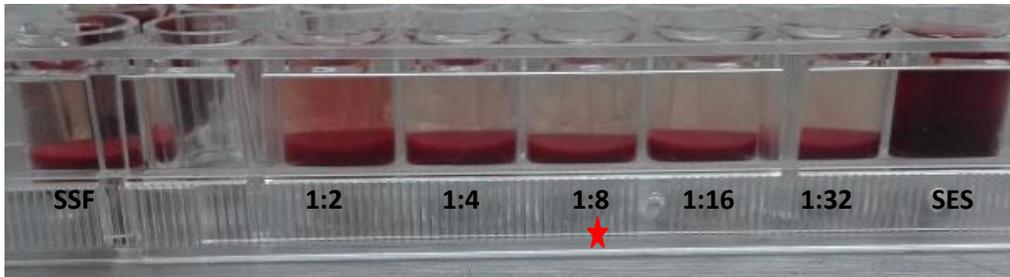


Foto 9. Resultado de la prueba de lisis de SSF con SES a distintas diluciones. Nótese que a partir de la dilución 1:4 no hay presencia de lisis comparativamente con la SES [] y 1:2.

7.7.2 SH con SES

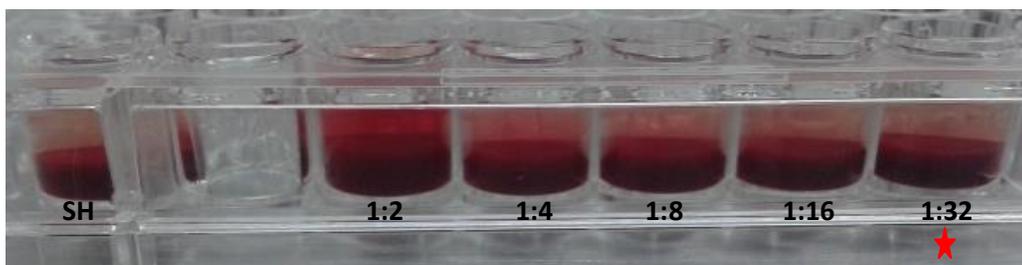


Foto 10. Resultado de la prueba de lisis de Sol. Hartmann con SES a distintas diluciones. Nótese que hay una ligera presencia de lisis a partir de la dilución 1:16 hasta 1:2 comparativamente con 1:32.

7.7.3 SG con SES

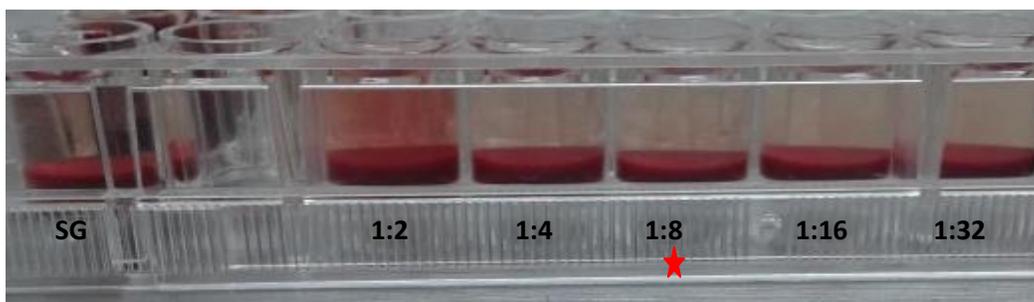


Foto 11. Resultado de la prueba de lisis de Sol. Glucosada al 5% con SES a distintas diluciones. Nótese que no hay presencia de lisis a partir de la dilución 1:4 y hasta 1:32.

7.8 Observación macro y microscópica de sangre con SSF, SH y SG con SES dilución 1:8.

7.8.1 SSF con SES dilución 1:8



Foto 12. Vista macroscópica en tubo de SSF con SES dilución 1:8. Obsérvese que no hay presencia lisis y/o aglutinación

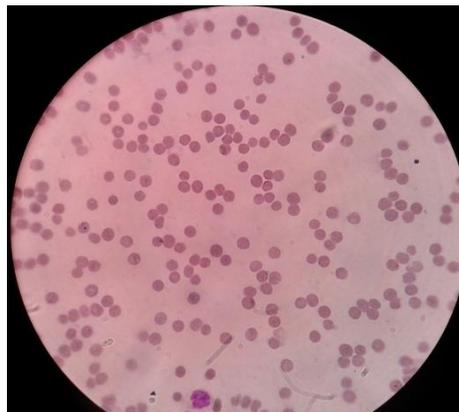


Foto 13. Vista al microscopio (100X) de SSF con SES dilución 1:8 donde se observan a los eritrocitos sin ninguna alteración morfológica

7.8.2 SG con SES dilución 1:8



Foto 14. Vista macroscópica en tubo de Sol. Glucosada al 5% con SES dilución 1:8 donde se observa la precipitación de glóbulos rojos.

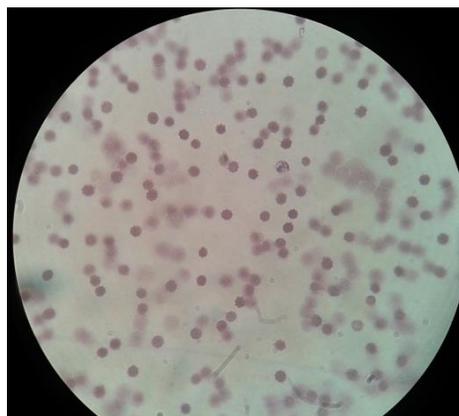


Foto 15. Vista al microscopio (100X) de la Sol. Glucosada al 5% con SES dilución 1:8. Nótese la presencia de crenación.

7.8.3 SH con SES dilución 1:8



Foto 16. Vista macroscópica en tubo de la Sol. Hartmann con SES dilución 1:8 donde se observa hemólisis y la aparición de coágulo.

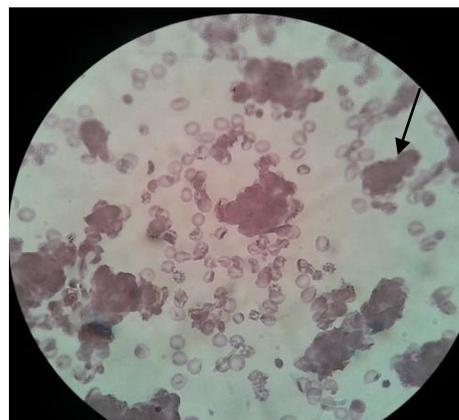


Foto 17. Vista al microscopio (100X) de la Sol. Hartmann con SES dilución 1:8. La flecha indica el efecto de hemólisis de glóbulos rojos y aglutinación de los mismos.

7.9 HEMOGRAMA

Valores normales de laboratorio

Valores relativos y absolutos de leucocitos caninos y felinos

Hemograma							
Estudio	Unidades	Caninos		Felinos			
Hematocrito	0	35 - 55		30 - 45			
Eritrocitos	$\times 10^6/\text{mm}^3$	5 - 8		5 - 10			
Leucocitos	$\times 10^3/\text{mm}^3$	5 - 15		5 - 14			
Hemoglobina	g/dl	12 - 18		8 - 15			
Plaquetas	$\times 10^3/\text{mm}^3$	120 - 500		150 - 600			
V.C.M	Fl	64 - 75		42 - 53			
Hb.C.M	%	19.5 - 24.5		12.5 - 17.5			
C.Hb.C.M	g/dl	33 - 36		30 - 34			
Valores relativos y absolutos de leucocitos caninos							
	Recuento total ($\times \text{mm}^3$)	Neutrófilos		Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
		Segmentados	En banda				
Absoluto	7.000 - 14.000	3.000 - 11.000	0 - 300	100 - 1000	< 100	1.000 - 5.000	< 1.200
Relativo	100 %	60 - 77 %	0 - 3 %	2 - 7 %	0 - 1 %	15 - 35 %	2 - 7 %
Valores relativos y absolutos de leucocitos felinos							
	Recuento total ($\times \text{mm}^3$)	Neutrófilos		Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
		Segmentados	En banda				
Absoluto	6.000 - 17.000	3.000 - 9.500	0 - 300	100 - 1000	< 100	1.000 - 5.000	< 500
Relativo	100 %	60 - 77 %	0 - 3 %	2 - 7 %	0 - 1 %	15 - 35 %	2 - 5 %

Copyright © 2003-2013 Laboratorio Diagnostest
 Todos los derechos reservados. Prohibida su reproducción parcial o total
<http://www.labdiagnostest.com>

Tabla 2. Valores hematológicos de referencia en caninos adultos aparentemente sanos, obtenidos del Centro de Inmunoterapia Veterinaria.

7.9.1 CUENTA LEUCOCITARIA

VALOR DE REFERENCIA: 5 – 15 X10³/mm³

No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción celular	No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción celular
1	7.0 X10 ³ /mm ³	6.8 X10 ³ /mm ³	2.85%	16	10.5 X10 ³ /mm ³	10.0 X10 ³ /mm ³	4.76%
2	8.5 X10 ³ /mm ³	8.3 X10 ³ /mm ³	2.35%	17	12.5 X10 ³ /mm ³	12.0 X10 ³ /mm ³	4.00%
3	5.6 X10 ³ /mm ³	5.5 X10 ³ /mm ³	1.78%	18	18.75 X10 ³ /mm ³	18.4 X10 ³ /mm ³	1.86%
4	8.10 X10 ³ /mm ³	8.0 X10 ³ /mm ³	1.23%	19	15.5 X10 ³ /mm ³	14.8 X10 ³ /mm ³	4.51%
5	1.9 X10 ³ /mm ³	1.8 X10 ³ /mm ³	5.26%	20	7.5 X10 ³ /mm ³	7.1 X10 ³ /mm ³	5.33%
6	6.3 X10 ³ /mm ³	6.0 X10 ³ /mm ³	4.76%	21	14.2 X10 ³ /mm ³	14.0 X10 ³ /mm ³	1.40%
7	7.15 X10 ³ /mm ³	6.9 X10 ³ /mm ³	3.49%	22	22.2 X10 ³ /mm ³	21.5 X10 ³ /mm ³	3.15%
8	8.9 X10 ³ /mm ³	8.7 X10 ³ /mm ³	2.24%	23	8.85 X10 ³ /mm ³	8.5 X10 ³ /mm ³	3.95%
9	14.50 X10 ³ /mm ³	14.2 X10 ³ /mm ³	2.06%	24	6.65 X10 ³ /mm ³	6.3 X10 ³ /mm ³	5.26%
10	7.20 X10 ³ /mm ³	7.0 X10 ³ /mm ³	2.77%	25	8.10 X10 ³ /mm ³	7.80 X10 ³ /mm ³	3.70%
11	11.5 X10 ³ /mm ³	10.0 X10 ³ /mm ³	4.34%	26	8.65 X10 ³ /mm ³	8.30 X10 ³ /mm ³	4.04%
12	22.0 X10 ³ /mm ³	21.0 X10 ³ /mm ³	4.54%	27	15.0 X10 ³ /mm ³	14.5 X10 ³ /mm ³	3.33%
13	13.45 X10 ³ /mm ³	13.0 X10 ³ /mm ³	3.34%	28	20.5 X10 ³ /mm ³	19.50 X10 ³ /mm ³	4.87%
14	10.25 X10 ³ /mm ³	9.8 X10 ³ /mm ³	4.39%	29	9.75 X10 ³ /mm ³	9.3 X10 ³ /mm ³	4.61%
15	16.0 X10 ³ /mm ³	15.5 X10 ³ /mm ³	3.12%	30	14.5 X10 ³ /mm ³	13.9 X10 ³ /mm ³	4.13%

Tabla 3. Resultados de cuenta leucocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES y porcentaje de disminución.

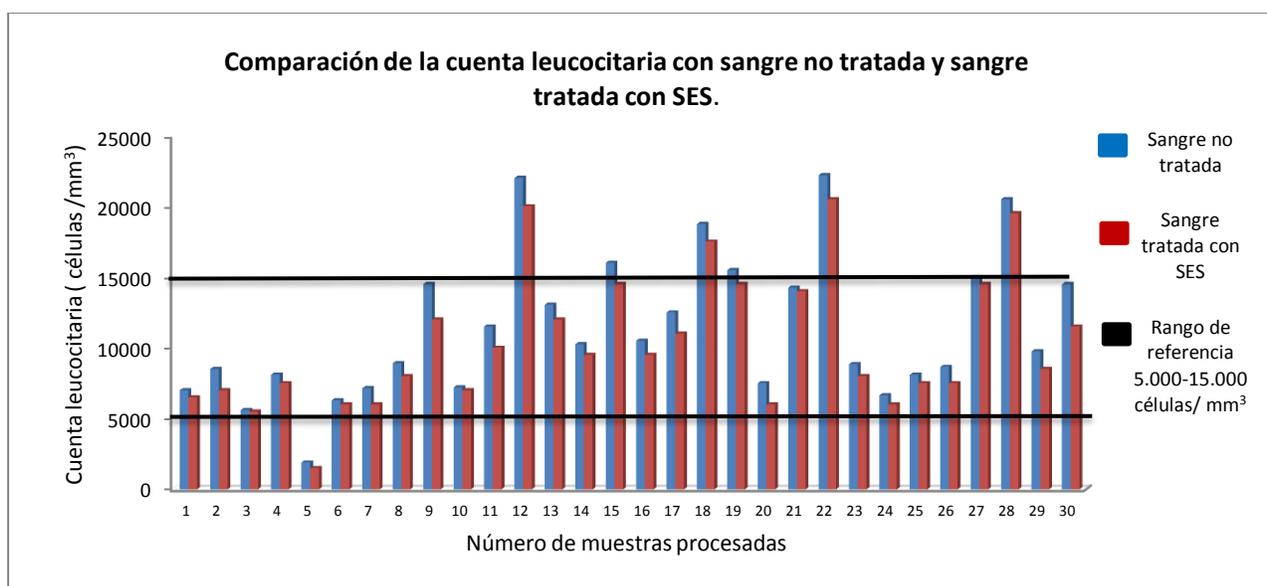


Gráfico 13. Comparación de la cuenta leucocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES. Obsérvese que la mayoría de las muestras se encuentran dentro del rango de referencia establecido.

7.9.2 CUENTA ERITROCITARIA

VALOR DE REFERENCIA: $5.50-8.50 \times 10^6/\text{mm}^3$

No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción celular	No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción celular
1	$6.29 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.10 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.02%	16	$8.84 \times 10^6/\text{mm}^3$	$8.80 \times 10^6/\text{mm}^3$	0.45%
2	$5.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5.50 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.78%	17	$8.20 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.90 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.65%
3	$4.26 \times 10^6/\text{mm}^3$	$4.10 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.75%	18	$6.15 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5.90 \times 10^6/\text{mm}^3$	4.06%
4	$6.28 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.00 \times 10^6/\text{mm}^3$	4.45%	19	$6.39 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.10 \times 10^6/\text{mm}^3$	4.53%
5	$2.77 \times 10^6/\text{mm}^3$	$2.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	6.13%	20	$5.68 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.40%
6	$8.46 \times 10^6/\text{mm}^3$	$8.20 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.07%	21	$6.43 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.20 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.57%
7	$5.90 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5.80 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.69%	22	$7.10 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.90 \times 10^6/\text{mm}^3$	2.81%
8	$7.83 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	2.93%	23	$8.01 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.80 \times 10^6/\text{mm}^3$	2.51%
9	$6.39 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.10 \times 10^6/\text{mm}^3$	4.53%	24	$7.85 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.70 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.91%
10	$9.52 \times 10^6/\text{mm}^3$	$9.40 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.26%	25	$6.64 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.40 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.61%
11	$6.53 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.30 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.52%	26	$5.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5.50 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.78%
12	$9.46 \times 10^6/\text{mm}^3$	$9.30 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.69%	27	$7.36 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.00 \times 10^6/\text{mm}^3$	4.89%
13	$7.86 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	3.30%	28	$7.77 \times 10^6/\text{mm}^3$	$7.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	2.18%
14	$6.80 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.70 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.47%	29	$5.67 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5.50 \times 10^6/\text{mm}^3$	2.99%
15	$3.97 \times 10^6/\text{mm}^3$	$3.80 \times 10^6/\text{mm}^3$	4.28%	30	$6.60 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6.50 \times 10^6/\text{mm}^3$	1.51%

Tabla 4. Resultados de cuenta eritrocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES.

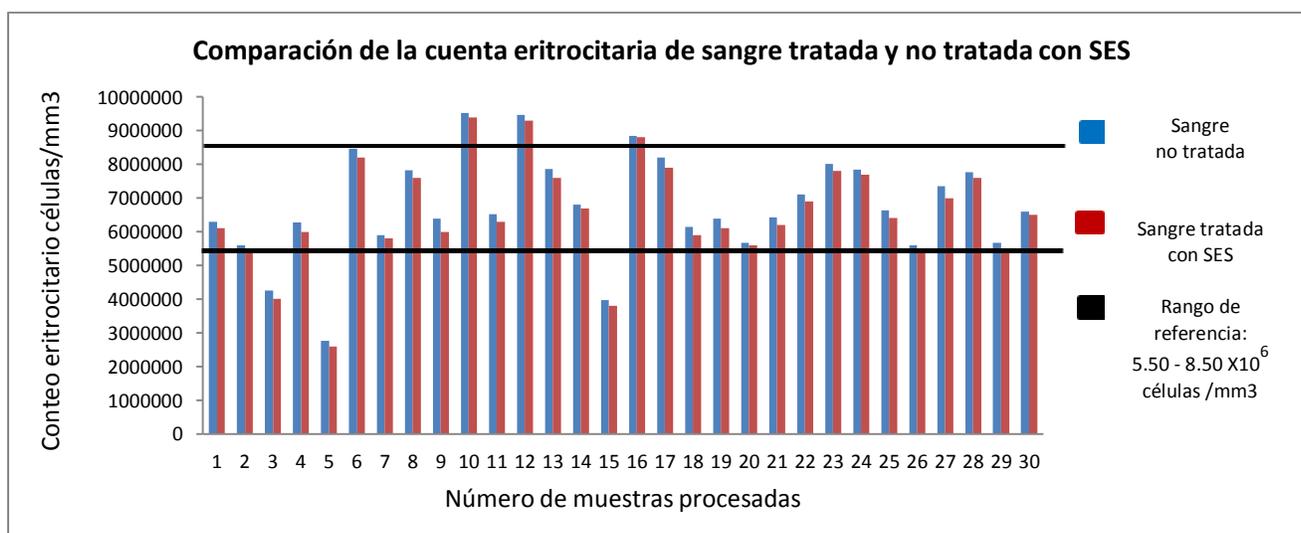


Gráfico 14. Comparación de la cuenta eritrocitaria de sangre canina no tratada y tratada con SES. Véase que la mayor proporción de muestras caen dentro del rango establecido.

7.9.3 HEMOGLOBINA

VALOR DE REFERENCIA: 12-18 g/dl

No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción	No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción
1	16.56 g/dl	16.00 g/dl	3.38%	16	20.6 g/dl	19.87 g/dl	3.54%
2	15.82 g/dl	15.08 g/dl	4.67%	17	17.66 g/dl	16.90 g/dl	4.30%
3	10.30 g/dl	9.93 g/dl	3.59%	18	13.61 g/dl	12.88 g/dl	5.36%
4	12.88 g/dl	12.40 g/dl	3.72%	19	11.04 g/dl	10.9 g/dl	1.26%
5	7.36 g/dl	6.99 g/dl	5.02%	20	17.66 g/dl	16.92 g/dl	4.19%
6	16.56 g/dl	14.72 g/dl	4.46%	21	18.4 g/dl	18.00 g/dl	2.17%
7	16.92 g/dl	16.19 g/dl	4.31%	22	13.24 g/dl	13.00 g/dl	1.81%
8	23.55 g/dl	22.81g/dl	3.14%	23	14.35 g/dl	13.61 g/dl	5.15%
9	16.19 g/dl	15.82 g/dl	2.28%	24	16.56 g/dl	16.19 g/dl	2.23%
10	22.81 g/dl	22.08 g/dl	3.20%	25	17.66 g/dl	16.92 g/dl	4.19%
11	17.66g/dl	16.92g/dl	4.19%	26	17.29 g/dl	16.80 g/dl	2.83%
12	20.60 g/dl	19.87 g/dl	3.54%	27	13.98 g/dl	13.30 g/dl	4.86%
13	14.35 g/dl	13.98 g/dl	2.57%	28	15.45 g/dl	15.08 g/dl	2.39%
14	12.88 g/dl	12.40 g/dl	3.72%	29	17.29 g/dl	16.92 g/dl	2.13%
15	8.46 g/dl	8.10 g/dl	4.25%	30	13.61 g/dl	13.40 g/dl	2.26%

Tabla 5. Resultados de concentración de hemoglobina en sangre canina no tratada y tratada con SES.

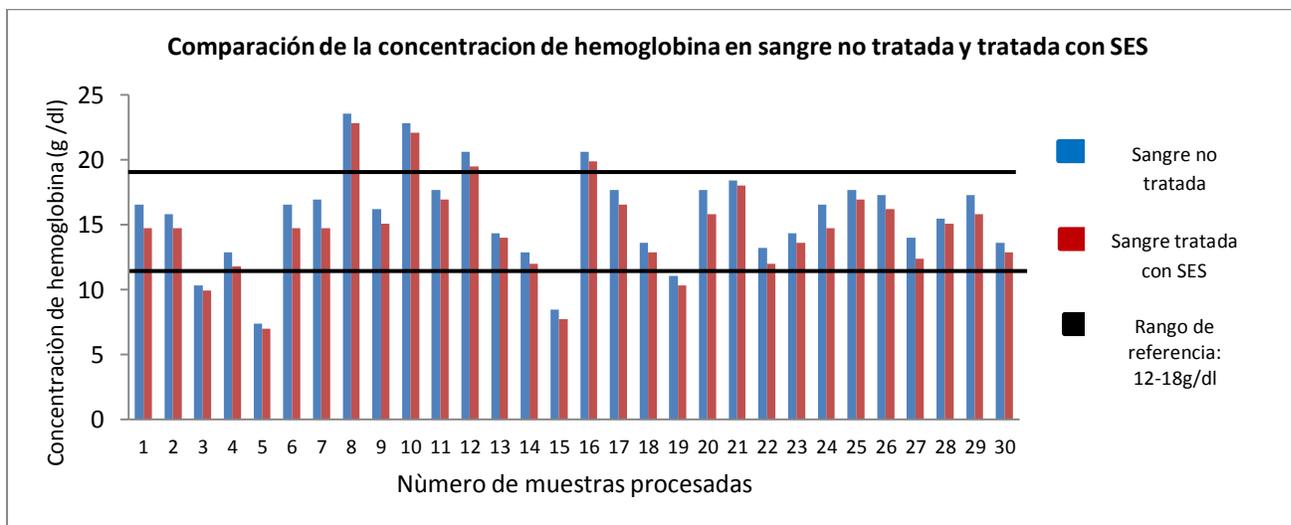


Gráfico 15. Comparación de la concentración de hemoglobina en sangre canina no tratada y tratada con SES. Nótese que el mayor número de muestras entran dentro del parámetro de referencia.

7.9.4 HEMATOCRITO

VALOR DE REFERENCIA: 35 - 55%

No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción	No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción
1	54.12%	53.57%	1.01%	16	53.44%	51.28%	4.04%
2	50.32%	50.00%	0.63%	17	55.00%	54.54%	0.83%
3	30.50%	29.41%	3.57%	18	51.72%	50.00%	3.32%
4	53.44%	52.63%	1.51%	19	45.58%	44.77%	1.77%
5	25.75%	24.39%	5.28%	20	52.54%	51.72%	1.56%
6	45.45%	44.44%	2.22%	21	36.06%	35.08%	2.79%
7	50.79%	48.38%	4.74%	22	52.94%	50.84%	3.96%
8	53.70%	51.72%	3.68%	23	45.76%	43.47%	5.00%
9	48.21%	47.61%	1.24%	24	41.07%	40.00%	2.60%
10	64.81%	63.82%	1.52%	25	51.78%	50.84%	1.81%
11	53.19%	52.63%	1.05%	26	40.38%	39.21%	2.89%
12	62.00%	60.00%	3.99%	27	46.38%	44.44%	4.18%
13	53.22%	51.72%	2.81%	28	43.10%	42.55%	1.27%
14	38.46%	36.03%	3.71%	29	42.30%	40.81%	3.52%
15	32.35%	31.74%	1.88%	30	50.90%	49.18%	3.37%

Tabla 6. Resultados de porcentaje de hematocrito en sangre canina no tratada y tratada con SES

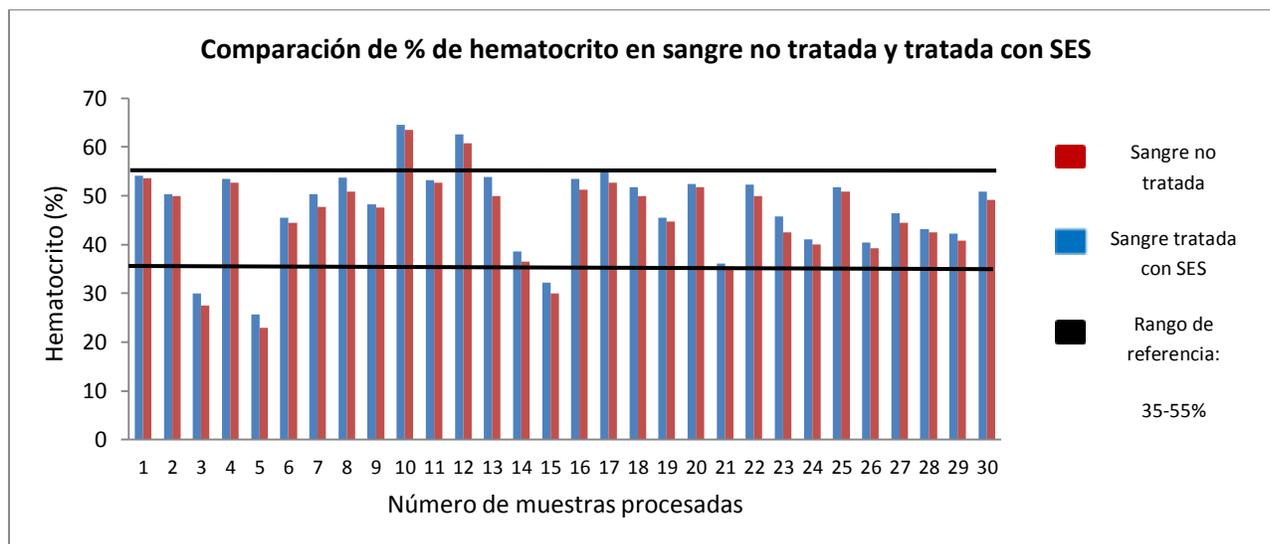


Gráfico 16. Comparación de % de hematocrito en sangre canina no tratada y tratada con SES. Obsérvese que la mayoría de las muestras tiende a caer dentro del rango establecido.

7.9.5 CONTEO PLAQUETARIO

VALOR DE REFERENCIA: $120 - 500 \times 10^3/\text{mm}^3$

No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción celular	No. de muestra	Sangre no tratada	Sangre tratada con SES	% de reducción celular
1	$375 \times 10^3/\text{mm}^3$	$370 \times 10^3/\text{mm}^3$	1.33%	16	$502 \times 10^3/\text{mm}^3$	$490 \times 10^3/\text{mm}^3$	2.39%
2	$353 \times 10^3/\text{mm}^3$	$340 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.68%	17	$156 \times 10^3/\text{mm}^3$	$150 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.84%
3	$275 \times 10^3/\text{mm}^3$	$260 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.45%	18	$370 \times 10^3/\text{mm}^3$	$350 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.40%
4	$175 \times 10^3/\text{mm}^3$	$170 \times 10^3/\text{mm}^3$	2.85%	19	$250 \times 10^3/\text{mm}^3$	$240 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.00%
5	$110 \times 10^3/\text{mm}^3$	$100 \times 10^3/\text{mm}^3$	9.09%	20	$400 \times 10^3/\text{mm}^3$	$380 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.00%
6	$247 \times 10^3/\text{mm}^3$	$230 \times 10^3/\text{mm}^3$	6.88%	21	$463 \times 10^3/\text{mm}^3$	$440 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.96%
7	$478 \times 10^3/\text{mm}^3$	$450 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.85%	22	$589 \times 10^3/\text{mm}^3$	$570 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.22%
8	$300 \times 10^3/\text{mm}^3$	$290 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.33%	23	$299 \times 10^3/\text{mm}^3$	$290 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.01%
9	$410 \times 10^3/\text{mm}^3$	$390 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.87%	24	$433 \times 10^3/\text{mm}^3$	$410 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.31%
10	$491 \times 10^3/\text{mm}^3$	$490 \times 10^3/\text{mm}^3$	0.20%	25	$405 \times 10^3/\text{mm}^3$	$390 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.70%
11	$458 \times 10^3/\text{mm}^3$	$440 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.93%	26	$501 \times 10^3/\text{mm}^3$	$480 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.19%
12	$550 \times 10^3/\text{mm}^3$	$530 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.63%	27	$385 \times 10^3/\text{mm}^3$	$370 \times 10^3/\text{mm}^3$	3.89%
13	$123 \times 10^3/\text{mm}^3$	$120 \times 10^3/\text{mm}^3$	2.43%	28	$476 \times 10^3/\text{mm}^3$	$450 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.46%
14	$388 \times 10^3/\text{mm}^3$	$370 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.63%	29	$115 \times 10^3/\text{mm}^3$	$110 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.34%
15	$340 \times 10^3/\text{mm}^3$	$320 \times 10^3/\text{mm}^3$	5.88%	30	$420 \times 10^3/\text{mm}^3$	$400 \times 10^3/\text{mm}^3$	4.76%

Tabla 7. Resultados de conteo plaquetario de sangre canina no tratada y tratada con SES.

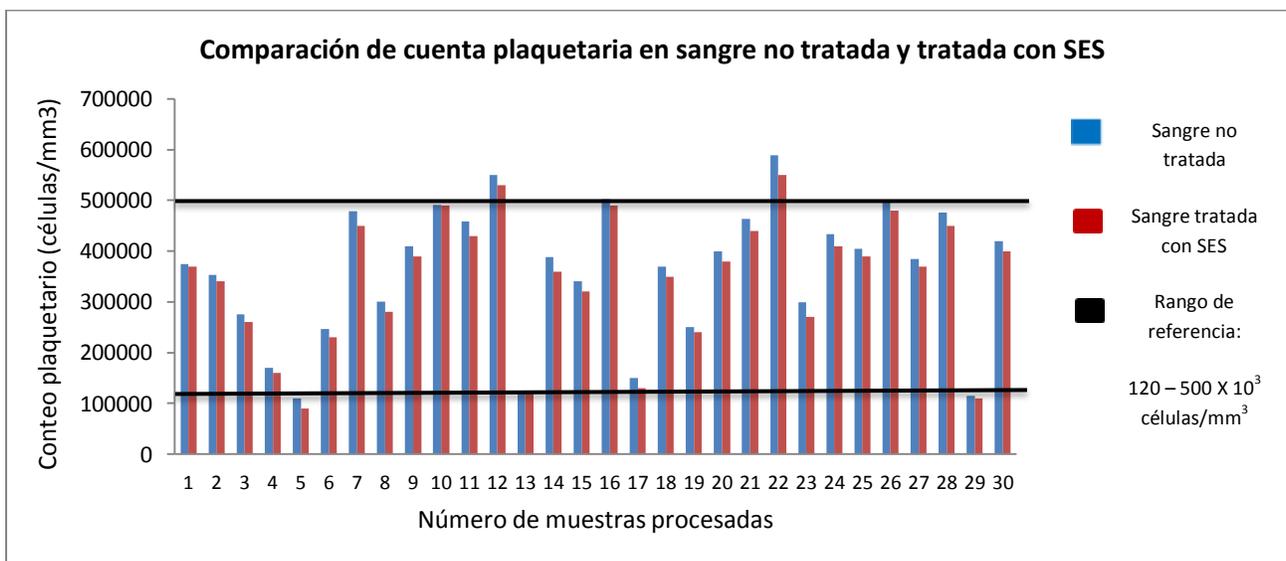


Gráfico 17. Comparación de la cuenta plaquetaria en sangre canina no tratada y tratada con SES. Nótese que la mayoría de las muestras caen dentro del rango establecido.

7.9.6 CUENTA DIFERENCIAL LEUCOCITARIA

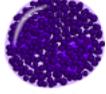
No. de muestra	Procesamiento	Linfocitos	Monocitos	Neutrófilos Segmentados	Neutrófilos Banda	Eosinófilos	Basófilos
		 15-35%	 2 -7%	 60-77%	 0-3%	 2 - 10%	 0-1%
1	Sangre no tratada	28%	5%	65%	0%	2%	0%
	Sangre tratada con SES	29%	5%	64%	0%	2%	0%
2	Sangre no tratada	30%	4%	60%	5%	1%	0%
	Sangre tratada con SES	29%	3%	61%	5%	2%	0%
3	Sangre no tratada	28%	5%	58%	3%	5%	1%
	Sangre tratada con SES	26%	5%	58%	4%	5%	2%
4	Sangre no tratada	23%	4%	64%	3%	6%	0%
	Sangre tratada con SES	22%	5%	65%	3%	4%	0%
5	Sangre no tratada	7%	1%	18%	1%	0%	0%
	Sangre tratada con SES	0%	0%	0%	0%	0%	0%
6	Sangre no tratada	31%	7%	52%	8%	2%	0%
	Sangre tratada con SES	37%	7%	48%	8%	0%	0%
7	Sangre no tratada	28%	2%	62%	2%	6%	0%
	Sangre tratada con SES	29%	1%	63%	2%	5%	0%
8	Sangre no tratada	48%	5%	38%	1%	7%	0%
	Sangre tratada con SES	46%	6%	38%	2%	8%	0%
9	Sangre no tratada	24%	3%	69%	3%	1%	0%
	Sangre tratada con SES	25%	4%	69%	1%	1%	0%
10	Sangre no tratada	18%	9%	68%	3%	2%	0%
	Sangre tratada con SES	17%	10%	67%	4%	2%	0%
11	Sangre no tratada	13%	4%	79%	3%	0%	1%
	Sangre tratada con SES	15%	3%	80%	2%	0%	0%
12	Sangre no tratada	18%	4%	73%	3%	2%	0%
	Sangre tratada con SES	13%	4%	78%	3%	1%	0%
13	Sangre no tratada	23%	3%	68%	2%	3%	1%
	Sangre tratada con SES	22%	3%	73%	1%	1%	0%
14	Sangre no tratada	21%	10%	60%	5%	4%	0%
	Sangre tratada con SES	22%	10%	60%	3%	4%	0%
15	Sangre no tratada	63%	5%	25%	2%	4%	1%
	Sangre tratada con SES	62%	7%	25%	3%	3%	0%

Tabla 8. Valores relativos obtenidos en la cuenta diferencial en frotis de sangre no tratada y tratada con SES.

7.9.6 CUENTA DIFERENCIAL LEUCOCITARIA (CONTINUACION)

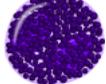
No. de muestra	Procesamiento	Linfocitos	Monocitos	Neutrófilos Segmentados	Neutrófilos Banda	Eosinófilos	Basófilos
		 15-35%	 2 -7%	 60-77%	 0-3%	 2 – 10%	 0-1%
16	Sangre no tratada	19%	6%	57%	6%	11%	1%
	Sangre tratada con SES	19%	7%	55%	6%	13%	0%
17	Sangre no tratada	14%	1%	78%	3%	5%	0%
	Sangre tratada con SES	12%	3%	79%	3%	3%	0%
18	Sangre no tratada	34%	6%	50%	6%	4%	0%
	Sangre tratada con SES	34%	5%	54%	5%	2%	0%
19	Sangre no tratada	26%	5%	58%	3%	7%	1%
	Sangre tratada con SES	19%	3%	46%	1%	4%	0%
20	Sangre no tratada	23%	1%	72%	0%	3%	1%
	Sangre tratada con SES	21%	3%	73%	1%	2%	0%
21	Sangre no tratada	19%	1%	78%	0%	2%	0%
	Sangre tratada con SES	17%	2%	76%	1%	4%	0%
22	Sangre no tratada	25%	3%	68%	0%	4%	0%
	Sangre tratada con SES	27%	1%	68%	1%	3%	0%
23	Sangre no tratada	18%	5%	68%	2%	7%	0%
	Sangre tratada con SES	22%	4%	66%	1%	7%	0%
24	Sangre no tratada	15%	8%	74%	0%	3%	0%
	Sangre tratada con SES	15%	7%	74%	0%	4%	0%
25	Sangre no tratada	16%	10%	67%	3%	4%	0%
	Sangre tratada con SES	20%	8%	68%	1%	3%	0%
26	Sangre no tratada	26%	6%	63%	2%	3%	0%
	Sangre tratada con SES	22%	4%	70%	1%	3%	0%
27	Sangre no tratada	20%	4%	71%	5%	0%	0%
	Sangre tratada con SES	19%	3%	73%	4%	1%	0%
28	Sangre no tratada	15%	3%	77%	1%	4%	0%
	Sangre tratada con SES	16%	3%	78%	0%	3%	0%
29	Sangre no tratada	10%	4%	79%	0%	6%	1%
	Sangre tratada con SES	11%	3%	82%	0%	4%	0%
30	Sangre no tratada	19%	4%	70%	0%	7%	0%
	Sangre tratada con SES	22%	3%	68%	1%	5%	1%

Tabla 9. Valores relativos obtenidos en la cuenta diferencial en frotis de sangre no tratada y tratada con SES.

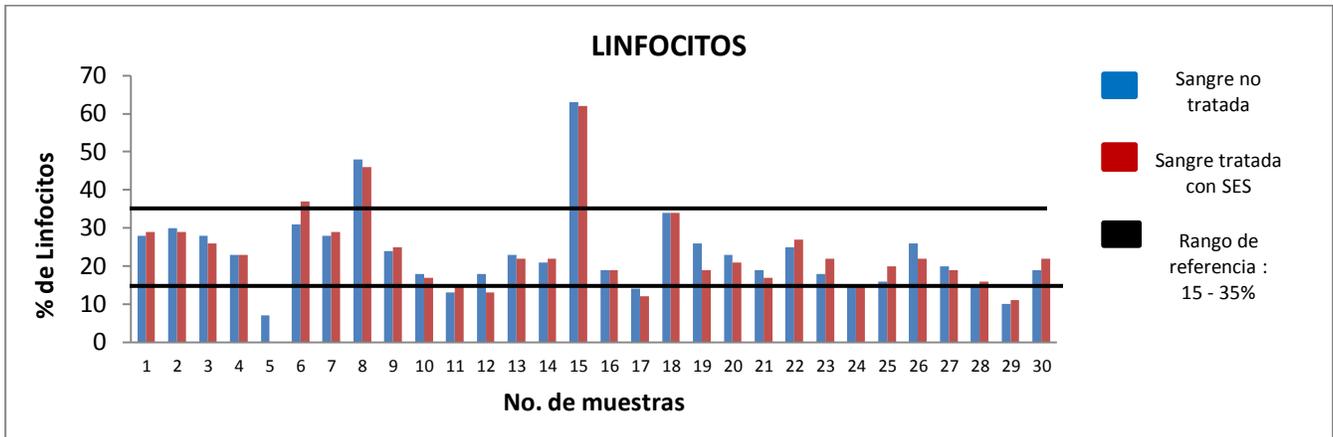


Gráfico 18. Comparacion de la cuenta diferencial de linfocitos de sangre no tratada y tratada con SES. Obsérvece que la muestra 5,8,15 y 29 salen del rango de referencia.

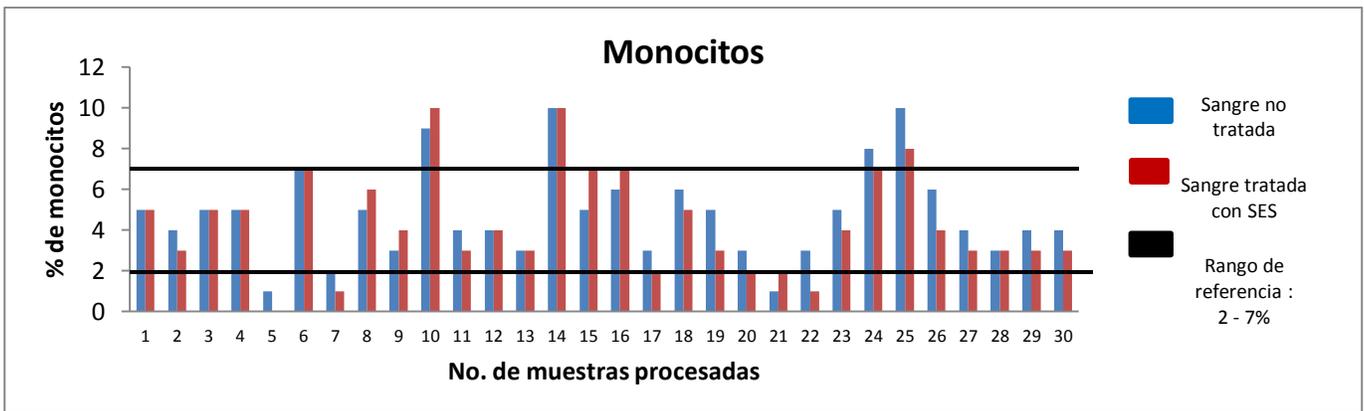


Gráfico 19. Comparación de la cuenta diferencial de monocitos de sangre no tratada y tratada con SES. Obsérvese las muestras 5, 10 y 14,24 y 25 salen del rango de referencia.

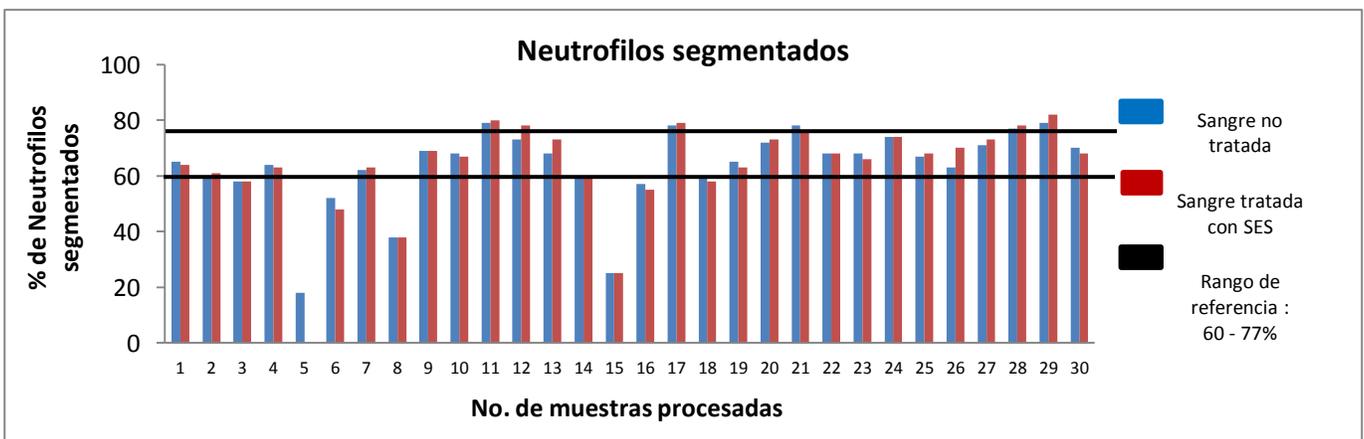


Gráfico 20. Comparación de la cuenta diferencial de neutrófilos segmentados de sangre no tratada y tratada con SES. Obsérvese que algunas muestras no caen dentro del rango de referencia.

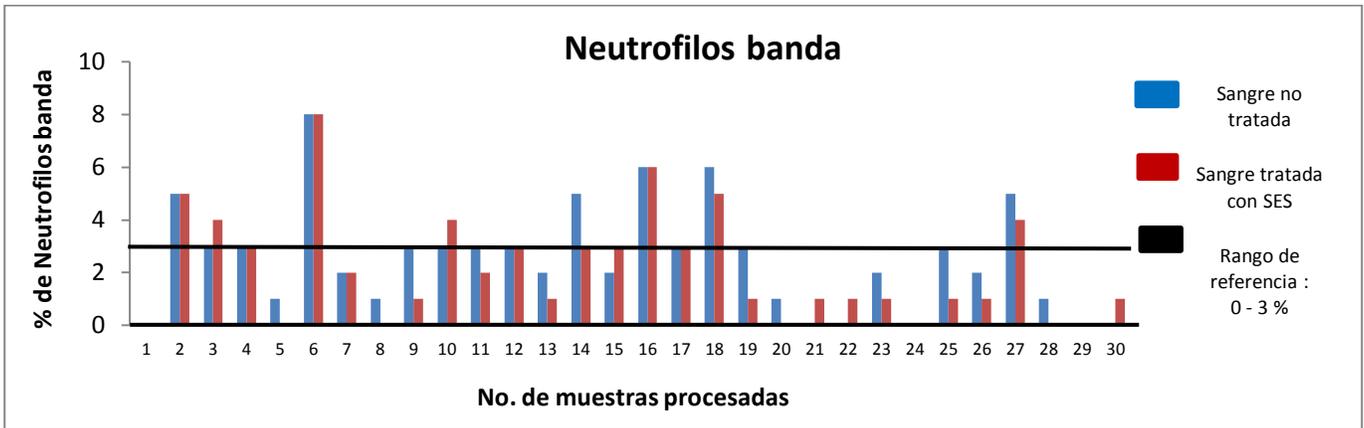


Grafico 21. Comparación de la cuenta diferencial de neutrófilos banda en sangre no tratada y tratada con SES. Obsérvese que 6 muestras no caen dentro del rango de referencia.

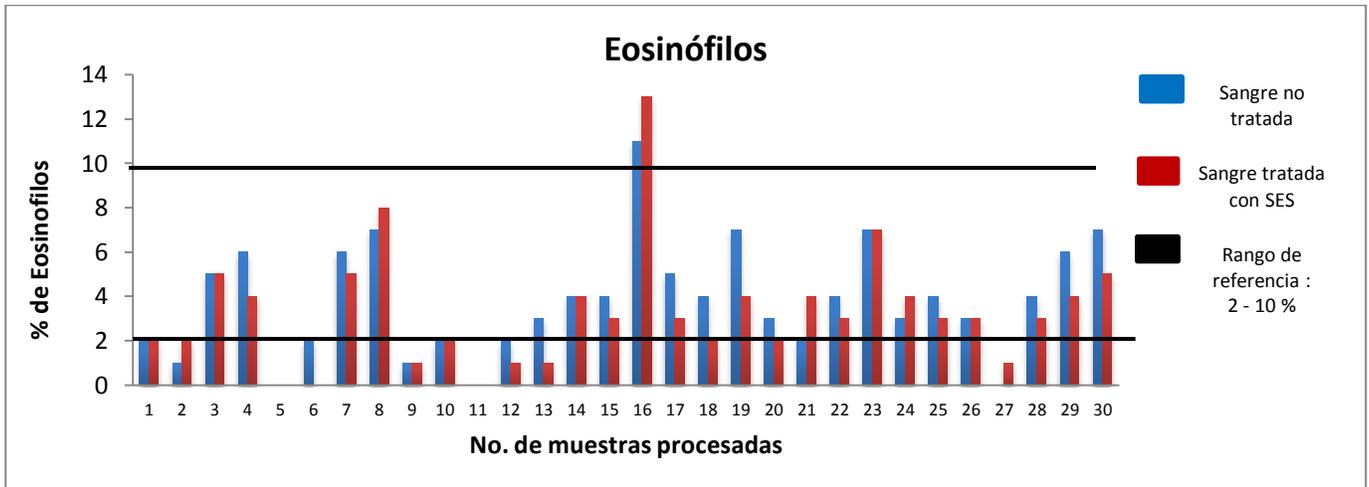


Grafico 22. Comparación de la cuenta diferencial de eosinófilos en sangre no tratada y tratada con SES. Obsérvese que 4 muestras no caen dentro del rango de referencia.

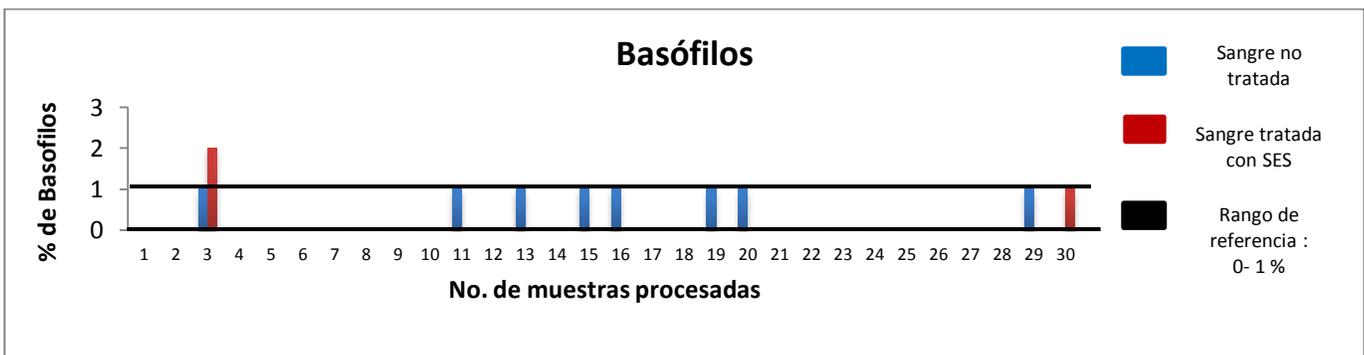


Grafico 23. Comparación de la cuenta diferencial de Basófilos en sangre no tratada y tratada con SES. Obsérvese que solo la muestra 3 no cae dentro del rango de referencia.

7.10. Método estadístico t de Student para muestras apareadas.

$$t = \frac{\bar{X}}{D.S} \sqrt{n}$$

Dónde: \bar{X} = media
D.S. = desviación estándar
n = número de muestras

Si: $t_c \leq t_t$ se cumple Ho
Si: $t_c > t_t$ se cumple Hi

Hipótesis nula Ho: $\bar{X}_{NT} \leq \bar{X}_T$ No hay diferencia en el tratamiento
Hipótesis alternativa Hi: $\bar{X}_{NT} > \bar{X}_T$ Si hay diferencia en el tratamiento

7.11. Cuenta Leucocitaria

$$t = \frac{403.3333}{229.6674} \sqrt{30} = 9.6157 \quad t_{0.95\%} = 2.0452 \quad \text{g. l.} = n-1 = 29$$

$t_c = 9.6157 > t_t = 2.0452$ Si hay diferencia

7.12. Cuenta Eritrocitaria

$$t = \frac{190,333.333}{77,747.7500} \sqrt{30} = 13.4081 \quad t_{0.95\%} = 2.0452 \quad \text{g. l.} = n-1 = 29$$

$t_c = 13.4081 > t_t = 2.0452$ Si hay diferencia

7.13. Hemoglobina

$$t = \frac{0.5603}{0.1884} \sqrt{30} = 16.2886 \quad t_{0.95\%} = 2.0452 \quad \text{g. l.} = n-1 = 29$$

$t_c = 16.2886 > t_t = 2.0452$ Si hay diferencia

7.14. Hematocrito

$$t = \frac{1.2646}{0.9664} \sqrt{30} = 10.8327 \quad t_{0.95\%} = 2.0452 \quad \text{g. l.} = n-1 = 29$$

$t_c = 10.8327 > t_t = 2.0452$ Si hay diferencia

7.15. Cuenta Plaquetaria

$$t = \frac{14,866.6666}{7,098.9719} \sqrt{30} = 11.46 \quad t_{0.95\%} = 2.0452 \quad \text{g. l.} = n-1 = 29$$

$t_c = 11.46 > t_t = 2.0452$ Si hay diferencia

7.11 Observación de células en cuenta diferencial de sangre con SES.

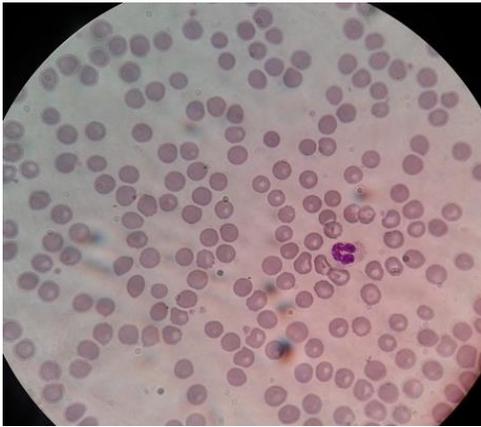


Foto 18. Frotis de sangre canina (100X) tratada con SES. Se observa un neutrófilo banda.

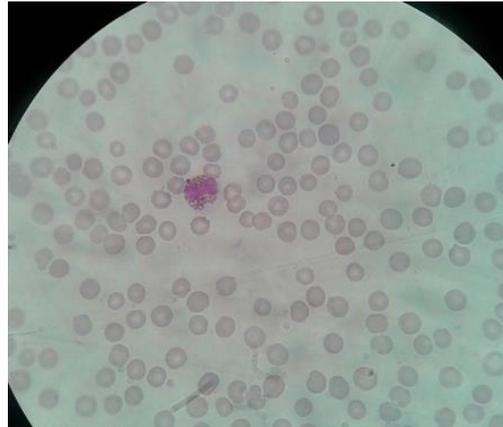


Foto 19. Frotis de sangre canina (100X) tratada con SES. Se observa un eosinófilo.

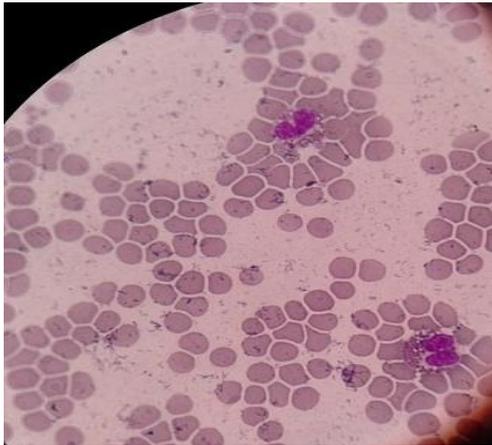


Foto 20. Frotis de sangre canina (100X) tratada con SES. Se observan dos eosinófilos.

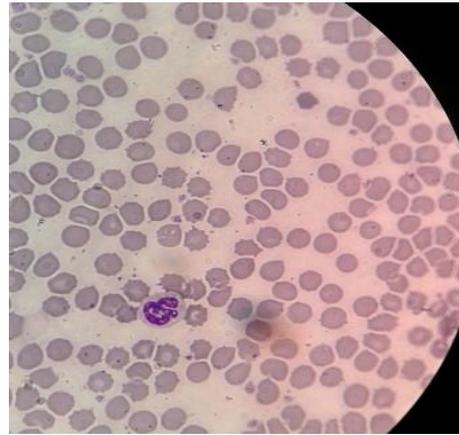


Foto 21. Frotis de sangre canina (100X) tratada con SES. Se observa un neutrófilo segmentado.

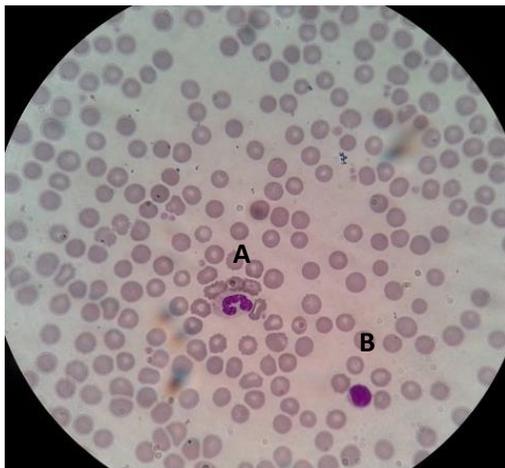


Foto 22. Frotis de sangre canina (100X) tratada con SES. Se observa un neutrófilo banda (A) y un linfocito (B).



Foto 23. Frotis de sangre canina (100X) tratada con SES. Se observa un monocito.

7.12 Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) por el método Gel-Clot.

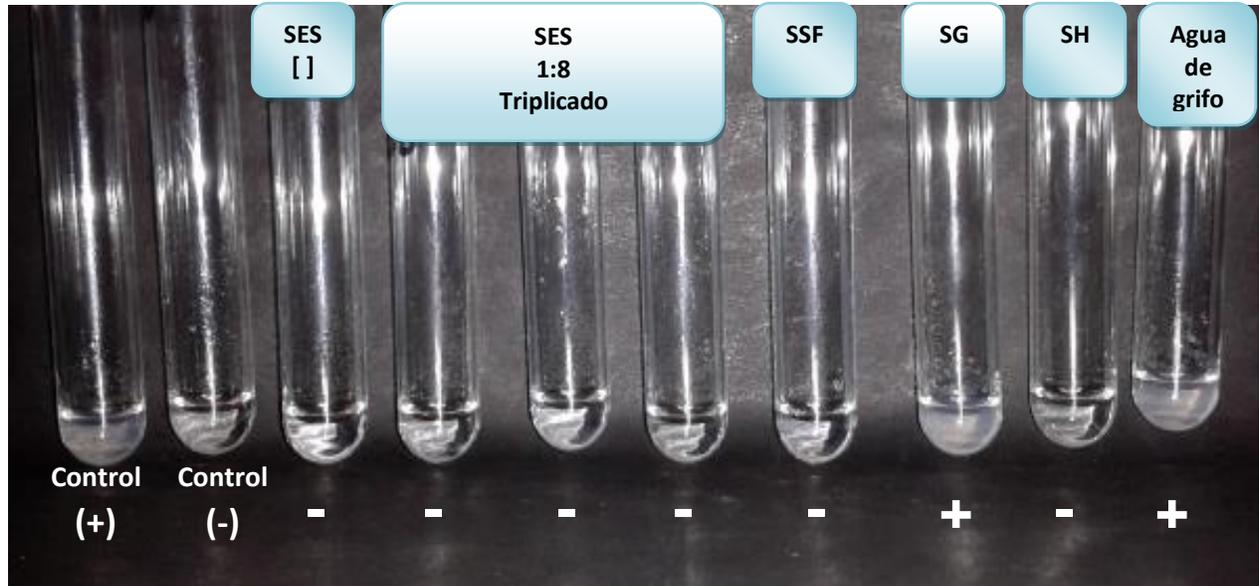


Foto 24. Resultado de la prueba de LAL para endotoxinas por el método de Gel-Clot. Obsérvese la formación de un gel sólido opaco en SG y en agua de grifo, lo que indica presencia de endotoxinas en dichas soluciones comparativamente con los controles.

8. Discusión de Resultados

El presente trabajo experimental se inició con la determinación de las características fisicoquímicas de la SSF, SG, SH y de la SES (VeteriBac mascotas solución antiséptica de pH neutro), con el fin de evaluar su pH, ORP y ppm de cloro total. En el apartado 7.1, se muestran los gráficos 1, 2 y 3 donde se presentan los resultados obtenidos de las características fisicoquímicas de cada solución; observando que la SES obtuvo el pH más cercano a la neutralidad (7.27); un ORP de 823 Mv, por lo cual, las propiedades biocidas del ácido hipocloroso (HClO) incrementan gracias al alto potencial de óxido reducción (ORP) de la SES. El alto ORP afecta a las células al irrumpir la membrana externa, lo cual facilita la acción del HClO; finalmente 25 ppm de cloro total, el cual está dentro de rango de acuerdo a las características del marbete. Cabe mencionar que de las tres soluciones a trabajar, ninguna resultó con un ORP que presente actividad germicida (ver gráfico 2). Con respecto al pH de SSF (5.92), SG (4.07) y SH (6.50) respectivamente, se puede precisar que se encuentran por debajo de la neutralidad, además de que son de uso rutinario para aplicación intravenosa.

Posteriormente se realizó la determinación de las características fisicoquímicas de la mezcla de SES con SSF, SES con SH y SES con SG a distintas diluciones. Al comparar los valores obtenidos de las tres mezclas, observamos variabilidad con respecto al ORP basado en las diluciones. El mejor resultado en cuanto a pH, es el de la mezcla de SSF y SES ya que los valores se encuentran cercanos a la neutralidad lo cual es importante por ser inocua con las células sanguíneas, además de que dichos valores no se modifican considerablemente con las diluciones realizadas. Finalmente en cuanto a ppm de cloro total, el mejor resultado es el de SSF con SES, ya que la concentración de cloro en las diferentes diluciones es elevada, en comparación con las otras dos mezclas. Este aumento se atribuye a la SES, la cual tiene más iones de ácido hipocloroso lo que le confiere a la mezcla parte de estos iones.

Para comprobar el efecto de la SES hacia distintas cepas bacterianas (*E. coli* y *S. aureus*) se realizó un reto microbiano siguiendo la NMX-BB-040-SCFI-1999 con la finalidad de determinar la actividad antimicrobiana. El motivo por el cual se trabajó con estas cepas es que ambas son establecidas por dicha norma.

En el apartado 7.5 se muestran las fotos 1 y 4 donde se observan las placas con crecimiento de las UFC de *E. coli* ATCC 11229 y de *S. aureus* ATCC 6538 respectivamente, antes del tratamiento con la SES; así mismo en las fotos 2 y 5 se observan las placas sin crecimiento bacteriano, después del tratamiento con la SES. Finalmente en la foto 3 se

muestra la placa control (únicamente con medio para métodos estándar) la cual no presentó crecimiento de UFC. A continuación se determinó el porcentaje de reducción de ambas cepas obteniendo un 99.999% de reducción para *E. coli* y 99.998% para *S. aureus*. Estos resultados se comparan con el reto SES+SSF dilución 1:8, en el cual se muestra la foto 6 donde se observa la placa con crecimiento de las UFC de *S. aureus* ATCC 6538 antes del tratamiento con las SES+SSF dilución 1:8; y en la foto 7 se observa la placa después del tratamiento con SES+SSF dilución 1:8 que muestra un ligero crecimiento de UFC y en el cual se obtuvo un porcentaje de reducción de 99.985%, por lo tanto la SES a dilución 1:8 muestra resultados satisfactorios al tener efecto germicida. Por ello se asegura que la SES funge como un buen desinfectante, ya que este actúa primeramente contra proteínas de la pared y/o membrana celular, inhibiendo algunas reacciones enzimáticas e inactivación de ácidos nucleicos.⁴¹

Posteriormente se llevó a cabo una prueba de lisis en placa de SES con SSF, SES con SH y SES con SG a diferentes diluciones (1:2-1:32), adicionando a estas mezclas sangre de perro, con la finalidad de encontrar la dilución ideal de trabajo para que la mezcla no lisara a los eritrocitos. En la foto 9 se muestra la placa con las diluciones realizadas de SSF con SES. Además se observa el pocillo de únicamente SSF con sangre (control), donde los eritrocitos se muestran intactos y no hay presencia de lisis, la SSF suele consistir en una solución estéril de cloruro sódico al 0,9% p/v en agua destilada. Es isotónica con el plasma sanguíneo, es decir, la solución y la sangre tienen igual presión osmótica y por ello no hay presencia de lisis.^{22, 67.}

También se observa el pocillo conteniendo únicamente SES con sangre, en el cual aparecen los eritrocitos completamente lisados. Por lo anterior se sabe que la SES concentrada tiene un efecto lítico sobre los eritrocitos, esta consecuencia es debida a que la SES actúa sobre la membrana eritrocítica, la cual está compuesta de proteínas (50%) que componen el citoesqueleto y que están involucradas en la forma, estabilidad y deformación del eritrocito, por lo tanto si surge una alteración proteínica de la membrana, el eritrocito puede llegar a lisarse⁵⁹ por ello se deben realizar las diluciones de SES con SSF, encontrando que a partir de la dilución 1:8 ya no hay presencia de lisis.

En la foto 10 se muestran las diluciones realizadas de SH con SES, en donde existe presencia de lisis en todos los pocillos. Esto es debido a que hay un efecto hipotónico, en donde la célula se hincha con el agua que entra en ella y explota; cuando se da este caso en los glóbulos rojos de la sangre, se denomina hemólisis.^{59, 67} Además también se observa el pocillo que contiene únicamente SH con sangre y en el cual no se observa efecto lítico. La SH o lactato de sodio compuesto es una solución isotónica en relación a la osmolaridad

de la sangre, usada para terapia intravenosa, por lo cual esta solución no lisa los glóbulos rojos. Contiene cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio y se emplea para la reposición de líquidos y electrolitos.²⁰

Finalmente en la foto 11 se encuentran las diluciones de SG con SES, en donde a partir de la dilución 1:8 no hay lisis de eritrocitos, también se muestra el pocillo únicamente con SG y sangre en donde no hay presencia de lisis. La SG al 5% es una solución isotónica de glucosa, y por ello no causa lisis en glóbulos rojos, cada litro SG al 5% aporta agua y 50 gramos de glucosa.³⁰ Está indicada cuando es necesario administrar agua libre de sodio; es auxiliar en el mantenimiento o corrección del equilibrio hidroelectrolítico (por sudación o por falta de ingestión de líquidos) y cuando se desea incrementar el aporte calórico.⁴³

Por los resultados obtenidos anteriormente, las mejores soluciones de trabajo que no presentaron lisis a dilución 1:8 son SSF con SES y SG con SES. Por lo contrario, la mezcla SH con SES se descartó automáticamente por presentar lisis, aunque esta se fuera presentando a menor medida con forme a las diluciones realizadas, creemos que la combinación de los componentes de la SH con los componentes de la SES podrían ser el resultado de nuevos compuestos con actividad lítica.

A continuación se realizó la observación macroscópica y microscópica de sangre de perro mezclada con SSF, SH y SG con SES a la dilución 1:8, ya que esta fue la ideal al no presentar efecto lítico. Cabe mencionar que también se realizó la observación macroscópica y microscópica a la mezcla de SH con SES aunque esta haya presentado lisis en todas las diluciones.

En la foto 12 se aprecia la vista macroscópica de la mezcla de SSF con SES y sangre de perro en donde no se observa la presencia de hemolisis y/o aglutinación de eritrocitos; en la foto 13 se observan a los eritrocitos de esa misma mezcla vistos al microscopio (objetivo 100X), los cuales no presentaron ninguna alteración morfológica debido a que se encuentran en un medio isotónico (concentración de soluto es igual fuera y dentro de la célula) ;por tanto, tiene la misma presión osmótica que la sangre y no produce la deformación de los glóbulos rojos.^{67, 68}

En la foto 14 se aprecia la vista macroscópica de la mezcla de SG con SES y sangre de perro, en donde se observó la precipitación de eritrocitos; en la foto 15 se observan los eritrocitos de esta mezcla vistos al microscopio (100X), los cuales mostraron aglutinación y crenación (acantocitosis)⁵⁷, esto debido a que los eritrocitos se encuentran en una solución hipertónica y al estar en esta solución con gran cantidad de soluto, el eritrocito libera agua debido a la presión osmótica llegando a la destrucción de la célula por

deshidratación.^{21, 68}. Por lo tanto, la mezcla de SG con SES se descartó por presentar dichos efectos hacia la sangre.

Así mismo en la foto 16 se observa la vista macroscópica de la mezcla de SH con SES y sangre de perro, donde se aprecia la formación de coagulo; en la foto 17 se muestran los eritrocitos de esta mezcla vistos al microscopio (100X), los cuales sufrieron hemolisis y aglutinación. Por ello, la mezcla de SH con SES también se descarta por presentar dicho efecto hacia la sangre. Por lo tanto la mezcla ideal para realizar la biometría hemática es SSF con SES dilución 1:8.

La biometría hemática realizada, nos sirvió para determinar los siguientes parámetros: cuenta leucocitaria, cuenta eritrocitaria, cuenta plaquetaria, cuenta diferencial de leucocitos, determinación de hemoglobina y determinación de hematocrito. Cabe mencionar que no se realizó la prueba de volumen de sedimentación globular (VSG), debido a que al realizarse la dilución de SES+SSF y sangre de perro, el resultado se vería afectado dando valores disminuidos (menor sedimentación); de igual manera, no se realizó la prueba de conteo de reticulocitos, debido a que estos se encuentran en menor medida en la sangre (1% en la circulación sanguínea en condiciones normales) y al realizar la dilución estos se verán en mucho menor proporción.

En el gráfico 13 se muestra la comparación de la cuenta leucocitaria de las muestras sin tratamiento y con tratamiento (SES+SSF), en donde se aprecia que la mayoría de las muestras (83.33%) se encuentran dentro del intervalo establecido, esto nos indica que el tratamiento con SES no afecta el número de leucocitos, aunque este se encuentre levemente disminuido a consecuencia de la dilución realizada. En el caso de la muestra 5, (representada por el 3.33%) presenta un valor disminuido (leucopenia) debido a que el canino se encontraba en proceso de quimioterapia por ser diagnosticado con Cáncer. Las muestras 12, 18, 22, y 28 (13.33%) se muestran con valores elevados (leucocitosis), causados casi siempre por una infección, pero también se elevan en casos de mucho estrés^{32, 53, 59, 60}.

El gráfico 14 muestra la comparación de la cuenta eritrocitaria, se observa que la mayoría de las muestras (80%) están dentro del rango establecido, por lo cual el tratamiento con SES no afecta el número de eritrocitos. La muestra 5 presenta una disminución debido a que el perro sufría hemorragias anales; las muestras 3 y 15 también mostraron valores disminuidos (10%) aunque no tan considerables, lo que significa que los perros pudieran estar anémicos, por hemólisis, pérdidas importantes de sangre, inflamaciones crónicas, parasitosis intensas y fallas renales.^{32, 55}. Las muestras 10, 12 y 16 tuvieron valores un poco

elevados (10 %), aunque estos no rebasan considerablemente el rango de referencia. Estos aumentan comúnmente con el entrenamiento intenso (contracción esplénica), y por deshidratación (en realidad no hay más células, sino menos plasma), pero también puede ser por algunas enfermedades pulmonares, en tumores de la médula ósea o en zonas de gran altitud donde hay poco oxígeno en el aire. Ante cualquier falta de oxígeno en los tejidos, el cuerpo responde produciendo más glóbulos rojos.^{53, 59, 60, 62}

En el gráfico 15 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de hemoglobina, la cual es una proteína globular, que se encuentra en grandes cantidades dentro de los glóbulos rojos y de importancia fisiológica, para el aporte normal de oxígeno a los tejidos.^{57, 67} La muestra 5 muestra hemoglobina disminuida debido a las hemorragias que muestra el canino; las muestras 3, 15 y 19 (13.33%) también muestran valores por debajo del rango de referencia lo cual indica que hay estrés prolongado, infecciones intensas y anemia.⁵³ Las muestras 8, 10, 12 y 16 (13.33%) muestran valores elevados lo cual se puede deber a entrenamiento intenso y el espesamiento de la sangre por deshidratación.⁵⁵ Las muestras restantes (73.33%) se encuentran dentro de los parámetros normales.

El gráfico 16 muestra el porcentaje de hematocrito, el cual se define como el porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos.⁶⁰ La muestra 5 muestra un valor disminuido de hematocrito, lo cual se atribuye también a la pérdida importante de sangre del canino. Las muestras 3 y 15 (10%) también muestran valores disminuidos de hematocrito por lo que se atribuye también a una anemia o pérdida de sangre.⁵³ Por lo contrario las muestras 10 y 12 (6.66%) mostraron valores elevados de hematocrito posiblemente causados por cólicos graves y deshidratación.^{32, 40} Todas las muestras restantes (83.33%) muestran valores normales de hematocrito.

El gráfico 17 muestra los valores de la cuenta plaquetaria, las muestras 5 y 29 (6.66%) presentan valores disminuidos; en el caso de la muestra 5 el valor bajo es causado por la quimioterapia recibida contra el cáncer que presenta el canino. La muestra 29 también tiene valores bajos, pero estos no son considerables debido a que casi alcanzan el rango inferior de cuenta plaquetaria. Las muestras 12 y 22 (6.66%) muestran valores elevados. Las demás muestras (86.66%) se encuentran dentro de parámetros normales.

Cabe mencionar que a partir de los datos obtenidos en cada una de las pruebas que corresponden a la biometría hemática, se procedió a determinar el porcentaje de reducción después del tratamiento con SES , donde se observa que ninguna muestra

obtiene más del 5% de reducción de un total del 100% , por lo que subjetivamente no tiene una alteración considerable.

Por otro lado también se realizó la prueba de “t de Student para muestras apareadas”, esta es una prueba estadística en la cual se exige dependencia entre muestras, es decir, en la que hay dos momentos uno antes y otro después. Con ello se entiende que en el primer periodo, las observaciones servirán de control o testigo, para conocer los cambios que se susciten después de aplicar una variable experimental. Con la prueba “t de Student” se comparan las medias y las desviaciones estándar del grupo de datos y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si solo son diferencias aleatorias.

Cabe mencionar que los resultados arrojados se obtuvieron con un 95% de confianza y en el cual se asevera que si hay diferencia significativa entre antes y después del tratamiento con SES con respecto a la disminución del número de células, valor de hematocrito y hemoglobina. Los resultados obtenidos por dicha prueba eran esperados ya que obviamente habrá diferencia, primeramente debido a las diluciones realizadas de sangre con SES más SSFE (dilución 1:8) que provoca una disminución en los resultados después del tratamiento, otra cuestión que puede surgir es que en el momento de procesar las muestras también puede haber la posibilidad de que queden residuos de sangre en pipetas y puntillas de micropipeta, lo que también provoca una disminución en los valores.

Posteriormente para evaluar la morfología de eritrocitos y leucocitos se realizó una cuenta diferencial. Los gráficos 18, 19, 20, 21, 22 y 23 muestran el porcentaje de linfocitos, monocitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos banda, eosinófilos y basófilos respectivamente, presentes en todas las muestras, en donde se observa que la mayoría de las muestras no tratadas y tratadas con SES se encuentran dentro de los rangos normales; a excepción de la muestra 5 que tiene valores por debajo de lo normal, debido a la quimioterapia recibida. Al realizar la observación microscópica no se presentó alguna alteración morfológica en leucocitos, eritrocitos y plaquetas en muestras tratadas con SES, como se muestran en las fotos 18 a 23.

Finalmente se realizó la prueba de LAL (Lisado de amebocitos de Limulus) por el método Gel-Clot, este ensayo es un método sencillo y reproducible en el cual el reactivo de LAL forma un coágulo o gel en presencia de endotoxinas, las cuales forman parte de la porción externa de la pared celular de las bacterias gram-negativas, estas bacterias tienen una membrana externa que rodea la capa de peptidoglucano de la pared celular. Esta membrana externa consiste en lipoproteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). La

porción lipídica de los LPS, denominada lípido A, es la endotoxina, la cual provoca reacciones febriles al entrar en contacto con el torrente sanguíneo.⁶⁷

El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885.²⁶ En los años cincuenta del siglo XX, en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts (EE.UU.), Bang descubrió que las bacterias gramnegativas provocan la coagulación de la sangre de *Limulus*.³ Posteriormente, Levin y Bang determinaron que la reacción es enzimática y que las enzimas se encuentran en gránulos de los amebocitos.^{36, 37, 38} Dichos autores demostraron que la coagulación la inicia un componente estructural exclusivo de la pared celular bacteriana, denominado endotoxina o lipopolisacárido.^{36,38} Actualmente se sabe que la reacción consiste en una cascada de pasos de activación enzimática que terminan con la escisión de la proteína, que es coagulogena. El producto insoluble de la escisión del coagulogeno (coagulina) se une por interacción iónica. Si se forma suficiente coagulina, aparece turbidez, seguida de la formación de un coágulo de gel.³⁷

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), utilizada de acuerdo con las pautas de la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense, puede sustituir a la prueba de pirógenos (prueba en conejos) de la U.S. Pharmacopeia (USP) para el control del producto terminado de «fármacos inyectables para humanos (incluidos los productos biológicos), fármacos inyectables para animales y productos sanitarios (OPS, 2008). Además se debe realizar a cualquier producto que tenga contacto con sangre y fluidos corporales y que por lo tanto pueda contener endotoxinas bacterianas que accionarían una respuesta pirogénica.⁴⁸ La prueba del LAL también está recomendada para la evidenciación de endotoxinas en materias primas utilizadas en procesos de producción, incluida el agua y para la vigilancia de las concentraciones de endotoxinas durante dichos procesos.⁶⁷

En el presente trabajo se realizó la prueba de LAL por el método de Gel Clot a todas las soluciones utilizadas, para lo cual se trabajó con reactivos vigentes de potencia certificada y material apirógeno. En la foto 24 se muestra la serie de tubos correspondientes a cada solución a evaluar, se observa que únicamente hay presencia de endotoxinas en SG y en agua de grifo. La presencia de estas en SG se debe a que dicha solución fue manipulada durante todo el proceso de experimentación por lo cual pudo haberse contaminado y así haber adquirido residuos bacterianos. Además cabe mencionar que se realizó una prueba de esterilidad a la SG y esta fue satisfactoria al no presentar crecimiento bacteriano. Por ello se puede decir que un producto estéril puede implicar la presencia de pirógenos,

aunque se recomienda realizar una prueba correspondiente para indicar el rango permisible de ellos en la solución.

Por otro lado en el caso de agua de grifo, la presencia de endotoxinas fue positiva debido a que el agua contiene una pequeña cantidad de contaminantes microbiológicos que se encuentran dentro de límites admisibles para el consumo humano, y como la sensibilidad de esta prueba es alta, se detectó la presencia de estas. Sin embargo, dependiendo de la región o de la toma de donde provenga, puede contener elementos en concentración variable que interfieren en el tratamiento de purificación.⁵⁸

Así mismo, es de suma importancia saber que la SES concentrada y diluida (1:8), así como la SSF no tienen presencia de endotoxinas, por lo cual esta prueba es satisfactoria y por ello es viable para la utilización parenteral.

También es importante mencionar que recientemente se realizó la evaluación in vitro de la SES con el virus del Distemper canino, el cual causa problemas neurológicos, gastrointestinales y respiratorios en perros. Dicho estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el Dr. José Alberto Cano, el cual fue presentado en el 8vo. Congreso de Virología 2013. En dicha evaluación se prueba el uso de la SES con el virus del Distemper canino a diferentes concentraciones y con tiempos de 30 segundos, 5 y 30 minutos previos a la infección de las células. Los resultados preliminares mostraron una disminución de la presencia de Efectos Citopáticos (ECP) en células MDCK a partir de una concentración de 3.5 ppm. Cabe mencionar que además se pretende cuantificar el porcentaje de inhibición de replicación del virus en esta línea celular así como evaluar la viabilidad celular en presencia de la SES, también determinar su efecto en diferentes virus de importancia veterinaria y humana.

Por lo cual el uso de la SES ofrece la oportunidad de eliminar la infectividad del virus y disminuir y/o evitar la posibilidad de infectar a nuevos hospederos.³³

Finalmente, al recopilar los resultados obtenidos durante toda la experimentación, se puede mencionar que la SES al estar diluida con SSF (1:8) es una gran opción para utilizarse como tratamiento intravenoso a caninos, ya que esta no altera la morfología de las células presentes en la sangre, además de ser una solución que es atóxica e inocua hacia los tejidos, y sobre todo a esta dilución posee efecto germicida; por consiguiente auxiliará de manera satisfactoria al canino que presente alguna enfermedad relacionada con ciertos microorganismos ya que al recurrir primeramente ante cualquier síntoma de deshidratación causada por dicha patología entonces el canino podrá recuperar la salud de manera rápida y satisfactoria.

9. Conclusiones

- Se logró determinar la actividad microbicida de la SES evaluándola con la NMX-BB-040-SCFI-1999.
- La SES **concentrada** en contacto con sangre, lisa completamente a los eritrocitos.
- Se realizó la prueba de lisis de sangre de perro a SSF, SH y SG mezclada con SES a distintas diluciones, encontrando que la óptima fue de 1:8, excepto SH que presenta lisis en todas las diluciones.
- Se estableció que la SES con SSF dilución 1:8 en presencia de sangre, no lisa ni altera morfológicamente a las células sanguíneas.
- Se determinó que la SH y SG con SES dilución 1:8 en presencia de sangre presentaron formación de coágulo, hemólisis, precipitación de eritrocitos, aglutinación y crenación, por ello no son aceptables para coadyuvar como solución intravenosa.
- Se evaluó la presencia de endotoxinas en SES, SSF, SH, SG y en agua de grifo mediante la prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus, encontrando que únicamente existe presencia de endotoxinas en SG y en agua de grifo.

10. Perspectivas

- Se recomienda aumentar el número de muestras de sangre para poder realizar un mejor tratamiento estadístico.
- Seguir investigando la mezcla de SES con SSFE intravenosamente en caninos diagnosticados con enfermedades diarreicas que causan deshidratación grave, viremia y por consecuencia la muerte de los animales.
- En una siguiente etapa de investigación, trasladar el uso de la Solución Electrolizada de Superoxidación con Solución Salina Fisiológica Estéril en sangre humana, para un posible combate a virus: VIH, Hepatitis B, Hepatitis C; etc.

11. Referencias Bibliográficas

1. Agua de Súper Oxidación, elimina bacterias; Demuestra potencial para curación (2010). <http://www.oculus.com.mx/news/whitepapers/DermatologyTimes.pdf>
2. Avilés Espinoza David . (2011). Enfermedades diarréicas en perros. Revista *Anigen*. 3, pg. 1-4.
3. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA). 105; pg.361-362.
4. Baruta, D; et al. (2001). *Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa*.Causas de diarreas en perros y gatos.Cátedra Enfermedades Infecciosas: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n2001a04baruta.pdf>
5. Bartolomé, D; et al (2011). Efecto higienizante del agua electrolizada sobre el agua de bebida y la calidad higiénico sanitaria de la leche. AIDA, XIV Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza. España. 1 , pg. 16-18.
6. Bernabé Salazar Antonio. (2011). Citología e histología veterinaria. Open Courseware. Universidad de Murcia. 10, pg. 2-12.
7. Burrows Williams. (2008). Diarreas Bacterianas en perros y gatos. PISA. 5, pg.1-6.
8. Burrows C.F. (1988). Consideraciones diagnósticas sobre la diarrea crónica en el perro y en el gato. Facultad de Veterinaria. Universidad de Florida.Ponencia realizada en las V jornadas de AMVAC Madrid.5; pg. 33-69.
9. Cabello Gutierrez Carlos; et al. (2009). Efecto de una Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK. *REV INST NAL ENF RESP MEX*.22, pg. 280-287.
10. Cambero Martinez Sara E. (2012).Manual de practicas de laboratorio.Biometría Hemática. Obtenido de <http://saracbtis.webcindario.com/Descargas/BIOMETRIA/Manual%20de%20Practicas%20Biometria%20Hematica.pdf>
11. Corteguera Riverón, Raúl L. (1999). Fisiopatología de la diarrea. *Revista Cubana Pediatría* .71, pg. 86-115.
12. D'Amico, T. (2003). The drinking water facts. Disponible en: http://members.iinet.net.au/~sambrod/Health_BioNatural_The_Drinking_Water_FACTS.pdf (01/04/2012).
13. Durán Vega, Hector C. (2010). Soluciones de Superoxidación y su evolución tecnológica. Revista Dolor.Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica, año 7, vol. 3, pg.3-7.

14. Esteripharma. Solución Electrolizada de Superoxidación. (2012) http://www.medicamentosplm.com/productos/esticide_solucion_antiseptica_solucion_electrolizada_de_superoxidacion.htm
15. Esteripharma de Mexico S.A. de C.V. (2012). *Pecuarios*. Ganaderia.com.mx : http://www.ganaderia.com.mx/ganaderia/home/articulos_int.asp?cve_art=958
16. Fraise, A P. (1999). Choosing disinfectants. *J Hosp Infect*, 43, pg. 255-264.
17. Gao Z, et al. (2001) Observation on the effect of disinfection to HBsAg by electrolyzed oxidizing water. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 22 pg. 40-42
18. Gamboa, Rafael. (2008). Diarrea en perros. *Clínica Veterinaria* , pg. 32-37.
19. García, J. J ; et al (2011). Influencia de la ingestión de agua electrolizada sobre la composición físico-química de la leche de vacas frisonas. ANEMBE, XVI Congreso Internacional de Medicina Bovina. Ávila. España. pp. 234-236.
20. Gennaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia*. Madrid España: Editorial Medica Panamericana.pg.250-310
21. Gomez, Rodriguez Antonio. (2006). Biología Celular Veterinaria.Soluciones hipertónicas e hipotónicas.Revista Animal.12, pg.1-5.
22. Gutierrez, R. (1999). *Diccionario Mosby Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud*. Barcelona España: Hancort.
23. *HANNA instruments.Instrumentos de medición y control*. (2009). E:\El Potencial de Oxido Reducción en el monitoreo de desinfección de agua post cosecha.mht
24. Heridas y cicatrización: antisepsia animal.(2010). http://www.esteripharma-agrovet.com/Pdf_View.php?Boletin=4&Archivo=boletin%20heridas.pdf
25. Hinostroza Juana; et al. (2009). Efectos de la expansión endovenosa rápida con solución Hartmann y con cloruro de sodio al 0.9%, sobre el medio interno de pacientes con deshidratación severa por diarrea aguda coleriforme.Servicio de Nefrología.Departamento de Medicina.Hospital Nacional Cayetano Heredia.pg.1-7
26. Howell, W. H. (1885). Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumariasp*. Johns Hopkins University Circular.43; pg. 4-5.
27. Iáñez Enrique.(2010).Hipertextos del Area de la Biología.Curso de Microbiología General.Acción de los agentes químicos sobre las bacterias.Revista ADM.10;pg. 15-25.
28. Iwasawa A; et al. (1996) Bactericidal effect of acidic electrolyzed water comparison of chemical acidic sodium hydrochloride (NaOCl) solution. *Kansenshogaku Zasshi*. 70, pg 915-922.
29. Jaramillo Gallego. (2011).Diarrea en los perros. Causas, síntomas y tratamiento. Mascota King.<http://mascotaking.com/diarrea-en-los-perros-causas-sintomas-y-tratamiento/>

30. Jimenez, M. S. (2007). *Fundamentos Basicos de Anestesia y Reanimación en Medicina de Urgencias, Emergencias y Catástrofes*. España: Aran Ediciones.pg. 435-523
31. Kim C; et al.(2000). Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *J Food Prot.* 63, pg. 19-24.
32. Laboratorio 9 de Julio. Interpretación de Análisis clínicos veterinarios.(2009).http://www.lab9dejulio.com.ar/informacion-tecnica/interpretacion-de-los-analisis-clinicos-veterinarios_a239
33. Lazo Elvia, el. al; (2013).Evaluación in vitro de la solución electrolizada de superoxidación en el virus del Distemper canino
34. Len S. V; et al. (2000) Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *Journal Food Prot*, 63, pg.1534-1537.
35. Len S. V. et al. (2002). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *J Agric Food Chem*, 50, pg. 209-212.
36. Levin, J., and F. B. Bang. (1964). A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115; pg.337-345.
37. Levin, J., and F. B. Bang. (1968). Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19; pg.186-197.
38. Levin, J., and F. B. Bang. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115; pg. 265-274
39. Li, X. W. (1996). Preliminary study of microbicide effect and its mechanism of electrolyzed oxidizing water. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 7, pg. 95-98
40. Lima Rodríguez Fausto I.(2012). Biometría hemática completa. *Revista Dolor*.<http://leucocitosaltos.blogspot.mx/2013/02/biometria-hematica.html>
41. McKenna Sussan M; et al. (1988).The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid.Possible role the bactericidal activity of phagocytes.Institute for Toxicology and Department of Biochemistry.The University of Southern California.254; 685-692.
42. Morita C; et al. (2000). Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations. *J Virol Meth*, 85, pg. 163-174.
43. Muñoz Alonso Miguel Ángel; et al. (2009). Fluidoterapia intravenosa en urgencias y emergencias. *Revista Dolor*.19; pg. 2-30
44. Murray Patrick R; et al.(2008).Microbiología médica. Elsevier España. Madrid España.5; pg. 750-865.
45. Nachón García, F. J; et al. (2008). Esterilización por inmersión. Estudio comparativo entre glutaraldehído al 2%, agua electrolizada superoxidada con pH neutro y solución electrolizada por selectividad iónica con pH neutro. *Revista Medica U.V.*3,pg.1-6

46. Nelson D. (2000). Newer technologies for endoscope disinfection: electrolyzed acid water and disposable-component endoscope systems. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 10, pg. 319-328.
47. Nuñez Ochoa Luis ; et al. (2007). *Patología Clínica Veterinaria*. Mexico D.F: UNAM. pg 25
48. Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Manual de esterilización para los centros de salud*. Washington, D.C: USAID. pg. 56-72
49. *P.R.Vademecum On-Line Mexico*. (2013). Informed: <http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=10841>
50. Park H, et al. (2002). Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. *J Food Prot*, 65, pg. 1276-1280.
51. Paz García, J; et al. (2011). Sustitución del uso de solución salina fisiológica como irrigante en el manejo de pacientes sépticos y quirúrgicos por solución electrolizada. *Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial*. 7, pg. 46-52.
52. Paz García J, et al. (2006). Superoxidación con pH neutro en hemostasia, dolor y cicatrización. Estudio avalado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Colima. *Revista ADM* .5, pg. 20 -31.
53. Paz Millan Ernesto. (2007). Portal Educativo. Amor de Mascota. Obtenido de : <http://www.amordemascota.com/article203.html>
54. Pérez Romano, Leafar ; et al. (2009) Solución de Súper-Oxidación Microdacyn 60MR. Una tecnología de vanguardia para tratar heridas. pg.2-15.
55. Perea Hernandez D. (2011). Atlas de hematología. Con interpretación de histogramas y escatogramas. *Océano*. 10; pg.1-78.
56. Ramírez Orellana, M; et al (2004). Fisiología de la hematopoyesis. [http://www.sepeap.org/imagenes/secciones/Image/_USER_/Hematopoyesis_fisiologia\(1\).pdf](http://www.sepeap.org/imagenes/secciones/Image/_USER_/Hematopoyesis_fisiologia(1).pdf)
57. Reagan, William. J. (2010). *Hematología Veterinaria. Atlas de especies domésticas comunes*. J.M.SASTRE VIDA (SERVICIO UNIVERSIDAD). pg.1-72
58. Reyes Garces Jose Angel. (2012). Estudio del efecto inhibitorio de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro en bacterias. pg. 1-11
59. Rodríguez Rojo, Jorge E. (2012). Mediciones y Procesos de Tratamiento Confiables. *Revista Aplicaciones de Alimentación Química*, 10, pg. 19-21.
60. Ruíz Arguelles G. J. (2009). Fundamentos de hematología. México D.F.: Editorial Médica Panamericana. pg. 150-230
61. Ruíz S. (1995). Manual de prácticas de fisiología animal veterinaria. Universidad de Murcia. Editum. 3; pg.100-135

62. Sakashita, et al. (2002). Antimicrobial effects and efficacy on habitually hand-washing of strong acidic electrolyzed water. A comparative study of alcoholic antiseptics and soap and tap water. *Kansenshogaku Zasshi*, 76, pg.373-377.
63. Seoane, A. O. (2002). *Atlas de hematología. Con interpretacion de histogramas y escatergramas*. Buenos Aires, Argentina: Abbott.3,pg.56-68
64. Surdu, I; et al. (2008). Modern methods ensuring sanitary veterinary protection for animal farms, based on using of electrolyzed water. 7th International Symposium of Animal Nutrition and Biology. Balotesti. Rumania.http://metaviac.siat.ro/Default_engl.aspx (01/04/2012).
65. Tabernero de Paz, M.J; et al; (2013). Agua electrolizada como higienizante y producción animal. Efectos en sanidad y productividad. Instituto Tecnológico Agrario-Subdirección de Investigación y Tecnología. Junta de Castilla y León. Finca Zamadueñas. Valladolid. España,61, pg. 13-23
66. Tanaka, H; et al.(1996). Antimicrobial activity of superoxidized water. *Journal of Hospital Infection*. 34, pg.43-49
67. Terbera J.G.(2005). Tejido Hematopoyetico. Origen de la medula ósea.6; pg.1-11
68. Tortora Gerard J. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.pg. 510-550
69. Thibodeau Gary A. (2008). Estructura y función del cuerpo humano. Elsevier España. 13 ; pg.350-420
70. Venkitanarayanan K. S ; et al.(1999). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 65, pg. 4276-4279.
71. Zamora Gonzales Luis M. (2009). Sangre y Hematopoyesis. *Revista ADM*.15; pg. 20-33
72. Zinkevich V, et al.(2000). The effect of super-oxidized water on *Escherichia coli*. *J Hosp Infec*, 46, pg.153-156.
73. NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos Generales de Análisis- Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas.
74. COFEPRIS-05-022-A Servicios de desinfección.