



57  
2ij

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUTITLAN"

DETERMINACION DE VALORES NORMALES DE  
LINFOCITOS T y B CON ANTICUERPOS  
MONOCLONALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
LAURA LETICIA ZAMORA GOMEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1987



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE GENERAL

Objetivos.....	1
Introducción.....	2
Generalidades.....	3
Anticuerpos Monoclonales.....	16
Materiales y métodos.....	30
Resultados.....	36
Análisis Estadístico de resultados.....	42
Tablas de referencia.....	45
Gráficas.....	46
Discusión.....	52
Conclusiones.....	54
Vocabulario.....	56
Bibliografía.....	57

### OBJETIVOS

- 1.-Establecer un cuadro de valores normales para Linfocitos T y para Linfocitos B
- 2.-Estudiar la relación Linfocitos T cooperadores y LinfocitosT supresores
- 3.-Determinar la relación existente entre la Inmunidad Humoral y la Inmunidad Celular
- 4.-Valorar si la técnica ofrece resultados confiables

## INTRODUCCION

Día con día la ciencia avanza y se enriquece con la introducción de nuevas técnicas que aporten mayor exactitud y confiabilidad al laboratorio clínico.

La técnica de los Anticuerpos Monoclonales ha provisto al campo de la ciencia médica una nueva metodología, en el diagnóstico de un sin fin de enfermedades ya sean causadas por virus, parásitos ú otros microorganismos.

De interés especial a abierto nuevas puertas para detectar anomalías del Sistema Inmunológico; con este último punto - es posible detectar enfermedades que al ser visualizadas a tiempo eviten que el proceso como tal se agrave a un punto en el cual sea menos posible poder combatirlo.

La técnica goza de gran aceptación y día con día es mayor el número de Anticuerpos Monoclonales producidos contra células específicas, entre estas podemos contar las siguientes: Linfocitos T (con sus respectivas subpoblaciones: cooperadores- y supresores), Linfocitos B, Leucocitos, Polimorfonucleares (PMN) y células cancerosas, etc.

La importancia de evaluar tanto Linfocitos T como B radica en que estas células como tales y en asociación proveen al organismo de las principales defensas para protegerse ante un organismo extraño.

## GENERALIDADES

### ANTECEDENTES HISTORICOS

La Inmunología como ciencia relativamente joven, se inició como una rama de la Microbiología y su estudio se relaciona en un principio con la capacidad de resistencia a las enfermedades infecciosas. Las primeras observaciones escritas conocidas se basan en la sospecha de que las personas recuperadas de ciertas enfermedades no podían de nuevo padecer la misma enfermedad.

Antes de nuestra era existen datos de que los chinos intentaron crear mecanismos de protección contra la viruela, esto mediante la inoculación del líquido vesicular de personas que habían sufrido de formas leves de viruela -- buscando a propósito el contacto con individuos enfermos.

Fucidides señala que en una epidemia de fiebre tifoidea pa decida hace unos 2500 años el miedo al contagio trajo como consecuencia que enfermos y moribundos fueran desatendidos y el poco cuidado que recibieron fué proporcionado por parte de aquellos que ya se habían recuperado por lo que no hubo ningún individuo que fuera atacado por segunda vez con resultados fatales (8,14,20)

En 1721 Lady Mary Wortley Montagnu introduce en Inglaterra el proceso de inoculación.(14) Sin embargo fué hasta finales -- del siglo XVIII en que el méico inglés Jenner (1876), quién observó que las personas que se infectaban con la viruela de vacas quedaban protegidas cuando surgía un brote epidémico de viruela en la vecindad, para esto se inoculó a un joven sano con la pus procedente de una lesión de una muchacha ordeñadora que padecía la viruela vacuna. Semanas después, el joven fué inoculado con pus infectado que provenía de un enfermo con viruela y

el resultado fué de que el muchacho no sufrió la enfermedad, a partir de esta experiencia se acuña el término de vacunación - (del latín vacca-vaca). A pesar de esto es hasta casi un siglo después con Louis Pasteur (1878-1880) en que estas aportaciones tienen un enfoque científico, como resultado de sus trabajos sobre el cólera de polluelos. El inoculó varios animales con un cultivo viejo del agente infeccioso (Pasteurella avisépica) y observó que los pollos no padecían la enfermedad.

De esto se pudo demostrar que los cultivos viejos perdían la virulencia pero retenían la capacidad para inducir la protección contra el cólera. (3,8,14,39)

En 1885 Louis Pasteur aplica con éxito la vacuna antirrábica a Joseph Meister. (39)

Estas investigaciones sobre mecanismos protectores conducen en 1888 a Richet y Héricourt a establecer que la sangre de un animal inmunizado con estafilococos confiere protección parcial contra la posterior inoculación con estos microorganismos. (14)

En 1892 el zoólogo ruso Elie Metchnikoff realiza un experimento que se considera el punto de partida de la Inmunidad Celular introduce una espina de rosa en el interior de una larva de estrella de mar para estudiar el papel de las células móviles en esta larva transparente y observa que unas horas después la espina se encuentra rodeada de células móviles. (14)

Por otra parte Koch y Neisser ya habían mencionado que las bacterias pueden localizarse en el interior de los leucocitos - que de hecho habían engullido a los microorganismos y surge el término fagocitosis, principal mecanismo de defensa inespecífico, en el cual dos tipos principales de leucocitos se encuentran involucrados, los polimorfonucleares (PMN) y los macrófa-

gos.(14,36)

Virchow en 1871, considera que la inflamación es debida a cambios en las células del tejido conjuntivo debido a depósitos anormales de productos metabólicos. Cohnheim y Arnold discutieron que la inflamación era una lesión vascular debida a un agente nocivo que permitía que las células sanguíneas penetraran en el interior de los tejidos. (14)

Metchnikoff que había observado este fenómeno en animales inferiores en la escala zoológica los cuales carecen de vasos sanguíneos, afirma que la diapedesis en animales superiores en la escala zoológica era un proceso de penetración activa de estas células a través de las paredes de los vasos. (14,24)

Años más tarde, en 1890 se observa que también podía presentarse inmunidad en ausencia de células. En 1891 Behring y Kitasato demostraron que la actividad antitóxica neutralizante de sueros de animales inmunizados con toxina diftérica ó tetánica lo cual fue la primera prueba de la Inmunidad Humoral. En este período también se introduce el término antígeno para designar cualquier sustancia capaz de inducir alguna reacción contra sí misma y el término anticuerpo para designar el factor presente en el suero que poseía esta actividad. (14,16,39)

Es hasta 1938 en que con el trabajo de varios investigadores surgen nuevos conceptos, tales como el estudio de los llamados anticuerpos incompletos (por Coombs), la técnica de Inmunofluorescencia en 1941 desarrollada por Coons que permite el estudio "in situ" a nivel celular. (39)

Muchos otros investigadores contribuyeron para asentar lo que ahora son las bases de la Inmunología, únicamente se han mencionado aquellos que iniciaron esta novel ciencia. (8,14,20)



## EL SISTEMA INMUNE

### 1) Definición

Cada vez que una sustancia extraña (antígeno) penetra al organismo, se lleva a cabo una serie de mecanismos para neutralizar a estos invasores que varían desde: virus, bacterias, hongos, protozoarios. Para llevar a cabo esta eliminación existen una serie de células que tienen la capacidad de reconocimiento en los vertebrados esta función reside en el sistema inmunitario. (20,31)

Este sistema es sumamente complejo, no cuenta con una estructura localizada sino que se encuentra distribuido en todo el organismo y puesto que posee componentes en torrente sanguíneo y linfa es capaz de actuar casi en cualquier tejido. (31)

### 2) Organización

El sistema inmune está relacionado con el tejido linfático por lo que se conocen órganos linfoides primarios y órganos linfoides secundarios.

Entre los órganos linfoides primarios se encuentran el Timo, la Bolsa de Fabricio (en aves), y su análogo Placas de Peyer situadas en el intestino delgado (en mamíferos), en estos órganos los Linfocitos son "instruidos" para poder reconocer de forma específica un antígeno determinado. (14,31)

En los órganos linfáticos secundarios, los Linfocitos al reconocer su antígeno ven estimulada su diferenciación terminal.

Las células B se transforman en células plasmáticas encar-

gadas de la producción de anticuerpos (Inmunidad Humoral) y las células T en células efectoras (Inmunidad Celular). Ambos tipos también se diferencian en células de memoria.

## 2.1) Organos linfoides primarios

El Timo es un órgano que deriva del endodermo de la 3a. 6--4a. bolsa branquial. Constituye una mezcla de células epiteliales y linfocitos (denominados timocitos). (2,4)

Este órgano crece progresivamente durante la vida fetal y neonatal, con el tiempo se atrofia gradualmente (involución) ó de forma grave después de la infección ó el stress (involución--accidental). (8)

En el adulto el Timo está formado por varios lóbulos conteniendo cada uno una corteza y una médula. La corteza es la parte más voluminosa, en esta porción las células T inmaduras (pre-cursoras) derivadas de una célula madre de médula ósea, tienen una diferenciación paulatina y se convierten en células T maduras, para pasar a la porción medular donde son expulsadas al torrente sanguíneo ó linfático para conservarse "almacenadas". (3, 8,14,16)

La diferenciación terminal que sufren estas células en el Timo parece estar sujeta a la regulación de ciertas hormonas ó factores sintetizados por células epiteliales, una de estas hormonas es la "timosina", la cual ha sido purificada de tejidos tímicos, conteniendo 108 residuos de aminoácidos, y es rica en aminoácidos ácidos. (14)

La Bolsa de Fabricio es también un órgano linfoepitelial localizado cerca de la cloaca, al igual que el timo este órgano se atrofia con el paso del tiempo, su principal actividad está relacionada con el desarrollo de células inmunocompetentes destinadas a llevar a cabo la producción de anticuerpos específicos.

El equivalente de la Bolsa de Fabricio en mamíferos lo--  
constituyen las llamadas Placas de Peyer en el intestino del-  
gado, en estas circulan dos clases de linfocitos: pequeños --  
linfocitos y grandes linfocitos (linfoblastos) es probable --  
que estos se originen en el tejido asociado al intestino, que  
después estas células vayan a vasos secretores y pore último-  
den origen a células plasmáticas.(14,16)

## 2.2)Organos linfoides secundarios

El Bazo es un órgano vesicular encapsulado, pesa aproxi-  
madamente entre 200gramos en una persona adulta, su principal  
función es captar los antígenos transportados por la sangre.

La estructura histológica de este órgano comprende una -  
zona denominada corteza que está infiltrada por linfocitos y  
una zona medular en la cual las células linfoides ocupan los  
espacios vasculares. (8)

En el bazo la zona medular recibe el nombre de médula ro-  
ja, asu vez esta contiene zonas corticales que reciben el nom-  
bre de médula blanca. En esta última existen zonas de linfo-  
citos T y B distinguibles, las zonas T son pequeñas en rela-  
ción a las zonas B, al recibir un intenso estímulo antigénico  
las células T son sustituidas totalmente por células plasmáti-  
cas. (8,31)

Existe también tejido linfoide asociado al intestino, es  
te está integrado por pequeños agregados de linfocitos y célu-  
las plasmáticas los cuales se encuentran a lo largo de las ca-  
pas internas de las paredes del mismo. Entre estas estructu-  
ras linfoepiteliales tenemos a las amígdalas (pared faríngea)  
apéndice (estructura que une al intestino grueso con el intes-  
tino delgado). Al igual que los otros órganos linfoides an-  
tes mencionados este también sufre involución a medida que -  
envejece el organismo. (8,14,31)

### 3) Inmunidad

El término Inmunidad se define como el estado de resistencia de un organismo respecto a un germen, generalmente por tener anticuerpos específicos para este germen. (24)

Por consiguiente las células de mayor importancia en la inducción de la respuesta inmune son los linfocitos, para tal efecto se consideran dos clases de linfocitos: B y T, cada uno de ellos posee funciones específicas pero relacionadas entre sí. (8,14,16,36)

Los linfocitos B por sí mismos no tienen capacidad para producir anticuerpos, el poseer receptores para antígenos particulares en su superficie facilita que el antígeno se una a este sitio receptor. Entre estos sitios receptores se encuentra uno específico para complejos antígeno-anticuerpo ó inmunoglobulina agregada, este receptor parece ser hábil para un sitio de la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina y se le conoce como receptor Fc.

Otro tipo de receptor para el tercer componente del complemento se detecta en algunas células B usando eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpo y complemento.

Existe un tercer tipo de receptor para antígenos de histocompatibilidad (HLA). (3,16)

Como se dijo anteriormente el antígeno al unirse a alguno de estos sitios receptores estimulan a la célula para dividirse y que las células hijas se transformen en células capaces de producir anticuerpos, a esta progenie se les denomina células plasmáticas, que además poseen las características de la memoria inmunológica.

Existen un sinnúmero de antígenos que pueden ser reconocidos por los linfocitos, para explicar como puede ocurrir esto hay tres principales teorías:

La Clonal

La Instructiva

### y La Selectiva

La Teoría de la Selección Clonal fué elaborada por Burnet (31), según él cada linfocito ya tiene la información para sintetizar un anticuerpo específico. La Teoría Instructiva basada en las ideas de Ehrlich supone que el antígeno actúa como un molde y en base a esto se forman los anticuerpos y por último la Teoría Selectiva en la cual se involucra el aparato genético para producir anticuerpos cuando entra un antígeno con esto se selecciona el gen para la producción del anticuerpo deseado. (31)

Se han identificado cinco tipos de inmunoglobulinas: IgA, IgG, IgD, IgM e IgE, estas son glicoproteínas constituidas por 82-96% de polipéptidos y 4-18% de carbohidratos. (14,16)

Según el modelo de Porter están formadas por una unidad básica de cuatro cadenas, 2 cadenas pesadas (H) de alto peso molecular 50000-70000 daltons y 2 cadenas ligeras (L) del bajo peso molecular 25000 daltons, estas cadenas se encuentran unidas mediante puentes disulfuro, a su vez existen también puentes disulfuro entre cada cadena pesada y ligera respectivamente. Cada cadena posee una región variable (V) y una región constante (C) en las cuales la secuencia de aminoácidos varía ó se mantiene constante respectivamente. (14,16)

El tratamiento de las inmunoglobulinas con enzimas proteolíticas ha permitido la obtención de los fragmentos de las moléculas de estas proteínas. En general la papaína rompe la molécula de inmunoglobulina en tres fragmentos. Los dos primeros se conocen con el nombre de Fab (antigen binding fragment) y un tercer fragmento Fc (crystallizable fragment); los dos primeros como su nombre lo indica se combinan con el determinante antigénico de la molécula antigénica, al tercer fragmento ó Fc se unen las proteínas del sistema complemento, algunas

células poseen en su superficie receptores para este fragmento

Cada tipo de inmunoglobulina posee funciones y características específicas:

La IgG es la más abundante con relación a las otras inmunoglobulinas, se encuentra en una proporción de 80%, tiene un peso molecular de 150,000 daltons y presenta una configuración estructural monomérica. La IgG tiene a su vez cuatro subclases  $IgG_1$ ,  $IgG_2$ ,  $IgG_3$  e  $IgG_4$ . Las subclases 1 y 3 son activadoras del sistema complemento por la vía clásica.

La IgA se encuentra en suero, tiene un peso molecular de 160000 puede polimerizarse dando polímeros de ocho y doce cadenas. La IgA secretoria contiene dos componentes adicionales: el componente secretorio y la cadena J, esta última se halla asociada a todas las formas poliméricas de las inmunoglobulinas que contienen dos ó más unidades básicas. La IgA es un anticuerpo que proporciona el mecanismo de defensa primario contra la infección local debida a su abundancia en saliva, lágrimas y mucosas en general. (14,17)

La IgD es un monómero también, con un peso molecular de 180000 daltons se presenta en suero en una proporción de 0.2% predomina en la superficie de linfocitos B humanos.

La IgE posee un peso molecular de 190000, se presenta en una proporción de 0.004% del total de las inmunoglobulinas séricas. Existe sólo en forma monomérica, es importante en reacciones de tipo alérgico, una vez que se une al antígeno la porción Fc es reconocido por células cebadas (degranulación y liberación de aminas vasoactivas) se les denomina por lo tanto alérgenos. La IgM constituye aproximadamente un 10%, es además la más grande las inmunoglobulinas debido también a la cadena J al ser un pentámero posee 10 valencias, por lo cual puede

de reaccionar hasta con diez determinantes antigénicos. (14,31).

La Inmunidad Celular enfoca a los procesos inmunes mediados por células entre los de mayor importancia están los macrófagos y los linfocitos T. Estos dos tipos de células al igual que otras muchas provienen de una célula precursora pluripotencial. (3,14,20)

Los macrófagos actúan como efectores finales del sistema de amplificación de diversos mecanismos inmunitarios. Entre sus principales funciones se encuentra la de poder fagocitar y destruir a las células recubiertas de anticuerpos y complemento. (22)

Por otro lado, debido a la actividad quimiotáctica de las linfocinas, los macrófagos son atraídos a los sitios de inflamación en los tejidos y así participan en el proceso de neutralización del antígeno. (15)

Los macrófagos no reconocen específicamente al antígeno - debido a que no cuentan con receptores propios, sino que se activan con los antígenos específicos, por medio de reacciones - linfocíticas ó del anticuerpo. (22)

Otra de sus funciones es la de intervenir en los mecanismos de cooperación celular, esto es, el macrófago al encontrarse con el antígeno se une a él y lo procesa "presentándolo" al linfocito B.

Determina además cuales células T se verán estimuladas - para ponerse en función por diferentes antígenos y se cree - que son capaces de secretar mediadores biológicamente activos que regulan la respuesta mediada por linfocitos T y B. (3,20)

La otra estirpe celular que interviene en este tipo de -- respuesta son los linfocitos T. Intervienen en la cooperación

celular con linfocitos B en la respuesta a ciertos antígenos, las células B cooperan con las T para activar la respuesta, es decir, la producción de anticuerpos.

Los Linfocitos T constituyen una población muy variada -- compuesta por linfocitos T efectores ("killer" y los que intervienen en las respuestas de hipersensibilidad retardada) y los linfocitos T reguladores (cooperadores y supresores).

Las células del sistema inmune maduran independientemente a pesar de que provienen de un tronco celular único. Las principales características que diferencian a los linfocitos B de los T, es la de poseer receptores específicos tales como el antígeno V(theta) en ratones y que se conoce actualmente como antígeno Thy. (3,31)



#### 4) Sistema Complemento

El Sistema Complemento interviene en la destrucción y eliminación de antígenos, este sistema está constituido por una serie de proteínas plasmáticas, veinte según Neil Cooper. (39)

Estas interactúan entre sí, con un anticuerpo determinado formando complejos inmunes circulantes sobre las membranas celulares, estas proteínas se encuentran en circulación en formas inactivas y al activarse por una serie de factores específicos pasan a formar parte de un sistema con activación biológica que va desde la lisis celular, la opsonización y la quimiotaxis.

Existen dos mecanismos ó vías de activación de este sistema, la Vía Clásica y la Vía Alterna ó de la Properdina. La secuencia de la activación de los componentes de este sistema se ha denominado de tipo "cascada" debido a que implica una sucesión de procesos enzimáticos que se dan a partir de la transformación de cada uno de los componentes individuales y que regulan de tal forma que cada etapa no puede producirse hasta que la precedente ha concluido. (14,39)

La Vía Clásica es activada por complejos antígeno-anticuerpo (ag-ac) principalmente, mientras que la Vía Alterna puede ser activada por la presencia de lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos ó agregados de inmunoglobulinas (Ig), de células infectadas por virus y parásitos. (31,39)

#### 5) La Respuesta Inmune

El Sistema Inmune al hallarse en contacto por primera vez con un antígeno desencadena una serie de mecanismos.

Los macrófagos como ya se dijo anteriormente, juegan un -

papel importante en la inducción de esta serie de acontecimientos, su principal función radica en "presentar" el antígeno al linfocito, ya sea B si la respuesta es de tipo timo-independiente ó al linfocito T si la respuesta es timo-dependiente.

En el primer tipo de respuesta el macrófago procesa al antígeno directamente, lo presenta al linfocito B, el cual al tener contacto con el antígeno sufre una diferenciación y se transforma en una célula plasmática, que es sintetizadora y secreta de los anticuerpos específicos para dicho antígeno. En el tipo de respuesta timo-dependiente, tanto el linfocito T como el B tienen contacto a través del antígeno Ia que es un receptor específico para el antígeno, lo ligan y de igual manera se da la producción de anticuerpos.

De manera general la respuesta inmune es siempre de dos tipos: Primaria y Secundaria. (19,36)

En la Respuesta Primaria el antígeno se pone en contacto por primera vez con el Sistema Inmune, por lo tanto desencadena la producción de anticuerpos, durante este período la concentración de anticuerpos es baja y crece exponencialmente hasta llegar a un punto en el cual permanece constante y luego declina rápidamente, en este tipo de respuesta el anticuerpo predominante es de tipo IgM, dándose con esto la formación de células de memoria y células efectoras. En la Respuesta Secundaria el título de anticuerpos es mucho mayor y se da más rápidamente debido a que hay células de memoria y efectoras, el anticuerpo predominante es de tipo IgG. (14,36)

### Anticuerpos Monoclonales

La búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico, ha hecho -- que las técnicas inmunológicas se perfeccionen, y lograr con -- esto una mayor sensibilidad y confiabilidad.

Los anticuerpos constituyen un excelente reactivo inmunológico ya sea en forma de sueros hiperinmunes ó globulinas gamma purificadas.

Al llevarse a cabo la Respuesta Inmune existe la produ--- cción de un sin fin de moléculas de anticuerpos que aparecen -- como resultado de la estimulación antigénica y cuya actividad está dirigida contra los diversos determinantes antigénicos -- presentes en el antígeno. Existen como ya se mencionó cinco clases de Inmunoglobulinas (anticuerpos), cada una de ellas -- aportan especificidades diferentes es decir, una respuesta policlonal.

Durante mucho tiempo se buscó el producir anticuerpos específicos y es hasta 1975 cuando Milstein y Köhler publican un trabajo donde se describe la producción de anticuerpos con especificidad restringida. (26,27)

Esta técnica se basa en la fusión de células de mieloma -- de ratón (neoplasia de células plasmáticas) con las células de bazo de un ratón inmunizado con tra un antígeno particular. El resultado de esta fusión es un híbrido ó hibridoma que posee dos características sumamente importantes: la producción de cé anticuerpos específicos y el carácter inmortal de la línea celular, de crecer en un medio de cultivo; propiedades de las cé lulas linfoides y las células de mieloma respectivamente.

Para llevar a cabo esta fusión se utilizaba en un principio el virus Sendai atenuado como agente fusionante, aunque más tarde Galfré introduce la utilización de polietilenglicol (PEG), debido a las ventajas que representaba, como podrían --

ser menor costo, facilidad de obtención, además de la seguridad de que debido a algún cambio brusco ya sea físico ó químico el virus pueda recuperar su capacidad de reproducción. (26)

Como tal, esto parece sencillo pero pueden surgir complicaciones entre las cuales destacan las representadas por las células de bazo debido a que de cada cien células sólo una es formadora de anticuerpos; de estas anteriores sólo una de cada cien se va a fusionar, una de cada cien de las células que lograron fusionarse producirá anticuerpos y de estas, una de cada diez produce el anticuerpo específico contra el antígeno que se inoculó.

La explicación de esta selectividad no ha sido completamente establecida pero se cree que puede deberse a dos factores:

a) El primero está dado por la célula de memoria original ya que esta parece ser la que aporta la maquinaria necesaria para producir el anticuerpo, dado que el linfocito no los secreta normalmente en la formación de híbridos.

b) La segunda es que las células B pueden aumentar la formación y vida de híbridos. (13,27)

Explicadas estas dificultades y las características de células involucradas en esta reacción, es posible entender la técnica que se lleva a cabo.

La célula de mieloma no es capaz de producir anticuerpos con especificidad por si misma y carece de la enzima Hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGFRT), la cual convierte a la hipoxantina en la base precursora del DNA, por medio de la vía metabólica llamada de "salvación". Esta vía suele no funcionar a menos que la vía normal se encuentre bloqueada con aminopterina. Estas células mueren además en un medio se-

lectivo llamado HAT (que contiene aminopterina, hipoxantina y timidina). (14,26,27)

Las células productoras de anticuerpos provienen de un ratón inmunizado contra el antígeno contra el cual se desean obtener los Anticuerpos Monoclonales. Estas células si sobreviven en medio HAT por tener intacta la vía de "salvación" pero por ser una célula normal muere después de unos días en cultivo primario.

En la fusión como ya se mencionó se mezclan células de bazo con las de mieloma, se centrifugan y el paquete celular se resuspende agregando polietilenglicol (PEG). Esto durante un tiempo de cinco minutos, los hibridomas formados se pasan a microcultivos que se mantienen en medio HAT durante un lapso de cuatro semanas.

En este período mueren las células no fusionadas y los hibridomas homólogos, por la característica de ser normales ó de carecer de la enzima HGFRT. Las únicas células que sobreviven son, las formadas por una células de mieloma con una célula normal.

El siguiente paso es detectar si en el sobrenadante de egtos microcultivos existe el anticuerpo con la especificidad deseada. Las clonas que resulten ser positivas se expanden y se someten a un procedimiento de clonación por dilución limi---tante, ó sobre agar blando. Las clonas productoras de altos títulos del anticuerpo deseado se expanden y una parte se congela.

Con esto el anticuerpo monoclonal puede ser producido en grandes cantidades ya sea por cultivo masivo del hibridoma, recuperándolo del sobrenadante de 20 a 80microgramos/mililitro, del anticuerpo monoclonal ó por inoculación del hibridoma a ratones provocando con esto la aparición de un tumor, recuperándose del suero y del líquido ascítico del ratón de 1 a 20mili-

gramos del anticuerpo monoclonal. (13,26,27,39)

Es importante mencionar que las células híbridas derivadas por cada una de las diferentes líneas secretan moléculas de inmunoglobulinas hechas por una combinación de cadenas ligeras y pesadas de cada una de las moléculas originales. (26,27)

Para la obtención de una mayor cantidad del anticuerpo monoclonal se deben considerar las características antes mencionadas así como una inmunización intraesplénica lo cual garantiza en un mayor porcentaje que el inmunógeno utilizado actuará directamente en el lugar deseado, a esto puede aunarse la acción ejercida por un adyuvante (como el adyuvante completo de Freund's). (28)

Los protocolos de inmunización son muy variados, después de la obtención de células de bazo, la técnica a seguir para la obtención es la descrita con anterioridad.

Los resultados obtenidos recurriendo a esta vía de inoculación confieren la localización de una alta concentración del antígeno en cuestión en el órgano blanco elegido, con esto la obtención de células B es mayor y la especificidad conferida a los hibridomas resultantes después de haber llevado a cabo la fusión con las células de mieloma es mayor. (28)

En cuanto a la obtención de hibridomas distintos estudios han sugerido que una post-dilución de los hibridomas formados por la técnica de Köhler y Milstein, disminuyen la sobrevivencia de dichas células híbridas.

Además que esta sobrevivencia disminuye conforme la dilución de tales células aumenta. Esto tienen una posible explicación puesto que tanto las células de bazo como las de mieloma, aportan al medio de crecimiento factores que contribuyen a que las células híbridas sobrevivan. Al realizar una dilución del cultivo, estos factores disminuyen y no son capaces de ser

aprovechados por las células, al igual que si se encontraran en una concentración óptima ó bien posiblemente debido a que al aumentar la dilución, disminuye la concentración y las sustancias tóxicas del medio que antes eran neutralizadas por estas células ya no lo son.

Por lo que cabe reiterar que para la obtención de híbridos en cantidad adecuada la concentración de las mismas es sumamente importante. (10)

Con el paso del tiempo han surgido una serie de laboratorios que producen anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades entre los que destacan Ortho Diagnostics, Boehringer y Becton Dickinson, este tipo de anticuerpos se conoce más comúnmente como las series OK, BMA's y Leu respectivamente. (2,10)

Los anticuerpos monoclonales son de gran utilidad debido a sus múltiples aplicaciones, a pesar de esto, existen una serie de desventajas que deben ser consideradas para su utilización. (13,18)

La más importante de ellas es que un anticuerpo monoclonal sólo responde a un determinante antigénico por molécula de antígeno por lo tanto no puede dar reacciones de precipitación con el mismo, esto causa que las técnicas de detección de los anticuerpos monoclonales no se fundamente en las versátiles -- técnicas de precipitación.

Otra desventaja la constituye el hecho de que una línea celular establecida, puede dejar de un momento a otro, de producir el anticuerpo monoclonal no pudiendo recuperarlo. Además es importante hacer notar que hasta la fecha sólo han podido obtenerse anticuerpos monoclonales de ratón, lo cual provoca ciertas complicaciones cuando se quieren usar este tipo de

anticuerpos con fines terapéuticos. (13,27)

Entre las múltiples aplicaciones de los anticuerpos monoclonales, destacan aquellas ofrecidas en Medicina, Biología, Inmunoquímica y Farmacología entre otras.

- a) Este tipo de anticuerpos son usados contra antígenos tumorales prácticamente enfocada hacia el estudio del cáncer.
- b) Existen también anticuerpos monoclonales contra microorganismos parásitos, problemas de diagnóstico y producción de vacunas.
- c) Anticuerpos contra neurotransmisores, con esto ha podido detectarse la presencia de la sustancia P, aunado a la -- utilización del radioinmunoanálisis. (18,21)
- d) Una más de sus aplicaciones la constituye la utilización contra antígeno de diferenciación, debido a que han podido obtenerse anticuerpos monoclonales contra leucocitos humanos, que reconocen específicamente a macrófagos, linfocitos T, células citotóxicas naturales, neutrófilos y linfocitos B. Inclusive han podido obtenerse anticuerpos monoclonales contra subpoblaciones de linfocitos T (cooperadores y supresores). (21)

Sobre esta última aplicación se basa el motivo de este estudio, la característica de reconocimiento de las células B y T (subpoblaciones) por anticuerpos monoclonales, se basa en la presencia de antígenos de superficie celular.

Para linfocitos T tenemos que estos expresan antígenos tales como T1, GIX, LyT 1,2,3. El primero de estos se expresa en linfocitos que se originan de células T, el antígeno GIX en células infectadas y transformadas por los virus de las leucemias del ratón y los últimos se localizan en la superficie de los linfocitos T maduros. Estudios realizados en ratones han



permitido distinguir tres diferentes subpoblaciones de linfocitos T a causa de la variación de sus antígenos de superficie ó basándose en la aparición de los antígenos LyT.

- 1) Antígenos LyT-1<sup>+</sup>, han podido distinguirse en un 40% de células T, se piensa que esta subpoblación involucra principalmente a células T cooperadoras, las cuales promueven la producción de anticuerpos por medio de células B (células plasmáticas), además cooperan con el desarrollo de células T citotóxicas.
- 2) LyT-2,3<sup>+</sup>, se encuentran en un 20% de células T y agrupan tanto a células T supresoras como células T citotóxicas.
- 3) LyT-1,2,3<sup>+</sup>, se encuentran en un 50% de células T, conteniendo además a los precursores celulares LyT-2,3<sup>+</sup>.

Debido a esta diferenciación antigénica se dan las estirpes celulares ya conocidas, células T cooperadoras LyT-1<sup>+</sup> las cuales transmiten señales a la población precursora LyT-1,2,3<sup>+</sup> esto genera a su vez una creciente actividad supresora dada -- por las células LyT-2,3<sup>+</sup> que sirve para regular a las células T cooperadoras y así controlar la síntesis de inmunoglobulinas.

La actividad de células T cooperadoras (LyT-1<sup>+</sup>) se da a -- partir de dos señales las cuales están mediadas por células T accesorias. La primera señal es la presentación adecuada del antígeno al linfocito T, la segunda es la liberación de sustancias solubles por parte de células accesorias para la actividad completa de células T. Entre los marcadores superficiales para linfocitos B se encuentran el Ia, MBLA, receptores para Fc y C3 y más característicamente los marcadores para inmunoglobulinas. Las principales subpoblaciones funcionales de linfocitos B se clasifican a partir de las distintas clases de in

munoglobulinas que secretan.

Dadas estas características superficiales antigénicas la finalidad de los anticuerpos monoclonales, es reconocer estos sitios activos, tenemos entonces que el anti-T1 es un anticuerpo monoclonal que reacciona con un 100% de células periféricas y 10% de timocitos, anti-T3 tiene igual tipo de reconocimiento que el anterior. Anti-T4 reacciona con 75% de timocitos y 60% de linfocitos T periféricos (T cooperadoras). Anti-T5 y 8 con 80% de timocitos y 20-30% de células T periféricas y es típico además de células T supresoras y citotóxicas y por último el anti-T6,9,10 que reaccionan casi exclusivamente con timocitos.

Las subpoblaciones T4 y T5<sup>+</sup> constituyen de 80-90% de células T de sangre periférica. Las células T de tipo inductor predominan en médula tímica, sangre, paracorteza de amígdalas y lámina propia intestinal. Existe también un anti-B el cual reconoce casi en un 100% a las células maduras, acerca de este último se tiene muy poca información.

La mayoría de los estudios realizados se han encaminado a analizar tres principales tipos de subpoblaciones de células T y células B mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Principalmente se han producido anticuerpos monoclonales a los antígenos T4 (anti-T4), que reaccionan con la población de células inductoras, mientras que un anticuerpo monoclonal al antígeno T5 (anti-T5) es reactivo a la población citotóxica supresora. Algunos autores consideran a las células Null (natural killer) como una subpoblación de las células T debido a su gran similitud en cuanto a características morfológicas.

Varios estudios se han encaminado a la demostración de los antígenos de superficie en células T y B por medio de anticuerpos monoclonales, esta técnica es apoyada por otras técnicas

cas inmunológicas, puesto que es de carácter reciente. Por medio de Inmunofluorescencia e Inmunoprecipitación sobre geles - de policrilamida dodecilsulfato de sodio, ha podido demostrarse que las células T poseen el antígeno T4 y que están constituidas por una glicoproteína simple de 62000 daltons, mientras que los antígenos T5 son complejos de dos glicoproteínas una - de 30000 y otra de 32000 daltons, respectivamente. (2)

La aparición de estas bandas sobre el gel de inmunoprecipitación depende de las condiciones de la muestra. (2,35)

Probada la existencia de estos antígenos y para poder comprender el fundamento de la técnica utilizada (inmunofluorescencia indirecta) es necesario conocer la morfología de las células linfoides.

En base a estudios morfológicos realizados en linfocitos en los cuales se considera la interacción de estas células con otras.

Los linfocitos se encuentran recubiertos superficialmente de microvellosidades, al verificarse la exposición correspondiente se lleva a cabo una redistribución de estas microvellosidades en las partes cercanas al lugar de contacto, a medida que transcurre el tiempo estas microvellosidades van perdiéndose ó envejeciendo con lo cual disminuye su actividad lo que -- provoca que el lugar de exposición no funcione como normalmente debería. (32)

Un ejemplo básico de este fenómeno es la Transformación - Blastoide durante la cual la estimulación con fitohemaglutinina provoca la formación de pliegues y surcos irregulares en la superficie linfocitaria debido a la intensa actividad de la -- membrana. (32)

La técnica involucrada se basa en estas características - puesto que debido a estas microvellosidades existentes se da

la interacción entre el linfocito y el anticuerpo monoclonal correspondiente.

Uno de los puntos principales para un buen desarrollo de la técnica lo constituye la buena separación de las células mononucleares para lo cual se utiliza un gradiente de densidad -- con Ficoll-Hypaque que toma en cuenta las siguientes características: la purificación de linfocitos se logra aprovechando las diferentes densidades de las células sanguíneas, así centrifugadas sobre una mezcla de Ficoll-Hypaque (isotónica y no citotóxica) cuya densidad es de 1.076-1.078 y muy cercana a la promedio de los linfocitos, con esto los eritrocitos y los polimorfonucleares se depositan en el fondo mientras que los linfocitos -- permanecen cercanos a la interfase de la solución separadora y el plasma.

Para valorar que tan eficaz es la técnica involucrada en el estudio correspondiente se han recopilado investigaciones anteriores.

En cuanto a lo que respecta a la técnica como tal se proponen variaciones de temperatura y tiempo en cuanto al manejo de la misma.

Los principales cambios efectuados ofrecen observaciones -- tales como que las células una vez que son separadas deben trabajarse al momento (exposición en este caso con el anticuerpo -- monoclonal específico) dado que ha medida que transcurre el --- tiempo la eficacia de los determinantes antigénicos del linfocito para ligar el anticuerpo monoclonal disminuye. Aunque esta disminución es un poco menor a la observada cuando la sangre -- completa es almacenada y trabajada a diferentes tiempos, cada -- uno con su previa separación de células mononucleares.

La variación de la temperatura no implica desajustes serios (4°C y temperatura ambiente) aunque en este punto existe

gran discusión entre los investigadores. (10,28)

Las células más afectadas al realizarse estas variaciones son las células T (totales) ó sea las definidas por el anticuerpo monoclonal OKT3 (Ortho Diagnostics) y las células T ayudadoras definidas por el anticuerpo monoclonal OKT4, esto quizá porque los antígenos de superficie son más sensibles, además de -- que cada célula está definida por antígenos de superficie específicos, las características de los anticuerpos monoclonales -- más estudiados se dan en la TABLA I. (30,34,38)

Esto constituye gran controversia debido a que es lógico pensar que si la población T total se ve afectada, las subpoblaciones supresora y cooperadora también lo estarán, esto puede explicarse como se dijo anteriormente, por cambios en la permeabilidad de la membrana, lo que causa principalmente que aumenten ó disminuyan los sitios de exposición de linfocitos al anticuerpo monoclonal.

#### Autoinmunidad

La determinación de los valores normales de linfocitos T y B constituyen una medida práctica para diagnosticar si existe alguna anomalía en el funcionamiento del sistema inmune. Las principales alteraciones se dan a partir de mecanismos sumamente complejos, la mayoría de las veces involucran un desequilibrio en las células que regulan tanto la Inmunidad Celular como la Inmunidad Humoral (linfocitos T y B respectivamente).(31,32)

Un balance inmunológico se da a partir de un equilibrio en

cuanto a función y producción de células B como de células T -- (cooperadoras y supresoras).(31)

El rompimiento del balance anterior trae como consecuencia una inmunodeficiencia que puede denominarse como primaria ó secundaria dependiendo de que tan grave sea la alteración ó el daño presente. (38)

Las principales causas del rompimiento de este balance pueden estar dadas a partir de que los linfocitos no experimentan la diferenciación terminal que los transforma ya sea en células plasmáticas productoras de anticuerpos ó en células mediadoras de la Inmunidad Celular. Otra posible causa es que la arquitectura normal de los ganglios linfáticos haya sido destruida -- ó porque el componente celular normal ha sido reemplazado por una gran cantidad de células tumorales.

Las inmunodeficiencias más comunes son de tipo primario y se caracterizan regularmente por involucrar una disminución de la población celular T asociada a una hiperreactividad de células B, por lo cual es sumamente importante el análisis tanto de células B, como de células T supresoras y cooperadoras. Para el análisis de estas técnicas existen un sin fin de técnicas -- que proporcionan datos favorables para establecer una posible limitación ó defecto en la producción ó función de las mismas -- entre las que podemos mencionar para células B, pruebas con estímulos mitogénicos y para células T determinación de células -- que mueren en cultivos entre las más importantes y una técnica actual: la de los Anticuerpos Monoclonales que permite la identificación de estas células por sus marcadores de superficie en este caso inmunoglobulinas. (12)

Un dato de gran valor es la relación existente entre células T cooperadoras y células T supresoras (relación OKT4/OKT8) obteniendo este valor es posible diagnosticar si el paciente en

estudio posee una inmunodeficiencia o no. Los rangos para definirlo son muy variados (según el autor consultado), van desde el más amplio que abarca de 1.5-4.5%, hasta el más limitado --- 2.5<sup>±</sup>0.5%. (9,15)

Tomando en cuenta el factor anterior, podemos encontrar -- que entre las inmunodeficiencias primarias se hallan enfermedades tales como: Esclérosis múltiple, Síndrome de Wiskott-Aldrich, LES (Lupus Eritematosos Sistémico), William Barré y posiblemente el SIDA(Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida). (9,15,40)

A partir del descubrimiento de los Anticuerpos Monoclonales, innumerables han sido los marcadores que permiten identificar un sin número de líneas celulares procedentes ya sea de linfocitos T y B. (2,33)

Principalmente hacia el estudio de células T y la interacción de estas células con las células B en cuanto a la producción de inmunoglobulinas. Se cree que las células denominadas OKT4<sup>+</sup>, además de la función anteriormente mencionada, proveen las herramientas necesarias para la generación de células citotóxicas y de esta manera regular la función del sistema inmune.

Esta identificación ha sido posible realizarse de acuerdo a la presencia de determinantes antigénicos específicos, en el caso de células citotóxicas por ejemplo, por un antígeno denominado TH2, en este caso más concretamente TH2<sup>+</sup>. (33)

Otras líneas celulares tales como, HSB2, MOLT-4 y CEM son definidas por el antígeno 3A1, presente sólo en células T, más no en células B, aunque este dato es indicativo de la presencia de estas últimas, para probar la presencia de dichos antígenos lo más comúnmente usado son geles de policrilamida (electroforésis) en los cuales se visualiza la existencia de el antígeno por medio de la aparición de una banda específica.(2)

TABLA I

Características	Anticuerpo Monoclonal		
	OKT1	OKT3	OKT4
Clase de Inmunoglobulina	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>2</sub>
Fijación del Complemento	-	+	+
Reactividad con:			
Línea Celular B	-	-	-
Línea Celular T	+	+	+
"          CEM	+	-	-
"          HMI	+	-	-
Porcentaje de reactividad, con:			
Células T periféricas	95	95	55
Células B periféricas	2	2	2
Células Null	2	2	2
Timocitos	5-10	5-10	80

En la TABLA I se reúnen las características de tres de -- los Anticuerpos Monoclonales más estudiados. Los anticuerpos monoclonales denominados OKT1 y OKT3 muestran gran similitud - en cuanto a reactividad con células T periféricas y timocitos, pero pueden distinguirse en cuanto a la reactividad con las diferentes líneas celulares T. En cuanto al OKT4 la reactividad con diferentes células es más notoria.



#### MATERIALES Y METODOS

**Grupo poblacional:** Se eligió para este estudio un grupo de cien personas sanas, entre estudiantes, personal de este - hospital (Hospital General Centro Médico La Raza) y familia-- res sanos, la edad comprendida fluctúa entre los 6 y 35 años, no se consideró el sexo.

**Obtención de células mononucleares:** A partir de 5mls. de sangre heparinizada se obtiene una suspensión enriquecida de - células mononucleares, esto se logra mediante el empleo de un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque(Productos Win-- throp), con densidad de 1.076-1.078.

**Anticuerpos Monoclonales:** Los anticuerpos monoclonales - para este estudio fueron proporcionados por Behrinwerke A.G. - (West Germany) con cinco antisueros distintos:(BMA 010-Leucoci tos Totales; BMA 021-Linfocitos B; BMA 030-Linfocitos T tota-- les; BMA 040-Linfocitos T ayudadores(helper); BMA 081-Linfoci tos T supresores . Posteriormente estos antisueros fueron hi dratados con 1ml. de regulador de fosfatos 0.01M pH 7.4 y adi cionando 5% de suero fetal de ternera (SFT), en alícuotas de - 5ul a (-60°C) hasta su utilización.

**Conjugado de fluoresceína:** El análisis se llevó a cabo con una anti-IgG de ratón conjugada con fluoresceína, esta tam bién fue hidratada con la misma solución de los antisueros y conservada en las mismas condiciones, utilizando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.

### PROCEDIMIENTO

Como primera fase del trabajo se estandarizó el método, el procedimiento fue el siguiente:

Se obtuvieron por punción venosa 5mls. de sangre heparinizada, diluyéndose después este volumen con solución Hank's --- (v/v), cuidadosamente con una pipeta Pasteur. La sangre diluída se depósita en la superficie de 5mls de Ficoll-Hypaque contenida en un tubo de 15 x 150mm, se centrifuga a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 2000 revoluciones por minuto, rpm después de esta centrifugación se recupera el anillo de células mononucleares formado en la interfase.

A esta suspensión de células mononucleares se le agregan 10mls. de solución Hank's suficientes para realizar el lavado de células, se centrifugan durante 10 minutos a 2000 rpm como máximo, esta operación se repite tres veces. En el último lavado se resuspenden las células y se añaden 500ul de PBS-SFT (solución amortiguadora de fosfatos-suero fetal de ternera).

Para estandarizar la técnica es necesario encontrar la -- concentración óptima tanto del conjugado de fluoresceína como de cada uno de los antisueros. Para esto se procedió del siguiente modo: Se llevaron a cabo diluciones en las siguientes proporciones: 1:30, 1:60, 1:120 tanto del antisuero como del -- conjugado de fluoresceína (FC).

Se principió con el antisuero BMA 010 (Leucocitos totales) se tomaron 9 microtubos de plástico de 9 x 40mm, a cada uno de estos se añadieron 50ul de células mononucleares de reciente -- purificación y 50ul del antisuero.

Los 9 microtubos se incubaron a 4°C durante 30 minutos, añadiendo después de este tiempo 500ul de PBS-SFT al 5% y centrifugando a 2000 rpm durante 3 minutos, tirando el sobrenadante, re-- suspendiendo y añadiendo nuevamente 500ul de PBS-SFT para rea-

lizar dos lavados más a las células. De la última centrifugación se tira el sobrenadante, se resuspenden las células, se les agregan a cada tubo 50ul de FC, como se indica en la TABLA (TABLA II).

Las células se incuban nuevamente 30 minutos a 4°C, terminada la incubación se procede a lavar el exceso de FC para lo cual se realizan tres lavados en las condiciones anteriormente descritas. De la última centrifugación se tira el sobrenadante y las células se resuspenden agregando una gota de PBS-SFT-glicerol para evitar que las células se deshidraten durante el tiempo de lectura.

Una gota del primer tubo se coloca en un portaobjetos y se lee a inmersión (100x) en un microscopio para fluorescencia

Se cuentan 100 células indicando por separado cuantas de estas cien células son fluorescentes, dado que este será nuestro parámetro para establecer el porcentaje(%) de células por cada antisuero específico.

El resultado se expresa de cero a cuatro cruces(++++) de intensidad de fluorescencia y de acuerdo a estos datos podremos establecer cual es la dilución más apropiada para trabajar las muestras incluidas en el estudio. Los primeros datos obtenidos se recopilan en la TABLA III.

Con estos datos se tiene la información para delimitar la concentración a usar del FC, esta dilución es de 1:60, por lo cual la misma dilución se empleó con los otros cuatro antisueños. Los datos obtenidos se muestran en la TABLA IV.

Con los resultados anteriores se propone que la concentración de FC sea 1:60 mientras que la de los cinco antisueros po demos determinarla como 1:30. Dado esto se inició el análisis con la muestra poblacional que fue de 100 individuos sanos (59 mujeres y 41 hombres).

Todas las muestras se trabajaron utilizando las mismas -- concentraciones del antisuero y del FC. De cada individuo se tomó una muestra de 5ml de sangre heparinizada, separando las células mononucleares como se describió anteriormente, seguido de esto se colocaron 50ul de suspensión celular en cada uno de 5 microtubos, en los que a su vez se colocó el antisuero corres pondiente.

Se realizó una incubación de 30 minutos a 4°C, pasado este tiempo las suspensiones celulares se lavan tres veces con PBS-SFT al 5%, el último paquete celular obtenido se resuspende y se le agregan a cada uno de los 5 microtubos 50ul del FC, trans currida la incubación de células nuevamente se lavan en las -- mismas condiciones antes descritas y de la última centrifuga-- ción se resuspende el paquete, colocando una gota de PBS-SFT-- glicerol para evitar como antes que las células se deshidraten el siguiente paso es leer en un microscopio para fluorescencia el mismo tipo de lectura y metodología se aplicó a cada una de las cien muestras.

TABLA II y III

NO. tubo	Dilución efectuada del antisuero	Dilución efectuada del FC	Reactividad encontrada
1	1:30	1:30	+++
2	1:30	1:60	+++
3	1:30	1:120	+++
4	1:60	1:30	+++
5	1:60	1:60	+++
6	1:60	1:120	++
7	1:120	1:30	++
8	1:120	1:60	+
9	1:120	1:120	+

En la TABLA II y III se ilustra la reactividad de células mononucleares al exponerse con el anticuerpo monoclonal (leucocitos Totales), y el conjugado de fluoresceína a tres distintas diluciones, para delimitar la concentración de este último

TABLA IV

Anticuerpo Monoclonal	Diluciones		
	1:30	1:60	1:120
LINFOCITOS B	+++	++	++
LINFOCITOS T(totales)	++++	+++	+++
LINFOCITOS T(ayudadores)	+(+/-)	+(+/-)	+(+/-)
LINFOCITOS T(supresores)	+++	++	+

En la TABLA IV se muestra la dilución más adecuada del Anticuerpo Monoclonal a utilizar en el estudio, esto aunado al previo establecimiento de la concentración del conjugado de -- fluoresceína.

TABLA 1 (Leucocitos totales)

Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular
MCE	98	GLO	94	JPA	91	PPA	88
CTF	98	VRG	93	RRM	91	SJCA	87
CPJ	98	VCJA	93	PHE	90	GIJ	87
YGJA	97	GNL	93	OTA	90	NAM	87
ABC	97	MRF	93	CVA	90	ACE	87
MDD	97	MGC	93	CMLA	90	MML	87
ZLE	96	OMR	93	RGV	90	AMG	87
FMS	96	GPG	93	LML	90	MMJ	87
HMMT	96	OAY	93	APS	89	SE	86
CVLM	96	PDAT	93	ABL	89	NSJ	85
QMC	96	JSF	92	FBCA	89	RQWR	85
LPC	95	ZGJJ	92	STWN	89	MFG	84
AGV	95	MBV	92	ORMG	89	LCR	84
CMMML	95	RBA	92	RFM	89	ZVG	84
MMJ	95	NME	92	GBR	89	APMJ	84
MHG	95	LMC	92	JCR	89	CGJ	82
AGK	95	PGT	92	HVML	89	HGF	82
SMJ	94	PLME	92	PMG	89	TAD	81
MFGA	94	SMS	92	MRF	88	BJA	80
BGV	94	MAM	92	JPH	88	ZA	78
LOS	94	MMA	92	RSM	88	DRG	78
OCA	94	COR	91	MFA	88	FCMC	76
CVM	94	GNV	91	AR	88	VS	73
MGA	94	LMJ	91	DRE	88	CMP	67
FWMG	94	GM	91	ANLE	88	ZGLL	66

TABLA 1.- Contiene los valores para la población estudiada referente a la cuenta de leucocitos totales. Los pacientes estudiados pueden ser identificados por sus iniciales correspondientes.

TABLA 2 (Linfocitos "B")

Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular
HGF	39	ROME	21	LMC	16	TAD	11
ZGLL	36	GML	21	CVM	15	BGV	10
MGA	33	VRG	20	ZLE	15	MDGA	10
GIJ	31	RSM	20	COR	15	ZA	10
BJA	31	MML	20	MFR	15	GLQ	10
GPG	31	SMS	19	NMJ	15	APMJ	10
ABL	29	NME	19	JSF	14	MMA	10
GNV	29	GTF	18	CLNA	14	ECMC	10
DRE	28	RMS	18	CVLM	14	LCR	9
CGJ	28	CMMI.	18	ZVG	14	VS	9
LMJ	28	GM	18	NAH	13	MRF	9
MFG	27	NMJ	18	YGJA	13	LML	9
NSJ	27	CMP	17	FNNG	13	MRC	9
QMC	27	MCE	17	MDD	13	PLME	9
AMG	27	BBV	17	OMR	13	RGV	8
MFA	26	OTA	17	HMHT	13	RBA	8
CPJ	23	CVA	17	AMLE	13	ABC	8
SE	23	SCJA	17	APS	12	PMG	8
ACE	22	PHE	17	GBR	12	PPA	8
ZGJJ	22	OAY	17	PQT	12	JPH	7
DRG	22	MVML	17	MAM	12	JFA	7
DTWN	22	FBCA	16	SMJ	11	LOS	7
AGV	22	ORMG	16	RMF	11	AGK	7
OCA	21	AR	16	JCR	11	PAT	7
RRM	21	FMS	16	MGC	11	VGJA	6

TABLA 2.- Contiene los valores para la población estudiada referentes a la cuenta linfocitaria, en este caso a la población de Linfocitos B.



TABLA 3 (Linfocitos "T" totales)

Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular
LOS	84	RSM	75	CVLM	71	CML	65
CLMA	84	BJA	75	GML	71	GPG	65
CVA	81	AGV	75	HMNT	71	MMA	65
NRG	81	GNV	75	NAM	70	HGF	64
MMJ	81	GTF	75	MML	70	FBCA	64
CPJ	81	HVLM	75	MDGA	69	APNJ	64
RBA	80	LCR	74	YGJA	69	GM	64
CLQ	80	CGJ	74	NSJ	69	ZVG	64
COR	80	LMC	74	POT	69	SCJA	63
OCA	79	NAM	74	FMS	69	ABC	63
RNF	79	CVM	73	ORNG	69	MFA	62
PPA	79	AR	73	NGA	68	SMS	62
JCR	79	PMG	73	RGV	68	ZA	60
LML	79	MGC	73	PLNE	68	JSF	59
TAD	78	MBD	73	MFR	67	ABL	59
MMJ	78	FMNG	73	VS	67	APS	58
LHJ	78	ZGJJ	72	ACE	66	CLR	58
OTA	77	JPA	72	HBV	66	MFG	55
ECMC	77	MCE	72	SMJ	66	ZLE	54
MFR	77	DTMN	72	AMLE	66	GIJ	52
OMR	77	SE	72	RRN	66	AGK	52
BGV	76	AOY	72	DRE	66	ZGLL	50
GBR	76	PAT	72	PIE	65	DRG	45
ROME	76	VRG	71	QNC	65	CMP	44
JPH	76	VGJA	71	AMC	65	NME	35

TABLA 3.- Contiene los valores para la población estudiada referentes a la cuenta de linfocitos T totales.

TABLA 4 (Linfocitos "T" cooperadores)

Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular
TAD	67	PLME	53	VGJA	47	CVA	38
NME	67	NAN	52	LMC	47	AMG	38
PPA	66	WBD	52	NCA	46	ZVG	38
GTF	65	OMR	52	ANLE	46	MNJ	38
NAM	64	HMMT	52	RMF	46	MCE	38
LHJ	62	GNV	52	JCR	46	OCA	37
GBR	61	MML	52	LML	46	OAY	37
JPA	60	CVM	51	PGT	46	PHE	35
GLQ	60	BJA	51	VRG	45	PMG	35
COR	58	RSM	51	GNL	45	FCCA	34
VS	58	HVLM	51	AR	45	JPH	34
CVLM	57	ABC	51	ACE	44	CGJ	31
NMJ	57	MRF	50	FMS	44	DTMN	30
FNMG	57	MBV	50	HGF	42	ACK	28
ZLE	57	SCJA	49	APS	42	ABL	26
RBA	56	LOS	49	SE	42	MFA	26
MFG	56	LRC	49	CPJ	42	RRN	25
GIJ	56	MRC	49	GM	42	ROME	24
NSJ	55	MGC	49	PAT	42	ORNG	20
CLMA	55	RGV	48	APMJ	42	CMML	19
ZA	54	MDGA	48	JSF	41	CMP	18
YGJA	54	BG	48	QNC	41	DRG	18
SMS	54	NMA	48	MFR	40	AGV	13
CLR	53	ZGLL	48	DRE	40	GPG	12
SMJ	53	ZGJJ	47	OTA	38	ECWC	12

TABLA 4.- Contiene los valores para la población estudiada en referencia a la subpoblación de Linfocitos T cooperadores.

TABLA 5 (Linfocitos "T" supresores)

Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular
MML	40	AMC	25	AR	20	PHE	16
ORG	38	SMJ	24	ECMC	20	MCE	16
GTF	35	BJA	24	GM	20	MRF	16
JFH	33	SMS	24	APNJ	20	DTMN	16
DRE	33	CPJ	24	MMA	20	FBCA	15
CJG	32	NSJ	23	ZGJJ	19	GML	15
GBR	32	RSM	23	ABC	19	MFA	14
AMLE	31	HMST	23	NMJ	19	OTA	14
PPA	30	JSF	22	GNV	19	CLMA	14
ZVG	30	ABL	22	CLR	18	NME	14
CVA	29	LOS	22	CVM	18	HVLM	14
GPG	29	VS	22	RBA	18	CVLM	13
LNC	29	DRG	22	SE	18	QMC	13
ACE	28	CMML	22	FWS	18	MMJ	13
NAM	28	MFR	22	PCT	18	FWG	13
RRM	28	PDAT	22	MGC	18	OAY	13
MBY	27	MBD	22	GLQ	18	APS	12
LPC	27	ZLE	22	MDGA	17	RGV	12
HGF	27	OCA	21	BGV	17	ZA	12
JFA	26	NAM	21	YGJA	17	OMR	12
CMP	26	AGV	21	VRG	17	PLME	12
LHJ	26	GIJ	20	PNMG	17	TAD	12
ROME	26	VGJA	20	MKG	17	ZGLL	10
AGK	26	RFM	20	COR	17	LML	10
MFG	25	JCR	20	SJCA	16	MGA	8

TABLA 5.- Contiene los valores para la población estudiada referentes a la determinación de linfocitos T supresores.

TABLA 6 (Relación Linfocitos T cooperadores/ T supresores)

Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular	Paciente	% celular
MGA	5.75	MRG	2.88	JPA	2.3	MFR	1.81
TAD	5.58	OAY	2.84	RMF	2.3	OCA	1.76
ZGLL	4.8	CVMA	2.83	JCR	2.3	CPJ	1.75
NME	4.78	MDGA	2.82	NAM	2.28	LMC	1.62
LML	4.6	BCV	2.82	FBCA	2.26	ACE	1.57
ZA	4.5	CIJ	2.80	HMMT	2.26	HGF	1.55
PLME	4.41	GNV	2.73	SMS	2.25	AMG	1.52
CVLM	4.38	MGC	2.72	AW	2.25	AWLE	1.48
OMR	4.33	OTA	2.71	MFG	2.24	CVA	1.31
PGV	4.0	PHG	2.69	LOS	2.22	MML	1.3
CMLA	3.92	ABC	2.68	RSM	2.21	ABJ	1.27
MVLN	3.64	VRG	2.64	SMJ	2.2	ABL	1.26
APG	3.5	VS	2.63	PPA	2.2	ZVG	1.21
COR	3.47	ZLE	2.59	PHE	2.18	DRE	1.15
FMVG	3.35	PGT	2.55	EJA	2.12	AGK	1.03
QLO	3.47	ZGJJ	2.47	AFMJ	2.1	JFH	1.03
YGJA	3.3	MAM	2.44	GM	2.1	CGJ	0.96
QMC	3.17	FMS	2.4	DTMN	1.93	ROME	0.9
MRF	3.15	MMA	2.39	GBR	1.9	RRM	0.9
RGA	3.12	NSJ	2.38	PDAT	1.9	CMML	0.85
SCJA	3.11	LHJ	2.37	JSF	1.86	AGV	0.81
GML	3.06	MCE	2.36	MFA	1.85	DRG	0.73
MMJ	3.0	MBD	2.35	MBV	1.85	ORMG	0.63
CLR	3.0	VGJA	2.33	CTF	1.85	ECMC	0.6
MMJ	2.94	SE	2.3	LCR	1.81	GPG	0.44

TABLA 6.- Contiene los valores para la relación linfocitos T cooperadores/linfocitos T supresores la cual sirve para descartar alguna posible inmunodeficiencia y cuyo valor no debe ser menor a un a unidad.

## ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS

El análisis estadístico que se llevó a cabo a los resultados obtenidos en este trabajo es el siguiente.(42,43)

Cálculo de la media (x) para cada una de las cinco determinaciones y la relación T cooperadores/T supresores.

$$x = \frac{\sum f_i X_i}{\sum f_i}$$

Desviación estandar:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum E f_i X_i^2}{n} - \frac{(\sum E f_i X_i)^2}{n^2}}$$

n-1

Cálculo de la media poblacional (u)

$$u = \frac{\sum x}{n} \pm z \frac{SD}{n}$$

Donde:

n= población estudiada

SD=Desviación estandar

x= media

u= media poblacional

Fi=frecuencia(no. de veces que se repite un dato)

Xi= clase(agrupación de datos en pequeños intervalos)

E= Sumatoria de todos los datos (100)

z= intervalos de confianza(valor de 99%=2.58)

TABLA DE RESULTADOS

Determinación	x	SD	Valor observado corregido
Leucocitos T totales	89.75	5.9	90 <sub>±</sub> 6
Linfocitos B	16.90	7.7	17 <sub>±</sub> 8
Linfocitos T totales	69.30	9.22	69 <sub>±</sub> 9
Linfocitos T cooperadores	45.45	12.15	45 <sub>±</sub> 12
Linfocitos T supresores	20.80	6.56	21 <sub>±</sub> 7

La tabla anterior resume los datos obtenidos del análisis estadístico llevado a cabo para cada una de las cinco determinaciones.

Las gráficas que a continuación se ilustran muestran los valores de datos obtenidos en porcentaje celular contra frecuencia poblacional.

## ANALISIS DE RESULTADOS (continuación)

### GRAFICA 1

Leucocitos totales, la mayoría de la población muestra un nivel aceptable de la cuenta leucocitaria. Hay gran homogeneidad de resultados.

### GRAFICA 2

Linfocitos B, en cuanto a esta determinación y en base al límite establecido para nuestros resultados casi un 80% de la población muestra datos que pueden considerarse como normales.

### GRAFICA 3, 4 y 5

Las gráficas 4 y 5 muestran el porcentaje celular para linfocitos T cooperadores y linfocitos T supresores, estas células deben guardar cierto equilibrio para así descartar posibles inmunodeficiencias. La suma de estas dos subpoblaciones (porcentaje celular) debe coincidir en aproximación con el porcentaje celular obtenido en la gráfica 3 (linfocitos T totales).

### GRAFICA 6

Muestra la relación entre linfocitos T cooperadores y linfocitos T supresores, se observan valores menores a una unidad - esto propone que las células supresoras se encuentran en mayor cantidad que las células cooperadoras, esto es contrario a la realidad. Podría pensarse entonces que existe algún trastorno inmunológico, pero no podría definirse que tan grave es. Lo más recomendable sería realizar un estudio más profundo.

TABLA DE VALORES DE REFERENCIA AL ESTUDIO

DETERMINACION	ALEMANA <sup>1</sup>	FRANCESA <sup>\$</sup>	INGLESA <sup>*</sup>	MEXICANA <sup>&amp;</sup>
Leucocitos totales	100	N.D.	N.D.	90 ± 6
Linfocitos B	12 ± 5	14 ± 6	N.D.	17 ± 8
Linfocitos T cooperadores	50 ± 15	41 ± 9	42 ± 10	45 ± 12
Linfocitos T totales	70 ± 10	67 ± 11	62 ± 12	69 ± 9
Linfocitos T supresores	20 ± 10	26 ± 8	24 ± 8	21 ± 9

NOTA:

<sup>1</sup> Boerngher (anticuerpo monoclonal

<sup>\$</sup> F.Phan-Dinh-Thuy ( )

<sup>\*</sup> Davies.E.G. ( )

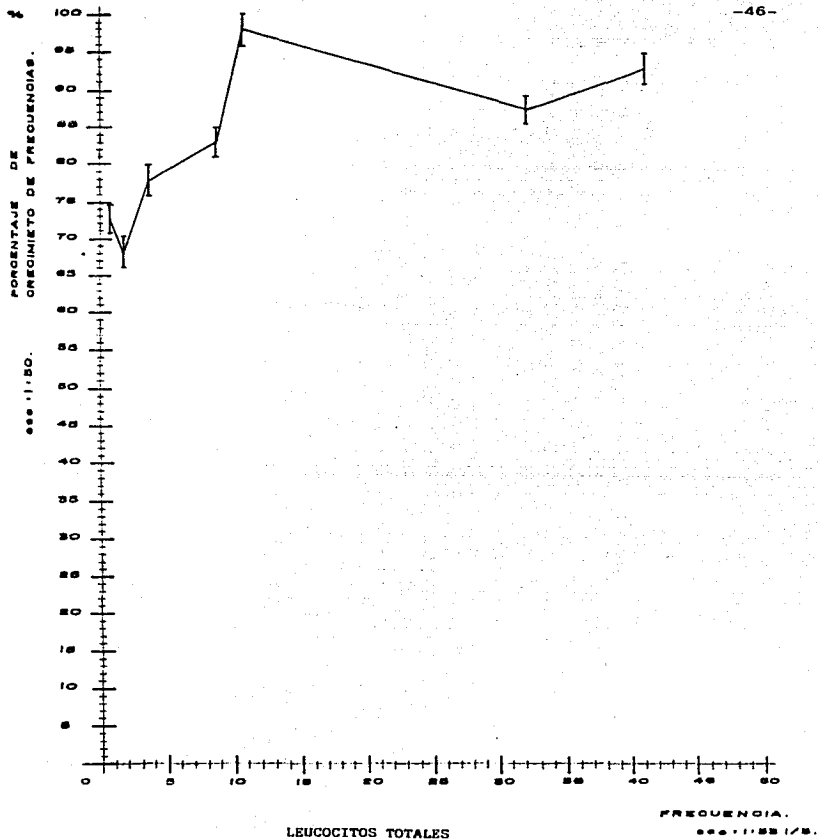
<sup>&</sup> Valores obtenidos del presente estudio

N.D. NO DESCRITO

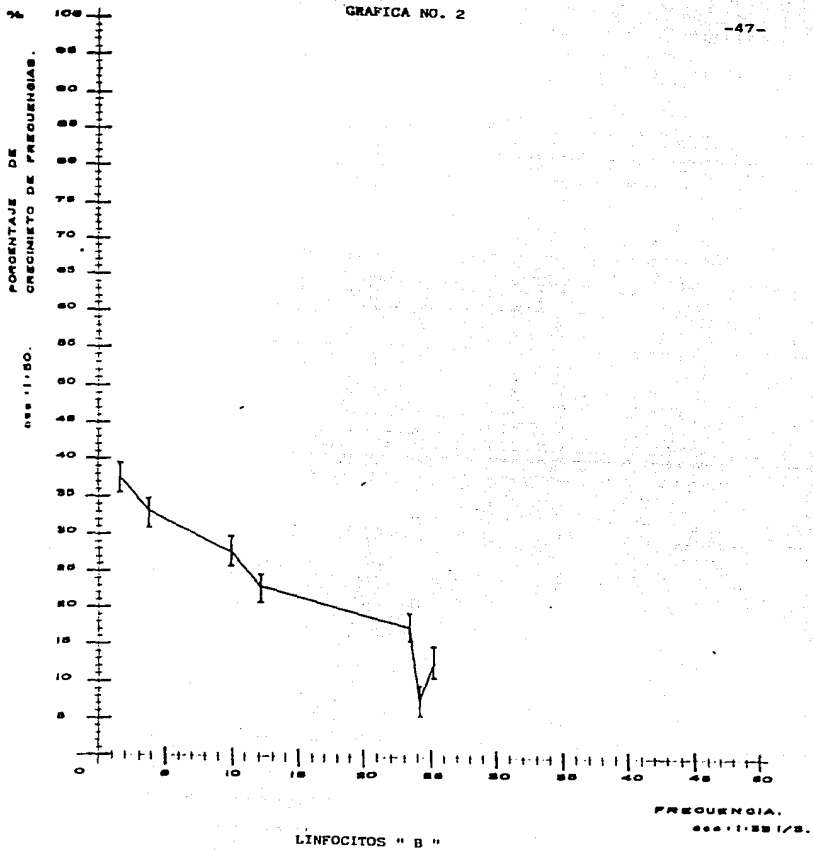


GRAFICA NO. 1.

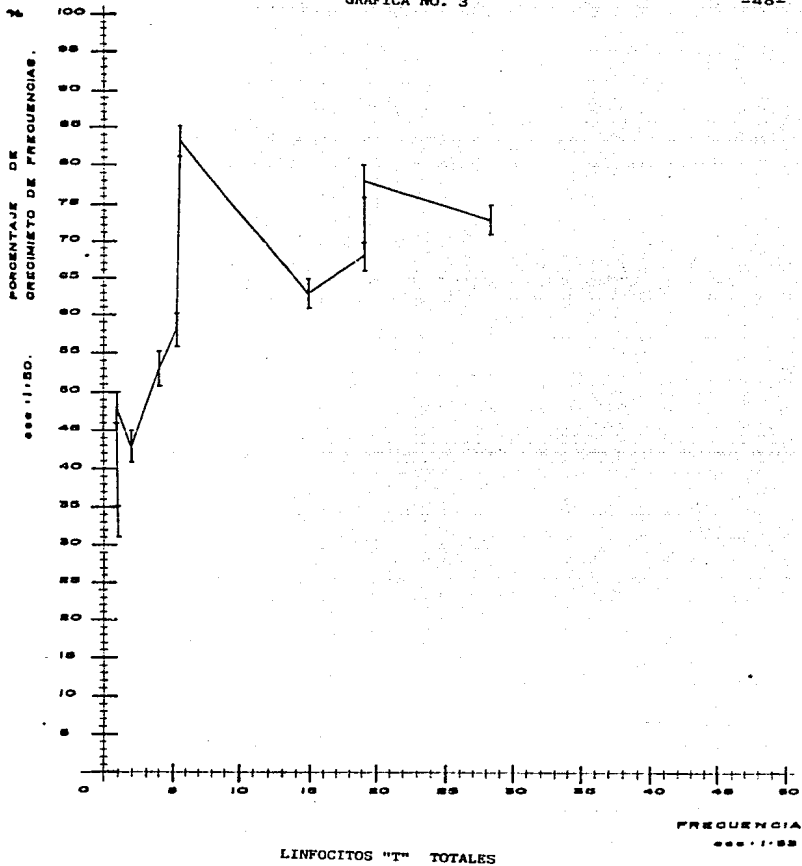
-46-



GRAFICA NO. 2



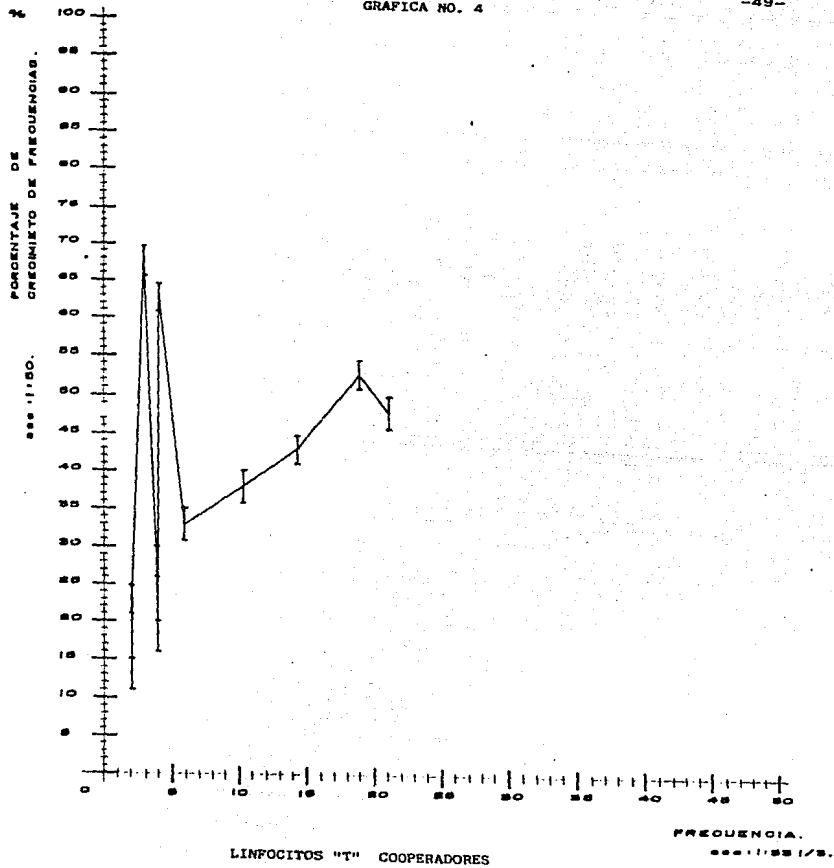
GRAFICA NO. 3



LINFOCITOS "T" TOTALES

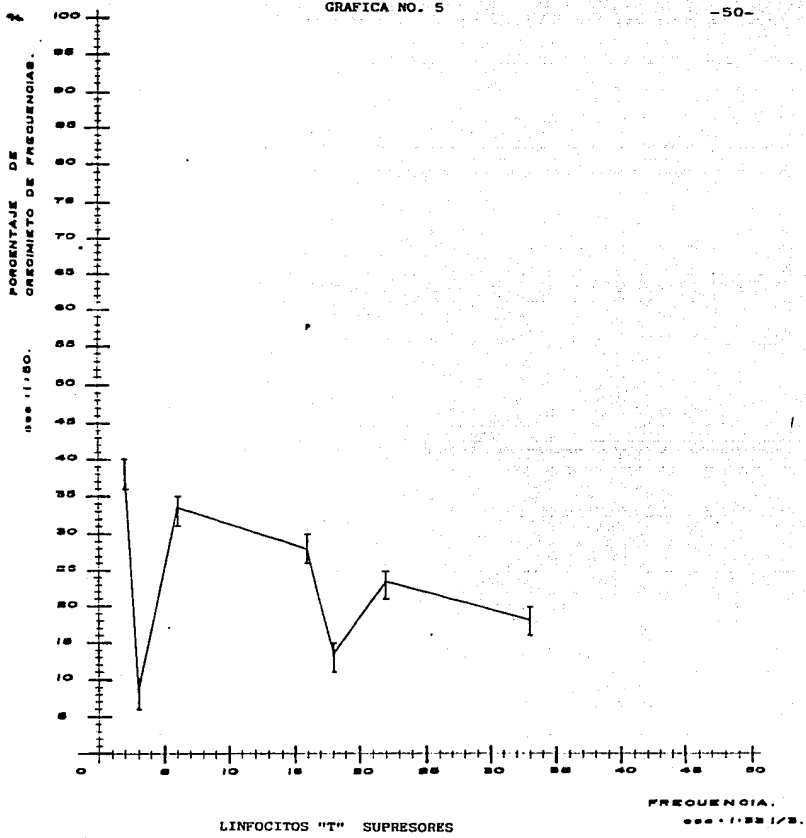
FRECUENCIA.  
\*\*\* 1:50 1/5.

GRAFICA NO. 4

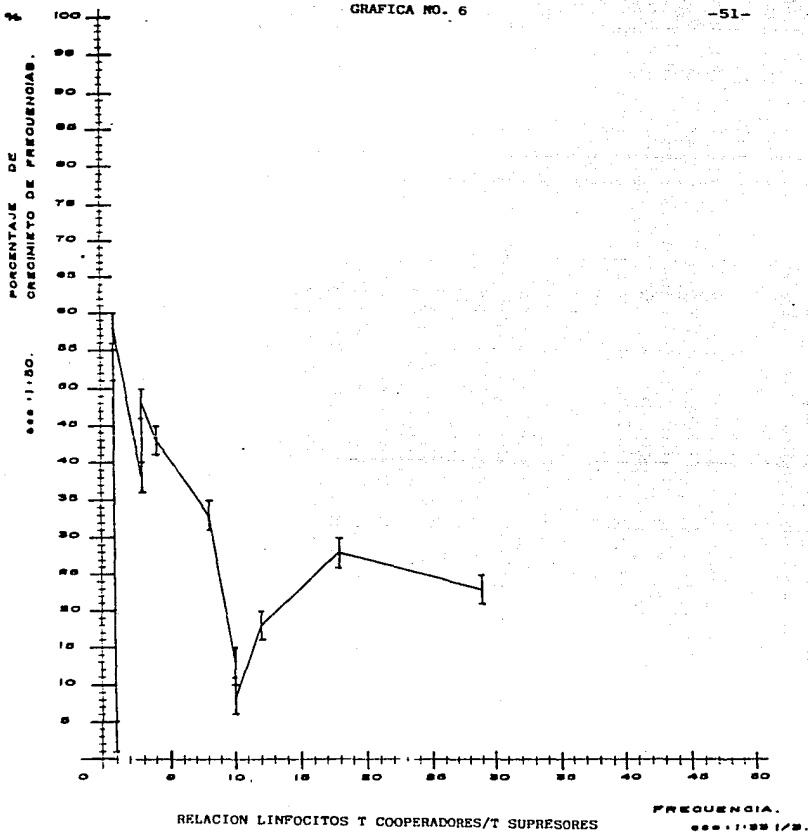


LINFOCITOS "T" COOPERADORES

GRAFICA NO. 5



GRAFICA NO. 6



## DISCUSION

La técnica desarrollada por Köhler y Milstein en 1975 --- (Anticuerpos Monoclonales) proporciona un nuevo avance en cuanto a técnicas de diagnóstico de laboratorio. (19) Esta metodología se ha visto apoyada por técnicas inmunológicas como la Inmunofluorescencia y la Inmunoprecipitación principalmente. (13,14,21,29)

A partir del trabajo de Köhler y Milstein, varios autores han propuesto modificaciones a esta técnica, dichas variaciones se basan principalmente en la obtención de una mayor cantidad de Anticuerpos Monoclonales, M.Spitz (28), así como un mejor -- aprovechamiento de las células híbridas obtenidas. (10)

Numerosas poblaciones celulares pueden ser identificadas -- con el uso de Anticuerpos Monoclonales, entre las cuales tenemos a los Linfocitos T, B, células mononucleares en general, en apoyo a este estudio se han dado tablas de valores aportados -- por diferentes autores. (9,15,42,30)

La importancia de la determinación de leucocitos totales -- radica en que se ofrece una visión amplia de como encontraremos cada una de las poblaciones a estudiar individualmente, claro -- que puede haber variaciones en poblaciones sin que exista cambio en estas células.

La importancia de la determinación tanto de células B como T radica en las consecuencias que trae consigo la alteración de la cantidad de cada una de ellas, así como la regulación e interrupción entre las mismas. (37,38,40,43)

Puede existir una alteración de células T ó B como tales (individualmente) ó una deficiencia asociada. Entre las enfermedades debidas a estas causas podemos citar el Síndrome de --

Wiskott-Aldrich y la Ataxia Telangiectasia donde existe una inmunodeficiencia asociada de células B y células T. (15,23) ó una hipogammaglobulinemia donde el déficit específico es para células B. (14)

Roy Pitrin (38), indica que las células T parecen verse mayormente afectadas, existe para tal caso una relación que involucra células T cooperadoras y supresoras, lo cual sirve para descartar posibles inmunodeficiencias, esto en base a que tal relación se encuentra invertida (valores menores a una unidad)- enfermedades debidas a estas causas lo son el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida--- (SIDA) de más reciente investigación, en ambas enfermedades la relación mencionada se encuentra invertida con lo cual quiere decirse que el número de células supresoras es mayor al número de células cooperadoras. (6,18)

Por todo lo anterior es difícil establecer un cuadro de valores normales, pues se necesitaría muchísimo tiempo y por que no, el apoyo al presente estudio de otras técnicas inmunológicas para descartar los posibles errores cometidos a medida que transcurrió el desarrollo del mismo, entre estas técnicas está la formación de rosetas y más específicamente la separación -- por medio de una columna de nylon de células T y B.

A medida que transcurra el tiempo el uso de la técnica en México ofrecerá una visión mucho más amplia para el estudio de -- un sin fin de poblaciones celulares, hasta la fecha su uso se encuentra un poco restringido pues sólo se maneja en el Hospital Centro Médico la Raza (H. General) y en Hospital de Infectología de citada Institución. El uso contra otros métodos ó técnicas es más favorable puesto que ofrece resultados confiables y una mayor facilidad y manejo de la técnica, además mayor rapidez en la obtención de resultados.



### CONCLUSIONES

Las conclusiones pueden estar dadas a partir del cumplimiento de los objetivos planteados previamente.

La comparación establecida entre los valores obtenidos y los de referencia sirven más que nada como un apoyo al estudio, sin embargo no pueden utilizarse del todo como una medida netamente comparativa puesto que hay factores que pueden intervenir y que están afectando en la diferencia de resultados (tales como el nutricional y el genético). Por tal puede concluirse que estadísticamente no son diferentes, pues la validez del estudio para tal caso está dada por la correcta selección de la muestra poblacional que cubrió como se dijo anteriormente ciertos requisitos como lo son principalmente no padecer ningún proceso infeccioso, esto se comprobó con pruebas de laboratorio adicionales tales como la Biometría Hemática, Química Sanguínea, Valoración de Inmunoglobulinas y Fracción C3 y C4 del Sistema Complemento.

En segundo lugar, las tablas de valores normales arrojan resultados sumamente importantes, es claro que la Inmunidad Celular está ampliamente relacionada con la Inmunidad Humoral, a medida que las células B se encuentren disminuidas, las células T se encontrarán con un valor un poco más alto ó viceversa, esto está dado por el equilibrio que debe existir entre ellas.

En cuanto a los valores de células T cooperadoras y células T supresoras debe existir también cierto equilibrio, puesto que un aumento ó disminución ya sea de alguna de estas subpoblaciones por separado ó de manera asociada traerá consigo las anomalías antes mencionadas. La identificación de células T inmaduras y células Null no se llevó a cabo debido a que los antisueros utilizados no poseen la especificidad para el tipo de re

ceptores contenidos en estas estirpes celulares. Como se sabe a medida que las células tanto B como T pasan por los distintos estadios para llegar a su maduración completa, poseen diferentes receptores específicos para cada estadio.

Estos receptores aparecen y desaparecen a medida que sucede lo mencionado.

Esta técnica posee varias ventajas como pueden serlo, que el volumen de la muestra a utilizar puede ser hasta de 2ml. de sangre completa, la especificidad de los reactivos utilizados está comprobada, lo que implica que el porcentaje de error obtenido es mínimo.

V O C A B U L A R I O

PMN	Polimorfonucleares
HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Ig'	Inmunoglobulina
LPS	Lipopolisacárido
PEG	Polietilenglicol
HGFRT	Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa
DNA	Acido Desoxirribonucleico
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
PBA	Solución amortiguadora de fosfatos
SFT	Suero fetal de ternera

BIBLIOGRAFIA

- 1.-BALCELLS,A. La Clínica y el Laboratorio. Edit.Marín 12a.ed. 1981  
Barcelona, España p.p. 227
- 2.-BARTON, Haynes. Characterization of a Monoclonal Antibody that defines an immunoregulatory T cell subsets for immunoglobulin synthesis in humans. Proc. Natl. Academic, USA. Vol 77, No.5, p.p.2914-2918 May 1980 Immunology
- 3.-BENACERRAFF, Baraj. Textbook of Immunology. The Williams and Wilkins ———  
2a.ed. 1979 p.p.1-12,31-40.76-97
- 4.-BEVERLEY, Peter. Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by rosetting or a Monoclonal anti-T cell antibody. Eur. J. Immunology 1981, 11:329-334
- 5.-BLONM, B.R. In vitro approaches to the mechanism of the cell-mediated immune reactions. Adv. Immunology 13:205 1983
- 6.-BURNETT, F.M. Auto-Immune disease: Pathology of immune response BR. Med. J 2:270, 1959
- 7.-CEJKA, Jan. Métodos y diagnósticos del Laboratorio Clínico. 4a.ed. 1980 p.p. 1113-1119
- 8.-DAVIS-DULBECCO. Tratado de Microbiología. Edit. Salvat. 2a.ed. 1980, Barcelona España. p.p. 14,368-370,495-497
- 9.-DAVIES, E.G. Lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiencies disorders. Archives of disease in Childhood. 1983, 58,346-351

- 10.-DE BLAS.L.Angel. Estimation of the number of Monoclonal hybridomas in a cell fusion experiment, effects of post-dilution cell fusion on hybridoma survival. Journal of Immunology. Methods, 45 (1984) 109-115
- 11.-DENIS DURLEY. Probabilidad y Estadística. Edit. C.E.C.S.A. 1980 p.p. El manual completo.
- 12.-FAUCY.S.Anthony. Análisis de células supresoras. Componentes celulares de la respuesta inmune. p.p. 110-117
- 13.-FAVILA CASTILLO Luis,. "Los Anticuerpos Monoclonales y sus aplicaciones biológico-médicas". Infectología (1984) 83-89
- 14.-FUDENBERG.H.Hugh,. Inmunología Básica y Clínica. Edit.El Manual Moderno 4a.ed. 1983 México,D.F., p.p.1-22, 32-39, 67-84, 91-98
- 15.-F.PHAN,DINH-Tuy., T-cell subset analysis by monoclonal antibodies in primary immunodeficiencies. Scand.J.Immunology 14,193-200 (1981)
- 16.-GANONG.WILLIAMS. Fisiología Médica. Edit. El Manual Moderno 8a.ed.1981 p.p.417-420
- 17.-GELFAND.Erwin., Inmunodeficiencias en la niñez. Tribuna Médica, México No.538 Nov.(10) 1983 p.p. 13-23
- 18.-GLEICHMANN.Ernest. A systemic lupus eritematosus (LES)-like disease in mice induced by abnormal T-B cell cooperation. Preferential formation of autoantibodies characteristics of LES. Eur.Journal of Immunol. 1982 12: 152-159

- 19.-GOLUB.S.EDWARD. The cellular basis of the immune response. Sinaver Associates. Inc. Sunderland, Massachussets. First Printing 1977 p.p. 214-229.
- 20.-GORDON.B.L. Lo esencial de la Inmunología. Edit.El Manual Moderno. --- 2a.ed. 1982 México,D.F., p.p. 1-15
- 21.-KREYZIG.Erwin. Introducción a la Estadística Matemática. Edit.Limusa 4a.ed. 1979 México,D.F., Capítulo I y II
- 22.-KUMATE.Jesús., Las herramientas de la Inmunología Contemporánea.V.117 No.7 Septiembre 1981 p.p. 382-385
- 23.-LANDERGREN,Ulf. Mechanism of T lymphocyte activation by OKT 3 antibodies. A general model for T cell induction. Eur.J.Immunology 1984 --- 14:325-328
- 24.-LEXIS 22 Medicina y Salud. Círculo de Lectores 1980
- 25.-MARGINI, Anibal Ricardo., Inmunología e Inmunoquímica Edit.Panamericana 3a.ed. 1982 p.p.107-113
- 26.-MILSTEIN C. MonoclonalAntibodies. Scientific American 243:56 octubre 80
- 27.-MILSTEIN C. Monoclonal Antibodies from hybrid myelomas. Medical research council laboratory of Molecular Biology. Cambridge England 1979 p.p. 17-33
- 28.-M.SPITZ. Intraesplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. Journal of Immunological methods. 70 (1984)39-43

- 29.-NIAUDET. Patrick., Molecular identification of human T-lymphocyte antigens defined by OKT-5 and OKT-8 Monoclonal Antibodies. Immunology 19 no.12 1649-54 1982
- 30.-PAOLO DI PAOLI. Enumeration of human lymphocyte subsets by Monoclonal antibodies and flow cytometer: a comparative study using whole blood or mononuclear cell separated by density gradient centrifugation. Journal Immunological Methods. 72(1984) 349-353
- 31.-PERRI.DI.T. "Inflamación III" Revista de la Asociación Española 1980 p.p.14-33
- 32.-RASSEGNA. Información Médica Cultural. "Linfocitos vistos al scanning" no.2 1972 p.p. 35-39
- 33.-REINHERZ. Ellis., Further characterization of the human inducer T cell Subset defined by Monoclonal Antibody . Vol/123 no.6 December 1983 --- p.p. 2894-2896
- 34.-REINHERZ Ellis., Monoclonal Antibodies defining distinctive human T --- cell surface antigens.Science vol.206 october 1979p.p.347-349
- 35.-REINHERZ Ellis., Biochemical analysis of human T cell lymphocyte differentiation antigens T4 and T5. vol.209, July, 1980
- 36.-ROIT, Ivan., Essential Immunology. Backwell Scientific Publications --- Fourth edition 1980, p.p.1-4,56-60,87-92
- 37.-ROSENTHAL.A.S., Determinant selection and macrophages function in genetic control of the immune response. Immunological Reviews.40 136-152

- 38.-ROYM.PIKIN.,Autoimmune disease in pregnancy. La Ricerca In.Clin.Lab.---  
Vol.XI April 1982
- 39.-STEWARR.Sell.,Aspectos fundamentales del sistema inmunitario. Rassegna  
vol.3, No.3, 1983 p.p.24-34
- 40.-TALAL.Norman.,Recent Developments in autoimmunity. La Ricerca Clin.Lab  
11, 101. 1981
- 41.-THORSOY.E.Bratle. Method for the production of pure Lymph suspensions.  
Terasaky.P.P.I. Histocompatibility testing. Munksgaard Copenghage ---  
655-670
- 42.-VOLKMAR.Bongers.The influence of common variables analyses by Monoclo--  
nal antibodies. Journal of Immunology at methods, 67(1984) 243:253
- 43.-YUNIS.E.,The cellular and humoral basis of the immune response supplement  
89-93