

2 Ej. 13.10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**VALORACION DE LINFOCITOS T Y B EN PACIENTES  
CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO  
Y ARTRITIS REUMATOIDE**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**ISMAELA AVILA ARENAS**

MEXICO, D. F.

1 9 8 4



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.

## **I N D I C E**

- I. INTRODUCCION.**
- II. GENERALIDADES.**
- III. PARTE EXPERIMENTAL.**
- IV. RESULTADOS.**
- V. DISCUSION.**
- VI. RESUMEN.**
- VII. CONCLUSIONES.**
- VIII. BIBLIOGRAFIA.**

I  
INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La artritis reumatoide (A.R.) y el lupus eritematoso sistémico (L.E.S.) son enfermedades inflamatorias del tejido conectivo que se caracterizan por la evidencia histopatológica de infiltrado linfocitario en las lesiones tisulares. La investigación de esta área se ha dirigido al estudio de las células que participan en las lesiones tisulares, los linfocitos y su posible contribución a la patogénesis de estas enfermedades.

Los linfocitos pueden ser divididos en dos grupos básicos; las células B del sistema linfático difuso también llamadas bursa dependientes que poseen inmunoglobulinas de superficie siendo el principal efector de la inmunidad humoral y las células T derivadas del timo que contienen receptores de superficie y son los principales efectores de la inmunidad celular.

Diversos autores han estudiado las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica, encontrando resultados divergentes, esto puede deberse a la edad del paciente y a factores ambientales ya que ambas condicionan variaciones poblacionales de linfocitos T, B, o incluso linfocitos nulos así mismo Williams y colaboradores reportan disminución de células T en A.R. y L.E.S. y para linfocitos B reportan valores normales. (Según valores de referencia obtenidos por ellos).

Messner encontró disminución de la cuenta total de linfocitos T y B en pacientes con L.E.S. demostrando además que esta linfopenia tenía relación con los periodos de actividad de la enfermedad. (24)

En A.R. Mellbye y colaboradores reportan 15% de células B. (22), Froland y colaboradores reportan 11% de células B y 23% de células T (10), Papamichail y colaboradores reportan 45% de células B sin considerar linfocitos T. (26)

Tomando en cuenta los diferentes resultados obtenidos por estos investigadores, realizados en pacientes y en condiciones totalmente diferentes a las de nuestro medio se decidió estudiar las poblaciones de linfocitos T y B en sujetos considerados "normales", en pacientes con A.R. y en pacientes con L.E.S., con y sin tratamiento de corticoesteroides, tanto en actividad como en inactividad de la enfermedad, atendidos en el servicio de Reumatología del Hospital General Centro Médico la Raza, en la zona norte de la ciudad de México.

## II GENERALIDADES

## GENERALIDADES

La artritis reumatoide (A.R.) es una enfermedad crónica de etiología desconocida que afecta principalmente articulaciones pequeñas y grandes, generalmente en forma simétrica y que con el tiempo, puede llevar a la invalidez parcial o total, temporal o permanente. No tiene predilección racial, afecta a ambos sexos, aunque en mayor proporción al sexo femenino (3 a 1), ocurre con mas frecuencia en la edad reproductiva y ocasionalmente, puede presentarse en forma generalizada y llegar a producir la muerte en poco tiempo (2).

Tres hechos son fundamentales para la elaboración de la hipótesis que trata de explicar la patogenia de la A.R.

El primero fue el descubrimiento de la disminución de los niveles de complemento en líquido sinovial de los pacientes con artritis activa, en tanto que los niveles séricos se encontraban normales e incluso elevados (2).

El segundo fue la demostración de inclusiones en el citoplasma de los leucocitos polimorfonucleares del líquido sinovial de estos pacientes, dichas inclusiones contienen inmunoglobulinas IgG e IgM, las cuales aunque no son exclusivas de la A.R. se presentan particularmente en ella, por lo que se les llamó células R.A. (del inglés: rheumatoid arthritis).



El tercero fue la identificación de complejos inmunes formados por IgG o IgM y complemento, tanto en el tejido intersticial como en el citoplasma de las células de las capas superficial y profunda de la membrana sinovial (2).

Estos datos sugieren que un estímulo antigénico inicial desconocido, - probablemente una gamaglobulina alterada, ocasiona la producción de anticuerpos antigamaglobulina, los cuales al unirse con el antígeno activan el complemento produciéndose en consecuencia, la activación de diversos factores, algunos de ellos con acción quimiotáctica que atraen granulocitos a la cavidad articular.

Estas células fagocitan los complejos inmunes formados por inmunoglobulina (antígeno), factor reumatoide (anticuerpo) y complemento, cuya interacción produce la liberación de enzimas de los lisosomas de los granulocitos hacia el líquido sinovial, que pueden ser las responsables de la proliferación celular en la membrana sinovial y de la destrucción o degradación del cartilago articular adyacente. (2)

Se pretende que la persistencia del fenómeno inflamatorio articular, en la A.R., depende, cuando menos parcialmente de sensibilización contra los antígenos resultantes del mismo proceso inflamatorio.

La interacción del antígeno y del anticuerpo produce la activación del sistema del complemento, por medio de la unión de las inmunoglobulinas (factores reumatoides) con el primer componente del complemento. A

su vez, esto produce la activación secuencial de los otros nueve zimógenos del sistema del complemento (C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9.) esta forma de activación llamada vía clásica de activación del complemento ha sido demostrada en el líquido sinovial de pacientes con A.R. activa. En algunos casos al encontrarse disminución de los activadores iniciales del complemento la cascada también puede llevarse a cabo a partir de C3, sin la participación del C1, C4, C2, y de ahí continuar con el resto de la secuencia biológica (vía alternativa). Recientemente se ha demostrado que en la cavidad articular, también hay activación por esta vía.

Una vez activado C3, se libera C3a, una anafilotoxina que por su bajo peso molecular difunde fácilmente y es capaz de liberar histamina de las células cebadas que ocasiona contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad capilar y salida de líquido al espacio intercelular con el edema consiguiente: además, se produce C3b que facilita la fagocitosis por opsonización y el fenómeno de inmunoadherencia al activarse el C5 se forma la trimolécula C5b, C6, C7 y C5a con actividad quimiotáctica intensa que atrae la migración de leucocitos polimorfonucleares abundantes hacia el sitio de inflamación y probablemente, produce leucocitosis del líquido sinovial. (2)

Los leucocitos polimorfonucleares y las células de la capa superficial de la membrana sinovial fagocitan los complejos inmunes (gamaglobulina antigamaglobulina-complemento) presentes en el líquido sinovial, lo que explica la reducción en los niveles de complemento que es directamente

proporcional a la cantidad de leucocitos polimorfonucleares y al grado de actividad de la A.R.

Las inclusiones citoplasmáticas en los leucocitos polimorfonucleares - del líquido sinovial corresponden a estos complejos con agregados de fibrina y DNA-anti-DNA, estas células, originalmente llamadas "RA" no son exclusivas de la A.R.: también se han demostrado en el líquido sinovial de los pacientes con síndrome de Reiter, artritis fímica, polimiositis, seudogota y derrame postoperatorio del líquido sinovial (2).

Después de la fagocitosis de estos complejos inmunes, en el líquido sinovial o en las células de la membrana sinovial, se manifiesta la acción de las enzimas lisosomáticas responsables de la lesión tisular local.

Los lisosomas son pequeños organelos citoplasmáticos presentes en diversas células; su proporción es mayor en los leucocitos polimorfonucleares. Contienen enzimas como: colagenasa, proteasa neutra, elastasa, catepsina E, peptidasa, entre otras, el sustrato de estas enzimas está en el tejido colágeno y en los diferentes componentes del cartilago.

Otra de las enfermedades del tejido conectivo es el lupus eritematoso sistémico (L.E.S.) el cual es un padecimiento de evolución crónica, de etiología desconocida, aunque algunos autores han reportado la ausencia concreta de nucleasas necesarias para el catabolismo del material nu-

-clear del recambio celular constante, lo que condiciona su incremento circulante con la consecuente respuesta inmunológica, clínicamente se caracteriza por periodos de activación y remisión. Las manifestaciones clínicas iniciales pueden ser únicas o múltiples, predominan en el sexo femenino en relación 8 a 1 y su mayor incidencia se encuentra entre la segunda y la cuarta década de vida (2).

Pese a que las manifestaciones clínicas son de la incumbencia del médico el químico clínico no puede estar alejado de ellas ya que de este conocimiento se puede llegar al entendimiento de la fisiopatología de esta enfermedad, en la siguiente tabla se resumen las manifestaciones iniciales por orden de frecuencia.

MANIFESTACIONES	%	PACIENTES
ARTRITIS O ARTRALGIAS.	}	53
CUTANEAS { LESIONES DISCOIDES		9
{ ERITEMA MALAR		9
{ OTROS		1
NEFRITIS		6
FIEBRE		5
CONVULSIONES		3
RAYNAUD		3
PLEURITIS		3
ANEMIA		2
TROMBOCITOPENIA		2
SEROLUETICAS FALSAS POSITIVAS		1
ICTERICIA		1

Las articulaciones se ven afectadas en el 90% de los pacientes en algún momento de la evaluación de la enfermedad. La artritis sin ninguna otra manifestación constituye el primer síntoma en 2/3 de los pacientes. Lo más característico son las poliartralgias con poca o ninguna evidencia de inflamación.

Las lesiones cutáneas se caracterizan por eritema malar en alas de mariposa, alopecia, ulceraciones crónicas, gangrena (seca) digital, eritema nodoso, fenómeno de Raynaud, púrpura, lesiones discoideas y lesiones ulcerosas de las mucosas.

Entre los síntomas respiratorios la disnea y el dolor torácico son síntomas frecuentes que pueden estar asociados con pleuritis o neumonitis. En la mitad de los casos se observa derrame pleural.

De las lesiones cardíacas la pericarditis es la más común, manifestándose por dolor precordial, crecimiento de la silueta cardíaca. También se observa miocarditis cuya traducción clínica es insuficiencia cardíaca o trastornos del ritmo y extrasístoles.

El daño renal es una de las complicaciones más graves y se observa en el 50% de los pacientes. Está bien establecido que existen diferentes patrones de enfermedad renal en L.E.S. y que presentan distinto curso clínico, pronóstico y respuesta al tratamiento, la nefritis es la manifestación inicial de L.E.S., en 4 a 8% de los pacientes y cerca del 35% de ellos tienen alguna lesión renal al final del primer año.

Los síntomas gastro-intestinales más comunes son: náuseas, vómito, y dolor abdominal condicionados por vasculitis. Cuando es severa puede determinar peritonitis, pancreatitis y necrosis intestinal.

En la mitad de los casos se observa linfadenopatía generalizada y obliga a descartar padecimiento linfoproliferativo.

Los síntomas neurológicos incluyen alteraciones mentales, convulsiones y lesiones de pares craneales. La lesión del sistema nervioso central junto con las lesiones renales y las infecciones constituyen las causas fundamentales de la muerte. La intensidad de estas manifestaciones así como de los órganos afectados depende de la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo solubles que como se mencionó previamente son fijadores de complemento lo que condiciona su daño tisular.

#### **DIAGNOSTICO:**

Si las manifestaciones clínicas son características, el diagnóstico de L.E.S., no ofrece dificultad. Deben tenerse en cuenta para diagnóstico diferencial con otras enfermedades del tejido conectivo, padecimientos linfoproliferativos, granulomatosos e infecciosos.

En ocasiones durante la evolución predominan algunos síntomas aislados tales como nefritis, artritis o anemia hemolítica lo que dificulta el diagnóstico. Es bien conocido que ciertos pacientes en un momento determinado o en estudios sucesivos durante el curso clínico

presentan manifestaciones que son características de más de una de las enfermedades del tejido conectivo. Así, pacientes con L.E.S., desarrollan artritis reumatoide.

Con objeto de uniformar criterios y facilitar el diagnóstico, el comité de la Asociación Americana de Reumatología (ARA) propuso un criterio preliminar para la clasificación del L.E.S., este criterio está basado en 14 puntos que a continuación se resumen:

**ERITEMA FACIAL**  
**LUPUS DISCOIDE**  
**FENOMENO DE RAYNAUD**  
**ALOPECIA**  
**FOTOSENSIBILIDAD**  
**ULCERAS NAALES U ORALES**  
**ARTRITIS SIN DEFORMIDAD**  
**CELULAS L.E.**  
**PRUEBAS SEROLOGICAS FALSAS POSITIVAS**  
**PARA SIFILIS.**  
**PROTEINURIA PROFUSA**  
**CILINDROS CELULARES**  
**PLEURITIS O PERICARDITIS**  
**PSICOSIS POR CONVULSIONES**  
**CITOPENIAS**

Dicho comité demostró que hallazgos positivos de cualquier combinación de 4 de las 14 manifestaciones tienen una especificidad diagnóstica -- del 99%. (2)

## ORGANIZACION HISTICA DEL SISTEMA LINFORETICULAR

Los tejidos linfoide y reticuloendotelial están compuestos primordialmente por una malla de células reticulares y de fibras entrelazadas con un marco de sostén reticulares asociados a los vasos linfáticos. El principal tipo de células que ocupa los intersticios de la malla reticular es el linfocito, los otros tipos celulares presentes en diversos estados de proliferación incluyen los linfoblastos, células plasmáticas, macrófagos, células endoteliales, escasos eosinófilos y células cebadas. Entre los mamíferos, el conjunto de linfocitos constituye aproximadamente el 1% del total del peso corporal, el cuerpo humano por ejemplo, contiene alrededor de  $10^{12}$  linfocitos en los tejidos se encuentran en equilibrio dinámico con la sangre circulante, la mayor parte de los linfocitos se encuentran en el bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer del íleon. Para fines funcionales del sistema linfoide puede dividirse en tres unidades principales:

1. Las células primordio o primordiales
2. Los órganos linfoides primarios o centrales (timo y "equivalente de la bursa")
3. El sistema linfoide periférico (17).

Las células primordiales del sistema hemopoyético del humano parecen originarse en el saco vitelino embrionario durante la segunda y tercera semanas de gestación, estas células primordiales proliferantes inician la producción de eritrocitos, trombocitos, granulocitos, linfocitos



-tos y monocitos. Las células primordiales migran del saco vitelino hacia el interior del parénquima hepático en desarrollo alrededor de la sexta semana de gestación y su proliferación subsiguiente hace que el hígado sea el principal órgano formador de sangre en la vida fetal primitiva. A partir de la decimosexta semana de gestación la médula ósea inicia su actividad, los precursores linfoides provenientes de estos sitios de proliferación de células primordiales se diferencian morfológicamente y funcionalmente en células T y células B en los órganos linfoides periféricos.

#### **TIMO.**

El timo se deriva embrionariamente de la tercera y cuarta bolsas branquiales y se diferencia como evaginaciones ventrales de estas bolsas durante la sexta semana de la vida fetal. Durante la embriogénesis de los vertebrados, el timo es el primer órgano que comienza a producir linfocitos y tiene la tasa más alta de producción celular de todos los tejidos del cuerpo. La evidencia disponible sugiere que la gran mayoría de las células producidas en el timo mueren en él, es un órgano central en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmunológico, sin embargo, no participa de manera directa en las reacciones inmunológicas. En el adulto, consta de muchos lóbulos, y contienen cada uno, corteza y médula. Los linfocitos producidos por mitosis en los lóbulos migran a la médula, donde se diferencian aún más y luego migran del timo. La médula contiene también los corpúsculos tímicos de Hassall compuestos por capas de células epiteliales cuya función es desconocida.

En la mayor parte de los vertebrados, el timo alcanza su máximo tamaño (como porcentaje del peso corporal) ya sea al nacer o poco tiempo después. Posteriormente, la glándula empieza un proceso gradual de involución. En el humano, el timo disminuye de 0.27% del peso corporal total a 0.02% entre las edades de cinco y quince años.

El desarrollo tímico defectuoso está asociado con los trastornos de deficiencia inmunitaria. En el ratón timectomizado se observa la falta de desarrollo del timo y marcada deficiencia de linfocitos T maduros. Las anomalías histicas del timo ocurren con frecuencia en ciertas enfermedades autoinmunes, en particular en el L.E.S. y la miastenia grave. Estas anomalías incluyen tanto la hiperplasia linfoide como el desarrollo de timomas.

#### BOLSA DE FABRICIO Y "EQUIVALENTE DE LA BOLSA" EN LOS MAMIFEROS

La bolsa de Fabricio, que se encuentra en las aves, es un órgano linfopitelial localizado cerca de la cloaca, histológicamente, la bolsa está revestida de epitelio pseudoestratificado y contiene dentro de ella folículos linfoides divididos en las porciones cortical y medular. En los pollos, la extirpación de la bolsa de Fabricio conduce a marcada deficiencia en la síntesis de inmunoglobulinas, alteración en el desarrollo de los centros germinativos y carencias de células plasmáticas. Se ha demostrado que el sistema linfoide "dependiente de la -

bolsa" es independiente del timo, el equivalente de la bolsa de Fabricio no ha sido aún identificado en los mamíferos.

Por lo tanto, el sistema linfoide puede dividirse en dos compartimientos funcionales. Los linfocitos T dependientes del timo y los linfocitos B del "equivalente de la Bursa".

Desarrollo embrionario humano de células T.

El timo es el primer órgano linfoide en desarrollarse, proviene del tejido situado en la zona de la tercera bolsa branquial, que forma un marco epitelial para la migración subsiguiente de células primordiales pro-tímicas. Puede demostrarse la existencia de pequeños linfocitos en el tejido tímico alrededor de la octava o novena semana de gestación. El origen exacto de estas primeras células tímicas precursoras en el humano es desconocido, pero los estudios en animales sugieren que se originan de células primordiales dentro del hígado fetal. Al principio se pensó que las células epiteliales tímicas se transformaban localmente en precursores linfoides. En la actualidad se ha establecido que este tejido está poblado por células que se originan en otras regiones, pequeños linfocitos aparecen en la sangre periférica fetal del humano de la séptima a la octava semana de la gestación. (17)

Consecutivamente a esta infiltración linfoide del timo, hay aumento en la población linfoide del bazo, ganglios linfáticos y médula ósea durante la duodécima a decimosexta semanas. Las porciones estromáticas ya

se han formado a la duodécima semana, pero una población celular significativa no aparece en estos sitios hasta el cuarto mes. Las células plasmáticas, consideradas como las células de diferenciación terminal de los linfocitos B estimulados por antígenos, por lo general no son demostrables en los ganglios linfáticos de los lactantes normales a término, pero pueden ser halladas en algunos fetos cuando ocurren infecciones intrauterinas durante el embarazo.

El timo actúa sobre la diferenciación celular en dos formas:

1. Modulando la transformación de las células prethímicas en células postthímicas funcionales y
2. después de que las células han dejado el medio thímico y migrado hasta los tejidos periféricos, el timo continúa afectando la cantidad y la actividad funcional de las células T. Ordinariamente el mecanismo propuesto mediante el cual el medio thímico afecta la célula en maduración incluye polipéptidos thímicos específicos como timosina, timopoyetina, factor hormonal thímico, factor thímico del suero, que se adhieren a los receptores de membrana e inician la diferenciación celular.

Histológicamente el timo adulto puede dividirse en dos regiones una cortical y otra medular. Las células primordiales son llevadas a la región cortical, las regiones subcapsulares del timo contienen un gran nú

-mero de células dividiéndose rápidamente, gran porcentaje de estas células se lisan o mueren antes de abandonar el timo, no se ha entendido todavía por qué estas células son tan activas desde el punto de vista metabólico. Los grandes protimocitos están destinados a producir células T desde el momento en que aparecen subcapsulares en la glándula, las células gradualmente migran desde la corteza hacia la porción medular de la glándula y morfológicamente tienen más parecido con los linfocitos pequeños que con los blastocitos tímicos, de la porción medular las células migran hacia los órganos linfoides periféricos. No es necesario que el linfocito pequeño pase por el timo para lograr su diferenciación, ésta puede ser extratímica si tiene contacto con las hormonas tímicas. En el ratón timectomizado no hay deficiencia de células posttímicas y la médula ósea y las poblaciones celulares esplénicas pueden tener tantas células T inducibles como los ratones normales.

El desarrollo de las células B ha sido más fácil de estudiar, ya que estas células poseen marcadores específicos en la superficie celular (immunoglobulinas) que han sido investigados con mayor intensidad. El primer modelo animal en el cuál fue posible distinguir entre las células T y las células B fue el pollo y este modelo será descrito con detalle.

La bursa aviaría ejerce una función de maduración para las células B análoga a la función del timo en la maduración de las células T. La bursa proviene del tejido epitelial de la región de la cloaca y un po-

-co a la manera del tîmo, es sembrada o infiltrada por células primordiales que migran del saco vitelino y de las fuentes hepáticas, con la rápida proliferación de estas células primordiales, la bursa se transforma en órgano linfoide durante los días 13 y 19 del desarrollo embrionario de 21 días (8 días antes de la salida del cascarón). La IgM fijada a la membrana es la primera inmunoglobulina que se descubre sobre las células linfoides de la bursa, varios días después, puede hallarse IgG sobre algunas células. A medida que maduran las células linfoides dejan la bursa y se localizan en los tejidos periféricos, si los linfocitos periféricos se prueban para demostrar la existencia de inmunoglobulinas de membrana, el orden en el cual aparecen en estos sitios distales es semejante a aquel en el cual se desarrolló dentro de la bursa (IgM - IgG - IgA):

Si se extirpa quirúrgicamente el tejido de la bursa antes de la migración de las células de la misma hacia el tejido linfoide periférico, - el pollo que sale del cascarón tendrá inmunodeficiencia. No tendrá células B ni células plasmáticas en su bazo ni en los ganglios linfáticos y el pollo será hipogamaglobulinémico toda su vida. Sin embargo, si la bursectomía se hace después de la migración de las células de la bursa hacia el tejido periférico, las células B de la periferia continúan aumentando en número, el pollo producirá células plasmáticas hísticas e inmunoglobulinas séricas y retendrá la función inmunitaria en apariencia durante meses o años. La bursectomía puede hacerse también durante las etapas de maduración de las inmunoglobulinas de la superficie. La bursectomía hecha después de la forma-

-ción de IgG sobre la superficie, detiene la diferenciación subsiguiente, tal pollo muestra linfocitos IgM solamente en sus tejidos linfoides periféricos y produce sólo IgM sérica como respuesta. La bursotomía hecha durante la ruptura del cascarón o poco tiempo después (cuando las etapas de maduración han progresado más) deja con frecuencia al pollo incapacitado para dar una respuesta de inmunoglobulinas IgA, pero con respuesta de anticuerpos IgM e IgG casi normales. Estos datos han sido interpretados indicando dos puntos importantes:

1. La bursa constituye el único tejido en los pollos que producen la diferenciación y maduración de las células B o influye sobre aquéllas.
2. Cuando algún linfocito de la bursa está lo suficientemente maduro para dejar dicho tejido y dirigirse a sitios periféricos, ya está encargado de la producción de inmunoglobulinas.

#### DESARROLLO DE LAS CELULAS B HUMANAS

Debido a que la bursa es un órgano tan importante para la diferenciación de los linfocitos B, no es sorprendente que se haya hecho un esfuerzo considerable en un intento de identificar el equivalente de la misma en el ser humano y de hecho en todos los mamíferos, ha sido posible identificar el sitio anatómico donde ocurre la maduración de las cé

lulas B los primeros investigadores probaron el apéndice, el sáculo y las placas de Peyer como sitios posibles, pero la evidencia actual favorece a la médula ósea, al hígado y al bazo fetales como los sitios más probables del equivalente de la bursa en los mamíferos.

En el humano, los primeros linfocitos que demostraron la existencia de inmunoglobulinas de membrana fueron células que portaban IgG o IgM y se desarrollan en el hígado fetal alrededor de las 9 1/2 semanas de la gestación. Las células con IgA de membrana se encuentran aproximadamente a las 11 1/2 semanas, después de este tiempo se pueden encontrar células con IgM, IgG, IgA, en el hígado, bazo, timo y sangre periférica. La proliferación extensa de estas células da por resultado un aumento tal de células B, que alrededor de las 15 semanas la proporción de inmunoglobulinas presentes sobre células B son semejantes a las que se encuentran en un lactante nacido a término. En el humano como en el pollo, se encuentran etapas sucesivas de maduración IgM - IgG - IgA. Otras dos clases de inmunoglobulinas se encuentran en el humano IgD e IgE, pero muy poco se sabe acerca de su manifestación o de su maduración durante el desarrollo fetal.

### MORFOLOGIA DE LAS CELULAS LINFOIDES

Los linfocitos observados en el microscopio óptico, son células ovoides de 8 a 12 milimicras de diámetro, contienen cromatina nuclear densamente empacada y un pequeño borde de citoplasma con numerosos gránulos.



los azurofilos y vacuolas ocasionales, contiene algo de glucógeno. hidrolasas lisosómicas y enzimas mitocondriales, los estudios histoquímicos han demostrado ribonucleoproteínas nucleolares y citoplásmicas, en la zona del aparato de Golgi se encuentra la mayoría de los organelos citoplasmáticos, mitocondrias, ribosomas y lisosomas. La microscopía de contraste de fase de los linfocitos en vivo revela un movimiento ameboso lento característico que les da un contorno de "espejo de mano", la membrana plasmática es típica y puede mostrar pequeñas proyecciones o pseudópodos, así, la especialización de la membrana plasmática puede estar relacionada con la adherencia de la célula a las superficies o con la acción recíproca de célula a célula. Con la microscopía óptica convencional las dos subpoblaciones linfocitarias (células T y células B) son indistinguibles.

En cortes delgados de células examinadas por microscopía electrónica, el linfocito se puede distinguir de las células plasmáticas por el desarrollo extenso y la dilatación del retículo endoplásmico granuloso y una zona del aparato de Golgi bien desarrollada en las células plasmáticas. El linfocito puede distinguirse de los fagocitos mononucleares por la presencia de una zona del aparato de Golgi más grande y lisosomas más numerosos en el fagocito mononuclear.

En contraste con el linfocito pequeño el blastocito tiene un núcleo que se caracteriza por cromatina fina, un nucleolo y un gran volumen citoplásmico que contiene numerosos polirribosomas y un aparato de Golgi extensamente desarrollado. Los blastocitos se encuentran en los gan--

-glios linfáticos in vivo después de la estimulación antigénica o en cultivo de linfocitos estimulados in vitro con fitomitógenos, el blastocito se distingue fácilmente en la microscopía óptica y mide de 15 a 30 milimicras de diámetro.

## MARCADORES SUPERFICIALES SOBRE LOS LINFOCITOS

### T · Y · B

Ha sido posible definir marcadores característicos para la identificación de los linfocitos T y B empleando microscopía inmunofluorescente, autorradiografía o rosetas de eritrocitos cubiertos con inmunoproteínas. Hay una distinción importante entre el determinante de membrana plasmática que es una macromolécula presente sobre la membrana celular, descubierta mediante métodos de marcación de anticuerpos y la identificación de tipos particulares de células o de subpoblaciones y el receptor, que es una característica de un tipo de célula específica la cuál tiene una afinidad conocida de enlace para un ligando específico.

El linfocito B del humano y de la mayoría de los mamíferos se caracteriza, por la presencia de inmunoglobulinas fácilmente identificables en la superficie celular. Las inmunoglobulinas superficiales se pueden demostrar usando sueros monovalentes o polivalentes marcados con fluoresceína dirigidos contra diversas clases de inmunoglobulinas. La IgM es la inmunoglobulina presente en mayor cantidad de linfocitos B circulantes también hay IgD, IgA e IgG sobre las membranas de los

## Linfocitos B.

Cuando un componente de membrana se combina con su molécula complementaria sufre primero una reorganización metabólicamente independiente - en "parches" sobre toda la superficie celular, después el marcador es redistribuido topográficamente a partir de los parches hasta localizarse en un polo de la célula "gorros", este proceso depende de su metabolismo y va seguido por la introducción de los componentes a través de las vesículas de la membrana, además la mayoría de los linfocitos B tienen un receptor para los complejos antígeno, anticuerpo o inmunoglobulina agregada. Este receptor parece ser específico para un sitio de la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina y se le conoce como receptor Fc. Ha sido posible demostrar un receptor para el tercer componente del complemento en algunas células B usando eritrocitos recubiertos con anticuerpo y complemento, los linfocitos que portan este receptor han sido llamados linfocitos de complemento y no es para una sola especie molecular de los componentes del complemento y la evidencia indica diferentes sitios de enlace en la membrana para C3b, C3d, C4. Se ha demostrado que el receptor del complemento es diferente del receptor Fc.

III

## PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado fue obtenido de 59 pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital General Centro Médico la Raza, 8 del sexo masculino y 51 del sexo femenino cuyas edades fluctuaron entre 20 y 45 años, los cuales se dividieron en 6 grupos según su diagnóstico, actividad e inactividad de la enfermedad y tratamiento. Un grupo -- más integrado por 19 sujetos aparentemente sanos, 13 del sexo masculino y 6 del sexo femenino, para obtener valores de referencia.

**GRUPO 1** 11 pacientes del sexo femenino con A.R., clásica que mostraban datos clínicos de actividad, tratados con una dosis promedio de 10 mg de prednisona al día.

**GRUPO 2** 6 pacientes, 4 del sexo femenino y 2 del sexo masculino con A.R., clásica que mostraban datos clínicos de actividad, tratados con 3g de ácido acetilsalicílico y 400 mg de oxifenilbutazona por día.

**GRUPO 3** 8 pacientes, 4 del sexo femenino y 4 del sexo masculino con A.R., clásica que no mostraban datos clínicos de actividad, tratados con 3g de ácido acetilsalicílico y 300 mg de oxifenilbutazona por día.

**GRUPO 4** 10 pacientes del sexo femenino con diagnóstico de L.E.S.,

que mostraban datos clínicos de actividad, tratados con una dosis promedio de 40 mg de prednisona por día.

**GRUPO 5** 5 pacientes, 3 del sexo femenino y 2 del sexo masculino con diagnóstico de L.E.S., que mostraban datos clínicos de actividad y no habían recibido tratamiento.

**GRUPO 6** 19 pacientes del sexo femenino con diagnóstico de L.E.S., - que no mostraban datos clínicos de actividad, tratados con una dosis promedio de 20 mg de prednisona por día.

**GRUPO I** (Control) 19 sujetos aparentemente sanos; 13 del sexo masculino y 6 del sexo femenino, para obtener valores de referencia.

A todos se les tomaron 5 ml de sangre venosa en condiciones basales, -- usando como anticoagulante 2 gotas de heparina sódica de 1000U/ml en un tubo de 13 x 100 mm siguiendo la misma metodología para todas las muestras:

- I) Aislamiento de células mononucleares por centrifugación en gradiente de ficoll-hypaque de acuerdo a la técnica de -- Boyum.
- II) Determinación de Linfocitos T (totales) por formación - de rosetas con glóbulos rojos de camero tratados con neuraminidasa.

III) Determinación de linfocitos B por inmunofluorescencia - directa.

Los resultados se expresan en números absolutos convirtiendo los porcentajes de células.

Se determinaron la media aritmética, la desviación estandar y el índice de probabilidades se calculó por el método de "t" de Student.

Nota: Se consideran los siguientes datos de actividad para AR. Rigidez matutina mayor de una hora, fatiga de mínimo esfuerzo, - exacerbación o persistencia de flogosis articular, disminución del hematocrito y eritrosedimentación globular acelerada, disminución de la fuerza de prehensión y disminución de la velocidad de marcha en 10 m.

Para L.E.S., se considera enfermedad activa con cuatro o más de los siguientes datos: Caída del cabello, úlceras orales, artritis, serositis, fiebre en ausencia de infección, afección del sistema nervioso central, alteración del sedimento urinario (cilindruria) y albuminuria, elevación de urea y creatinina, disminución del complemento sérico, aumento del título de anticuerpos anti-DNA, anemia hemolítica, leucopenia y trombocitopenia.

## METODOLOGIA

### I AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES

#### a) Fundamento:

El método está basado en la separación de los elementos celulares de la sangre estratificada sobre un fluido de densidad relativamente alta, al combinarse la centrifugación y la sedimentación a 1 G.

1. Los granulocitos y eritrocitos son sedimentados por acción del fi coll-hypaque y eliminados por centrifugación a 20°C, dependiendo esta separación de la densidad, concentración, osmolaridad y viscosidad de la mezcla.
2. Los linfocitos, monocitos, granulocitos basófilos y plaquetas se quedan en la interfase.

#### b) Equipo:

Centrífuga marca IEC-CS-Centri

Incubadora a 37°C

Microscopio

Potenciómetro

Autoclave

Material de vidrio:

Cámara de Neubauer

Cubre hematómetro

Tubos de 15 x 125 mm.



Pipetas de 10 ml., 5 ml. 1 ml.

Pipetas Pasteur

Cajas de Petri

Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.

Vaso de precipitado de 2000 ml

Matraz aforado de 2000 ml

c) Material biológico:

Sangre venosa periférica

d) Reactivos:

Heparina. Lipo-hepin solución inyectable. (Lab. Riker, S.A. de C.V.).

Solución salina amortiguada de Hank pH 7.4 (SSAH)

PREPARACION DE LA SSAH

Solución "A"

NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.045 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.060 g
Glucosa	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	500 ml

Solución "B"

CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.147 g
Rojo de fenol	0.002 g
H <sub>2</sub> O destilada	500 ml

Solución "C"

Tris-hidroximetil-amino-metano	19.1 g
Agua destilada	800 ml

Solución de trabajo:

- a) Mezclar las soluciones A, B y C
- b) Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N
- c) Aforar a 2000 ml
- d) Separar en alícuotas de 500 ml en matraces Erlenmeyer de 1000 ml.
- e) Esterilizar a 32 libras y 132°C por 15 minutos en autoclave.
- f) Guardar en refrigerador hasta el momento de usarse.

Ficoll 400 Pharmacia Fine Chemicals A.B. Upsala Sweden..

Hypaque 50% solución inyectable (Sydney Rose Co, S.A.).

Azúl de tripano:

0.030 g de azúl de tripano en 12 ml de solución de Hank.

### Preparación de la mezcla ficoll-hypaque

#### Mezclar:

- 10 partes de hypaque al 34% con
- 24 partes de ficoll al 9%

#### e) Técnica:

1. Diluir 5 ml. de sangre periférica heparinizada con 5 ml. de SSAH.
2. En un tubo que contiene 6 ml. de ficoll-hypaque se estratifican con una pipeta los 10 ml de sangre diluida.
3. Se centrifugan los tubos a 1400 rpm durante 40 minutos.
4. Con una pipeta Pasteur se extraen las células mononucleadas que se encuentran en la interfase formada por el ficoll-hypaque y el plasma.
5. La suspensión de células mononucleadas se lava 2 veces con SSAH.
6. Para obtener una población de linfocitos purificada se eliminan los monocitos por la propiedad que tienen de adherirse al vidrio, incubando la suspensión de células en cajas de Petri a 37°C por 60 minutos.
7. Se determina la viabilidad celular haciendo una dilución en pipeta para cuenta de blancos con solución azul de tripano y se deja reposar 10 minutos, entre portaobjetos y cubreobjetos con la mis

-ma pipeta se descarga una gota de la dilución de células y se observan al microscopio, contando en 100 células las que se tiñen de azul (muertas). La viabilidad debe ser mayor de 90%. Se determina la cantidad de linfocitos por ml haciendo una cuenta en cámara de Neubauer y ajustando la suspensión a  $4 \times 10^6$  - linfocitos por mililitro.

## II DETERMINACION DE LINFOCITOS T (totales) POR FORMACION DE ROSETAS CON GLOBULOS ROJOS DE CARNERO TRATADOS CON NEURAMINIDASA (GRCN).

### a) Fundamento:

Una propiedad exclusiva de los linfocitos T humanos es su capacidad para formar rosetas con los glóbulos rojos de carnero, aunque no se sabe la naturaleza de los receptores que actúan en la formación de tales rosetas si se sabe que estas rosetas no son estables y deben manejarse con mucho cuidado para obtener resultados reproducibles. M.S.Weiner y colaboradores encontraron que la unión entre los glóbulos rojos de carnero y los linfocitos humanos se favorecía e incrementaban las rosetas si los glóbulos rojos de carnero eran tratados con neuraminidasa, enzima que puede obtenerse de *Clostridium perfringens* o de *Vibrio cholerae*. Ellos observaron la facilidad con la que algunos glóbulos rojos se autoaglutinaban proponiendo que la hidrólisis del ácido neuramínico de los glóbulos rojos de carnero genera un cambio en la carga eléctrica neta de la membrana que facilita la interacción entre el receptor del linfocito T y el sitio de unión sobre la membrana del glóbulo rojo, además de que és

-te último quede más expuesto.

**b) Equipo:**

Estufa a 37°C

Centrífuga

Microscopio

Material de vidrio:

Tubos de 12 x 75 mm.

Pipetas graduadas de 1 ml.

Portaobjetos y cubreobjetos.

Pipetas Pasteur.

**c) Material biológico:**

Suspensión de linfocitos ajustados a  $4 \times 10^6$  por ml.

Glóbulos rojos de carnero tratados con neuraminidasa (GRCN) y ajustados al 1%.

**Preparación de GRCN**

1. En bolsa de 100 ml para recolección de sangre, con 14 ml de anti-coagulante CPD se toma la sangre al carnero por punción yugular, así puede conservarse por 15 días en refrigeración.
2. Se lavan aproximadamente 5 ml de sangre de carnero con SSAH en un tubo de ensaye, para eliminar plasma, leucocitos y plaquetas.  
Se lavan tres veces.
3. Se prepara una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5% con SSAH.

4. Se diluye la neuraminidasa para tener 1 U/ml con SSAH.
5. Se mezclan 5 ml de glóbulos rojos de carnero al 5% con 0.2 ml de la solución diluida de neuraminidasa y se incuba durante 60 minutos a 37°C (en este proceso ocurre una pequeña hemólisis como consecuencia de la modificación de la membrana del glóbulo rojo).
6. Se lavan tres veces con SSAH y se prepara una suspensión al 1%
7. Se guarda a 4°C hasta por siete días, para ser usada como suspensión de trabajo.

d) Reactivos:

Solución salina amortiguada de Hank pH 7.4

Neuraminidasa tipo VI de *Clostridium perfringens*. Lab. Sigma.

Anticoagulante CPD (Fenwal).

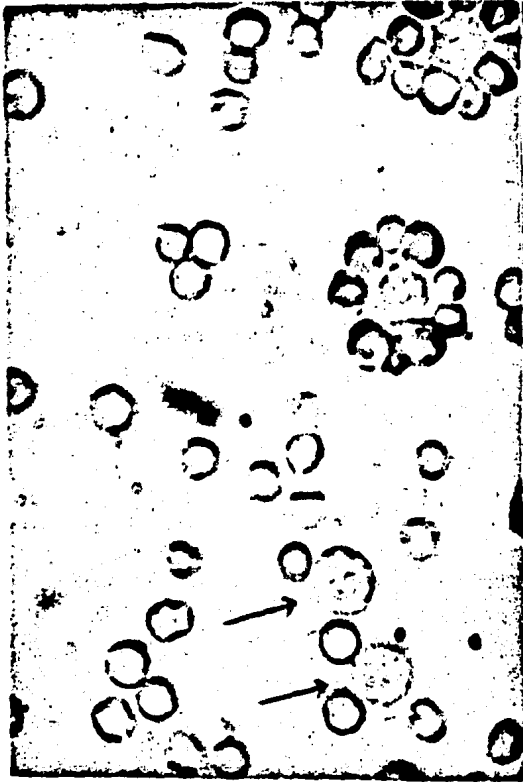
Acido cítrico	327 mg
Citrato trisódico	2.63 g
Fosfato sódico monobásico	222 mg
Dextrosa	2.55 g
Agua destilada cbp	100 ml

e) Técnica:

1. En un tubo de 12 x 75 mm con una suspensión de  $1 \times 10^6$  linfocitos (0.25 ml. de la suspensión de  $4 \times 10^6$ ) se miden 0.25 ml. de la -

suspensión de trabajo de glóbulos rojos de carnero, agitando suavemente.

2. Se incuba a 37°C durante 15 minutos.
3. Se centrifuga a 600 rpm por tres minutos y se guardan en refrigerador por 18 horas.
4. Se remueve el sedimento por rotación del tubo con mucho cuidado hasta la resuspensión total de las células.
5. Se coloca una gota entre porta y cubreobjetos haciendo dos conteos de 100 linfocitos y se verifica el resultado de la primera cuenta con la segunda.



**FIG. 1** Linfocitos T formando rosetas con eritrocitos de carnero, observando dos que no forman rosetas. ( ← )



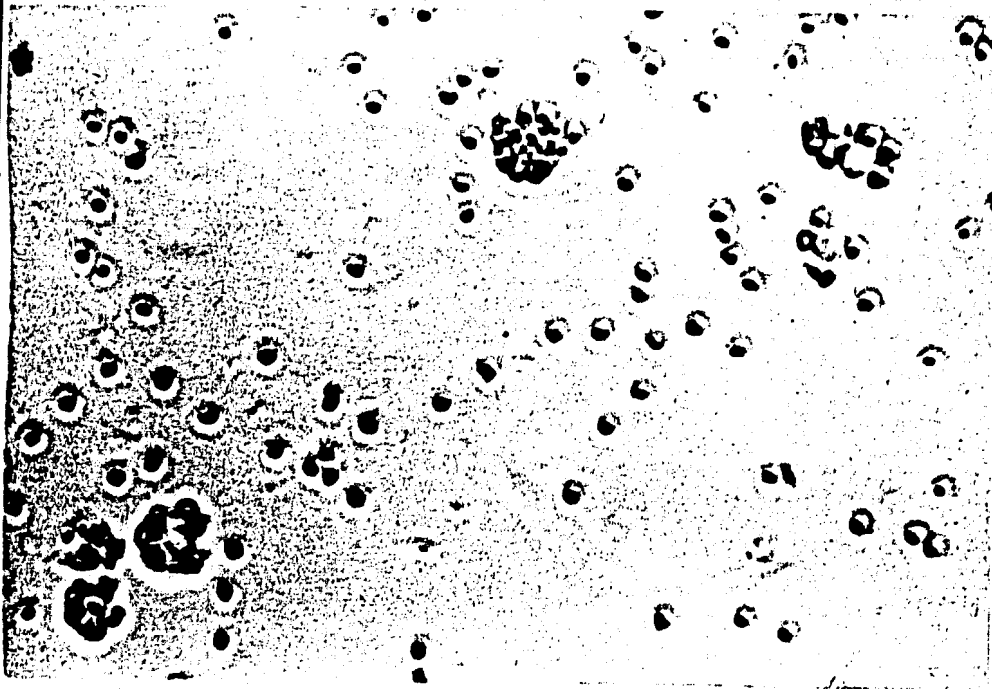


FIG 2 Linfocitos T formando rosetas con eritrocitos de carnero.

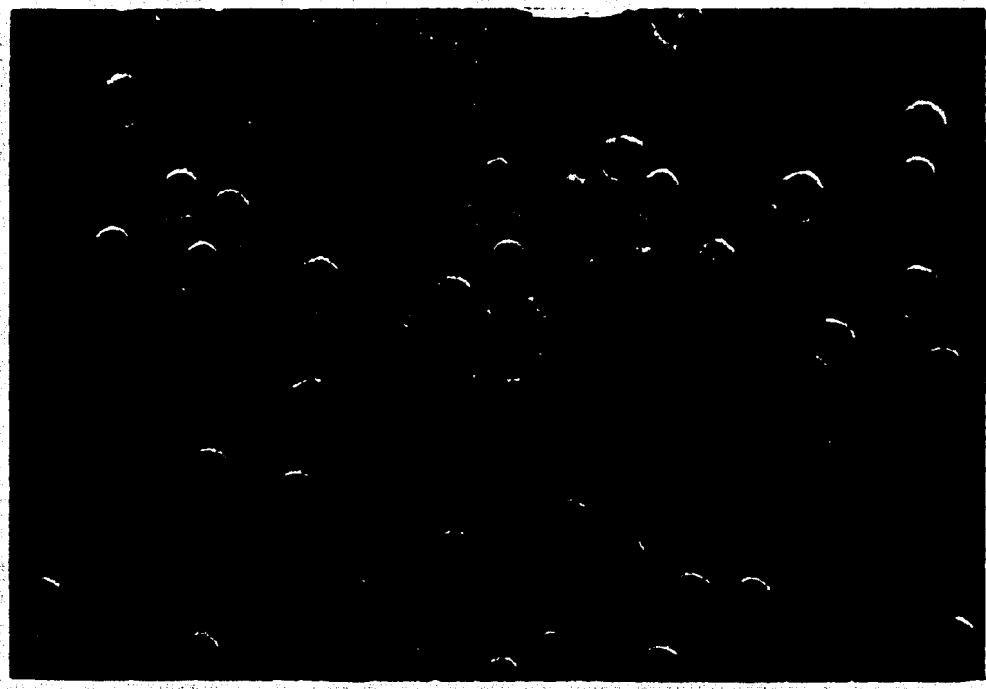


FIG. 3 Se considera roseta cuando hay más de tres eritrocitos unidos al linfocito.

### III. DETERMINACION DE LINFOCITOS B POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

#### a) Fundamento:

El fluorocromo, isotiocianato de fluoresceína se incorpora a las moléculas de los anticuerpos al reaccionar con los grupos amino libres presentes en la molécula del anti-cuerpo. Esta reacción de acoplamiento no interfiere en la capacidad del anticuerpo para combinarse con el antígeno. El grupo fluorescente unido al anticuerpo sirve de marca haciendo visible la reacción en el momento que queda expuesto el complejo a luz ultravioleta en el microscopio de fluorescencia. Si los anticuerpos fluorescentes han reaccionado con su antígeno. Este método constituye un instrumento histoquímico altamente específico, porque la tinción inmunofluorescente refleja la especificidad del anticuerpo empleado por su antígeno.

#### INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

En este método se emplea un anticuerpo fluorescente que reacciona directamente con el antígeno que se está estudiando.

#### b) Equipo:

Centrifuga

Refrigerador

Microscopio de epifluorescencia ZEISS 46-63-00-9901 2FL

Cuarto oscuro.

**Material de vidrio.**

Tubos de 12 x 75 mm.

Portaobjetos y cubreobjetos

Pipetas Pasteur.

**c) Material biológico:**

Suspensión de linfocitos ajustados a 4 millones por ml.

**d) Reactivos:**

Solución salina amortiguada de Hank pH 7.4

Suero anti-inmunoglobulinas humanas (IgG-IgA-IgM) conjugado con isotiocianato de fluoresceína. (Lab. Behring)

Azida de sodio

Glicerina.

**e) Técnica:**

1. En un tubo de 12 x 75 mm, medir 0.5 ml. de la suspensión de  $4 \times 10^6$  linfocitos, llevar a 2 ml. con solución salina amortiguada de Hank y agregar 0.1 ml. de suero anti-inmunoglobulinas humanas, conjugado con isotiocianato de fluoresceína.
2. Incubar a 4°C durante 30 minutos agitando suavemente cada 10 minutos.
3. Agregar de 2 a 3 cristallitos de azida de sodio para inhibir el metabolismo celular y centrifugar a 600 rpm.

4. Lavar tres veces con solución salina amortiguada de Hank.
5. Decantar el sobrenadante del último lavado y resuspender el botón celular en tres gotas de SSAH con 30% de glicerina.
6. Observar entre porta y cubreobjeto en un microscopio con condensador de campo oscuro y lámpara de luz ultravioleta, haciendo dos conteos de 100 linfocitos y verificar el resultado de la primera con la segunda cuenta, anotando el porcentaje de los que emiten fluorescencia.

**IV**  
**RESULTADOS**

*Se anotan los resultados en tablas, de cada uno de los grupos de pacientes y en las gráficas, las comparaciones de cada uno de los grupos con el grupo tomado como control.*

## GRUPO 1

## PACIENTES CON A R ACTIVA, TRATADOS CON 10 mg DE PREDNISONA AL DIA

Núm.	Sexo	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc
1	F	12300	21	2583	29	48	749	1239.8
2	F	6300	52	3276	18	54	589.6	1779
3	F	12400	26	3224	10	46	322.4	1483
4	F	4300	39	1677	9	54	150.9	905.5
5	F	3300	22	726	10	62	72.6	450.1
6	F	5800	27	1566	17	65	266.2	1017.9
7	F	12950	14	1813	7	80	126.9	1450
8	F	8500	18	1530	13	74	198.9	1132.2
9	F	5280	23	1207.5	21	27	253.5	326
10	F	6050	38	2299	25	36	574.7	827.6
11	F	11250	41	4612.5	37	36	1706.6	1660.5
n		11	11	11	11	11	11	11
$\bar{x}$		8039	29.18	2228.54	17.81	52.9	455.57	1114.69
S		3575.7	11.66	1122.76	9.46	16.5	468	467.9
$S\bar{x}$		1080.2	3.52	339.2	2.85	4.98	141.41	141.37

## GRUPO 2

PACIENTES CON AR ACTIVA, TRATADOS CON 3 g DE ACIDO ACETILSALICILICO  
Y 400 mg DE OXIFENILBUTAZONA AL DIA

Núm.	Sexo	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc
1	F	5200	25	1300	16	66	208	858
2	M	2500	54	1350	10	72	135	972
3	F	3400	56	1904	28	52	539.1	990
4	F	5700	36	2052	21	45	430.9	923.4
5	F	12100	23	2783	18	20	500.9	556.6
6	M	13200	20	2640	38	45	1003.2	1188
n		6	6	6	6	6	6	6
$\bar{x}$		7016.6	35.6	2004.8	21.8	50	468.5	864.66
S		4529.64	15.9	624	9.88	18.4	307.12	214.55
S $\bar{x}$		1856.4	6.52	255.7	4.05	7.54	125.87	87.9



## GRUPO 3

PACIENTES CON AR INACTIVA, TRATADOS CON 3 g DE ACIDO ACETILSALICILICO

Y 300 mg DE OXIFENILBUTAZONA AL DIA

Núm.	Sexo	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc
1	F	11900	55	6545	13	37	850.85	2421.6
2	M	5500	22	1210	21	58	254.1	701.8
3	M	8300	26	2158	10	57	215.8	1230
4	M	5700	41	2337	11	70	257	1635.9
5	M	7000	19	1330	15	76	199.5	1010.8
6	F	9520	28	2665.8	30	28	799.6	746.3
7	F	7800	50	3900	25	25	975	975
8	F	10500	22	2310	20	32	147.8	739.2
n		8	8	8	8	8	8	8
$\bar{x}$		8277.5	32.8	2806.9	18.12	47.87	469.45	1182.57
S		2262.2	13.88	1724.1	7.1	19.83	346.7	589.62
S $\bar{x}$		802	4.9	122.97	2.52	7.03	122.97	209.08

GRUPO 4

PACIENTES CON LES 'ACTIVO, TRATADOS CON 40 mg DE PREDNISONA AL DIA

Núm.	Sexo	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc
1	F	1400	17	238	85	14	202.3	33.3
2	F	4600	50	2300	31	35	713	805
3	F	4300	29	1247	31	62	386	773
4	F	6400	20	1280	31	57	396.8	729.6
5	F	4000	18	720	38	49	273.6	352.8
6	F	4600	31	1426	23	61	327.98	869.86
7	F	6200	20	1240	83	10	1029.2	124
8	F	4250	11	467.5	32	20	149.6	93.5
9	F	7800	33	2574	48	26	1235.5	669.2
10	F	8700	22	1914	19	46	363.6	880.4
n		10	10	10	10	10	10	10
$\bar{x}$		5225	25.1	1340.6	42.1	38	507.8	533
S		2101.75	11.1	757.4	23.4	19.6	365.1	344
S $\bar{x}$		665.1	3.5	239.6	7.4	6.2	115.5	108.8

## GRUPO 5

## PACIENTES CON LES ACTIVO, SIN TRATAMIENTO

Núm.	Sexo	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc
1	F	7500	31	2325	49	25	1139.2	581.2
2	M	6800	49	3332	24	32	799.6	1066.2
3	F	6300	69	4347	22	36	956.3	1564.9
4	M	3150	44	1386	33	6	457.3	83.1
5	F	5000	23	1150	42	41	483	471.5
n		5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x}$		5750	43.2	2508	32	28	767	753.38
S		1716.8	17.72	1341	12.58	13.6	296.6	573.8
S $\bar{x}$		769.87	7.94	601.5	5.64	6.1	133	257

## GRUPO 6

Mím. Sexo	PACIENTES CON LES INACTIVO, TRATADOS CON 20 mg DE PREDNISONA AL DIA							
	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc	
1	F	6200	48	2976	22	59	654.7	1755.8
2	F	5900	45	2655	9	54	238.9	1433.7
3	F	3500	39	1365	12	64	163.8	873.6
4	F	4300	35	1505	20	58	331	872.9
5	F	7300	24	1752	23	30	402.9	525.6
6	F	7400	78	5772	7	51	404	2943.7
7	F	2300	55	1265	5	29	63.25	366.8
8	F	8900	18	1602	27	66	437.3	1066.9
9	F	2800	21	588	38	50	223.4	294
10	F	4000	17	680	22	64	149.6	435.2
11	F	7000	43	3010	13	40	391.3	1204
12	F	4000	40	1600	25	35	400	560
13	F	8900	23	2047	41	27	839.2	552.6
14	F	5600	13	728	27	28	196.5	203.8
15	F	9350	30	2805	48	39	1346.4	1093.9
16	F	7050	19	1339.5	40	23	535.8	308
17	F	15500	47	7285	36	21	2622.6	1529.8
18	F	4700	35	1645	42	15	690.9	246.7
19	P	4900	52	2548	48	68	1223	1732.6
n		19	19	19	19	19	19	19
$\bar{x}$		5715.7	35.89	2271.97	26.57	43.2	595.5	947.34
S		3016	16.4	1692.97	13.78	17.2	600.19	703.42
S $\bar{x}$		693.49	3.77	389.18	3.16	3.95	137.97	161.7

## GRUPO DE SUJETOS CONSIDERADOS "NORMALES"

Núm.	Sexo	Leucocitos en mmc	Linfocitos en %	Linfocitos en mmc	Linfocitos B en %	Linfocitos T en %	Linfocitos B/mmc	Linfocitos T/mmc
1	M	7000	25	1750	20	73	350	1244.6
2	F	7500	30	2250	17	77	382.5	1732.5
3	M	5000	30	1500	15	75	225	1125
4	M	5350	30	1605	25	65	401.25	1043.2
5	M	4200	30	1260	20	68	252	856.8
6	M	8100	30	2430	13	74	315.9	1798.2
7	M	5700	47	2679	13	72	348.2	1928
8	M	7550	52	3926	10	68	392.6	2669
9	M	6200	60	3720	18	66	669.6	2455
10	M	7700	53	4081	13	64	530.5	2611
11	M	5100	53	2703	15	63	405.45	1702
12	M	5700	38	2166	17	55	368.22	1191
13	M	5200	37	1924	16	58	307.80	1115
14	M	5200	56	2912	16	67	465.9	1951
15	F	8000	48	3840	14	73	537.6	2803
16	F	3200	62	1984	16	72	317.44	1428
17	F	3600	43	1548	17	68	263.16	1052
18	F	5700	39	2223	14	64	311	1422
19	F	4700	56	2632	11	68	289	1789
n		19	19	19	19	19	19	19
$\bar{x}$		5826	43.1	2480.6	15.7	67.80	375.4	1679.8
S		1464.8	11.9	873.4	3.47	5.71	111.05	602.5
$S\bar{x}$		336.7	2.7	200.7	0.806	1.32	25.82	145.08

## LINFOCITOS B EN %

Grupos      Grados de       $t$ -calculada       $t$ -de tablas      P      Significancia  
                  Libertad

1 con 2	15	0.818	2.131	$>0.05$	NS
1 con 3	17	0.077	2.110	$>0.05$	NS
2 con 3	12	0.813	2.179	$>0.05$	NS
4 con 5	13	0.890	2.160	$>0.05$	NS
4 con 6	27	2.259	2.052	$<0.05$	S
5 con 6	22	1.145	2.074	$>0.05$	NS
1 con 4	19	3.173	2.861	$<0.01$	S
AR con LES	57	3.505	3.460	$<0.001$	S
I con 1	28	0.979	2.048	$>0.05$	NS
I con 2	23	2.054	2.069	$>0.05$	NS
I con 3	25	1.315	2.060	$>0.05$	NS
I con 4	27	4.934	3.690	$<0.001$	S
I con 5	32	5.287	3.792	$<0.001$	S
I con 6	36	3.404	2.704	$<0.01$	S
I con AR	42	1.643	2.021	$>0.05$	NS
I con LES	51	4.098	3.460	$<0.001$	S

AR - 1, 2, 3.

LES - 4, 5, 6.

## LINFOCITOS T EN 1

Grupos      Grados de      *t*-calculada      *t*-de tablas      P      Significancia  
 Libertad      Estadística

1 con 2	15	0.333	2.131	>0.05	NS
1 con 3	17	0.602	2.110	>0.05	NS
2 con 3	12	0.204	2.179	>0.05	NS
4 con 5	13	1.012	2.160	>0.05	NS
4 con 6	27	0.736	2.052	>0.05	NS
5 con 6	22	1.818	2.074	>0.05	NS
1 con 4	19	1.885	2.093	>0.05	NS
AR con LES	57	2.436	2.390	<0.02	S
I con 1	28	3.637	2.763	<0.01	S
I con 2	23	3.835	3.757	<0.001	S
I con 3	25	4.107	3.725	<0.001	S
I con 4	27	6.227	3.690	<0.001	S
I con 5	36	10.20	3.792	<0.001	S
I con 6	36	5.921	3.551	<0.001	S
I con AR	42	4.225	3.551	<0.001	S
I con LES	51	6.727	3.460	<0.001	S

AR - grupos 1, 2, 3.

LES - grupos 4, 5, 6.

LINFOCITOS B EN *smc*

Grupos      Grados de      *t*-calculada      *t*-de tablas      P      Significancia  
                  Libertad

1 con 2	15	0.060	2.131	> 0.05	NS
1 con 3	17	0.030	2.110	> 0.05	NS
2 con 3	12	0.036	2.179	> 0.05	NS
4 con 5	13	1.369	2.169	> 0.05	NS
4 con 6	27	0.420	2.052	> 0.05	NS
5 con 6	22	0.612	2.074	> 0.05	NS
1 con 4	19	0.212	2.093	> 0.05	NS
AR con LES	57	1.138	2.000	> 0.05	NS
I con 1	28	0.837	2.048	> 0.05	NS
I con 2	23	0.985	2.069	> 0.05	NS
I con 3	25	1.001	2.060	> 0.05	NS
I con 4	27	1.476	2.052	> 0.05	NS
I con 5	22	4.824	3.792	< 0.001	S
I con 6	36	4.362	3.551	< 0.001	S
I con AR	42	0.960	2.021	> 0.05	NS
I con LES	51	1.906	2.000	> 0.05	NS

AR - grupos 1, 2, 3.

LES - grupos 4, 5, 6.



## LINFOCITOS T EN mmc.

Grupo	Grados de Libertad	t-calculada	t-de tablas	P	Significancia Estadística
1 con 2	15	1.226	2.131	> 0.05	NS
1 con 3	17	0.280	2.110	> 0.05	NS
2 con 3	12	1.249	2.179	> 0.05	NS
4 con 5	13	0.940	2.160	> 0.05	NS
4 con 6	27	1.745	2.052	> 0.05	NS
5 con 6	22	0.566	2.074	> 0.05	NS
1 con 4	19	3.106	2.861	< 0.01	S
AR con LES	57	2.028	2.000	< 0.05	S
I con 1	28	2.602	2.467	< 0.02	S
I con 2	23	3.148	2.807	< 0.01	S
I con 3	25	1.919	2.060	> 0.05	NS
I con 4	27	5.263	3.690	< 0.001	S
I con 5	22	2.997	2.819	< 0.01	S
I con 6	36	3.395	2.704	< 0.01	S
I con AR	42	3.650	3.551	< 0.001	S
I con LES	51	5.041	3.460	< 0.001	S

AR - grupos 1, 2, 3.

LES - grupos 4, 5, 6.

El objetivo fundamental del trabajo que se presenta, fue establecer el porcentaje y la cantidad por milímetro cúbico de linfocitos T y B en 59 pacientes con A.R. o L.E.S. quienes estaban bajo tratamiento con corticoesteroides o ácido acetilsalicílico y oxifenilbutazona, tanto en actividad como inactividad de la enfermedad y un grupo de sujetos sanos como control.

La inquietud despertada por este trabajo en nuestro medio fue la discrepancia de los resultados reportados por investigadores como: Mellbye, Froland y Papamichail.

Mellbye, en pacientes con A.R., reporta 15% de células B y en controles normales reporta 18.9% (22)

Mellbye, difiere de Papamichail quien encontró alto porcentaje de inmunoglobulinas en linfocitos de sangre periférica de pacientes con A.R., reporta 45% de células B (26).

Froland reporta 11% de células B en pacientes con A.R. y un rango de 3-22% (10).

En este trabajo la población de linfocitos alcanzó una pureza mayor de 95% en todos los casos, y la viabilidad fue mayor de 90 por ciento.

Los resultados obtenidos en porcentaje y en milímetro cúbico tanto en linfocitos B como en Linfocitos T se resumen en la siguiente tabla:

Grupo	Linfocitos T		Linfocitos B	
	%	mmc	%	mmc
1)	52.9 + - 4.98	1114.69 + - 141.37	17.81 + - 2.85	455.57 + - 141.41
2)	50 + - 7.54	866.66 + - 87.9	21.8 + - 4.05	468.5 + - 125.87
3)	47.87 + - 7.03	1182.57 + - 209.08	18.12 + - 2.52	462.45 + - 122.97
4)	38 + - 6.2	533 + - 108.8	42.1 + - 7.4	507.8 + - 115.5
5)	28 + - 6.1	753.38 + - 257	32 + - 5.64	767 + - 133
6)	43.2 + - 3.95	947.34 + - 161.7	26.57 + - 3.16	595.5 + - 137.97
N)	67.8 + - 1.32	1679.8 + - 145.08	15.7 + - 0.806	375.4 + - 25.82

Ahora bien al análisis de los resultados encontramos que en mmc.

En el grupo 1: Pacientes con AR activa, tratados con 10 mg de prednisona al día.

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $114.6 \pm 141.3$  mientras que en los controles fueron de  $167.9 \pm 145.08$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.02$ .

En el grupo 2: Pacientes con AR activa, tratados con 3 g de ácido acetilsalicílico y 400 mg de oxifenilbutazona al día.

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue  $864 \pm 87.9$  mientras que en los controles normales fue de  $1679.08 \pm 145.08$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.01$ .

Las cifras para linfocitos B fueron de  $468.5 \pm 125.87$  y en los controles normales de  $375.4 \pm 25.82$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

En el grupo 3: Pacientes con AR inactiva, tratados con 3 g de ácido acetilsalicílico y 300 mg de oxifenilbutazona al día.

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una leve disminu--

-nución y su número fue de  $118.57 \pm 209.08$  mientras que en los controles normales fue de  $1679.8 \pm 145.08$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Las cifras para linfocitos B fueron de  $462.45 \pm 122.97$  en los controles normales de  $375.4 \pm 25.82$  no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

En el grupo 4: Pacientes con L.E.S., activo tratados con 40 mg de prednisona al día.

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $533 \pm 108.8$  mientras que en los controles normales fue de  $1679.8 \pm 145.08$  la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$

Las cifras para linfocitos B fueron de  $507.8 \pm 115.5$  y en los controles normales de  $375.4 \pm 25.82$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

En el grupo 5: Pacientes con L.E.S. activo, sin tratamiento.

Los linfocitos formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $753.38 \pm 257$  mientras que en los controles normales fue de  $1679.8 \pm 145.08$ , la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$

Las cifras para linfocitos B mostraron un aumento importante y su número fue de  $767 \pm 133$ , mientras que en los controles normales fue de  $375.4 \pm 25.82$ , la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

En el grupo 6: Pacientes con L.E.S., inactivo tratados con 20 mg de prednisona al día.

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $947.34 \pm 161.7$  mientras que en los controles normales fue de  $1679.8 \pm 145.08$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B mostraron un aumento importante y su número fue de  $595.5 \pm 137.97$  mientras que en los controles normales fue de  $375.4 \pm 25.82$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$

Estos resultados se pueden observar ampliamente en las gráficas 1 y 2.

Y los resultados encontrados en porcentaje son:

En el grupo 1:

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $52.9 \pm 4.98$  mientras que en los controles normales es de  $67.8 \pm 1.32$  la diferencia entre am

-bos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.01$ .

Las cifras para linfocitos B fueron  $17.81 \pm 2.85$  y en los controles normales de  $15.7 \pm 0.806$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

**En el grupo 2:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $50 \pm 7.54$  mientras que en los controles normales es de  $67.8 \pm 1.32$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.01$ .

Las cifras para linfocitos B fueron  $21.8 \pm 4.05$  y en los controles normales de  $15.7 \pm 0.806$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

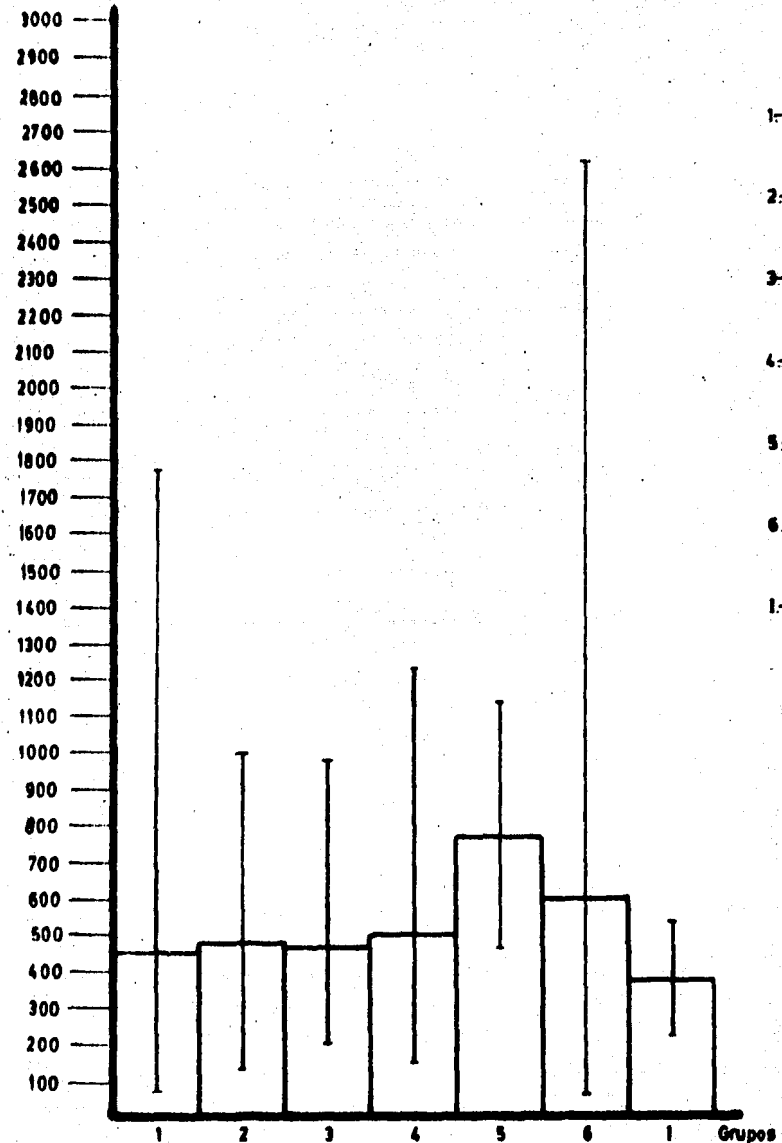
**En el grupo 3:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $47.87 \pm 7.03$  mientras que en los controles normales es de  $67.8 \pm 1.32$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B fueron de  $18.12 \pm 2.52$  y en los controles normales de  $15.7 \pm 0.806$ , no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

Linocitos  $\times$  mm<sup>3</sup>

Gráfica número 1



1- A.R. Activa con prednisona.

2- A.R. Activa sin prednisona.

3- A.R. Inactiva sin prednisona.

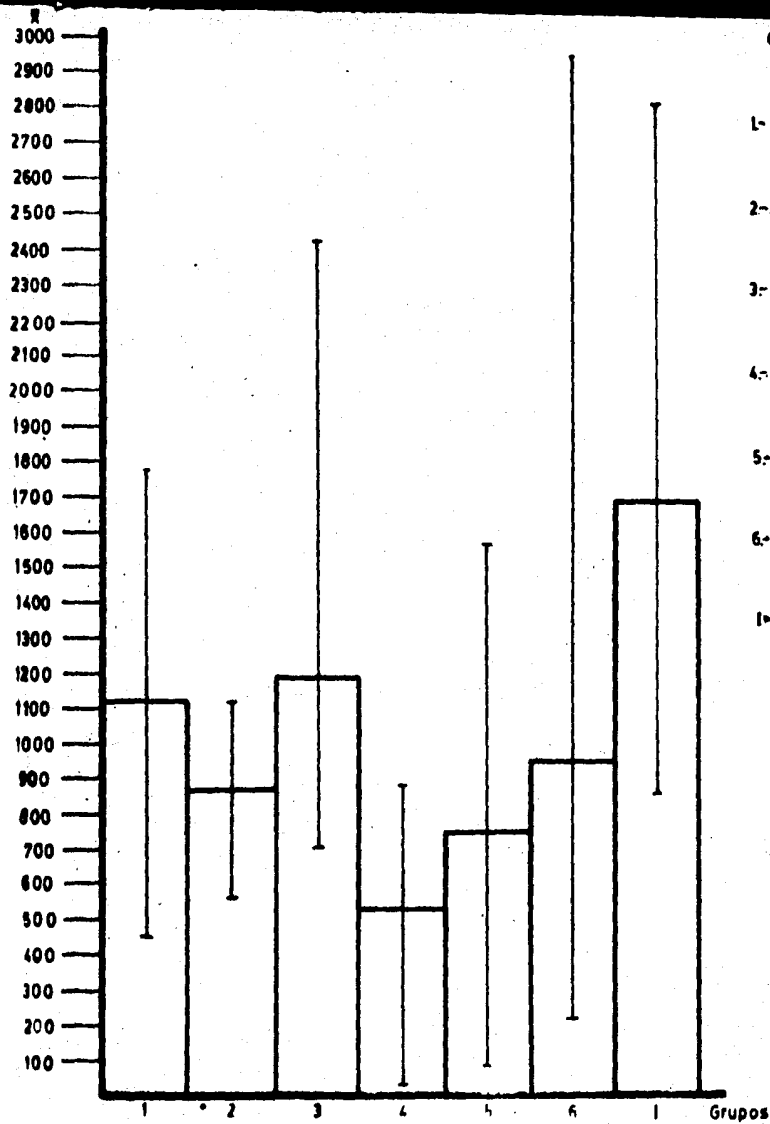
4- L.E.S. Activo con prednisona.

5- L.E.S. Activo sin tratamiento.

6- L.E.S. Inactiva con prednisona.

7- Control.





Gráfica número 2

1- A.R. Activa con prednisona.

2- A.R. Activa sin prednisona.

3- A.R. Inactiva sin prednisona.

4- L.E.S. Activo con prednisona.

5- L.E.S. Activo sin tratamiento.

6- L.E.S. Inactivo con prednisona

7- Control

**En el grupo 4:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $38 \pm 6.2$  mientras que en los controles normales es de  $67.8 \pm 1.32$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B mostraron un aumento importante y su número fue de  $42.1 \pm 7.4$  mientras que en los controles normales de  $15.7 \pm 0.806$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

**En el grupo 5:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución muy importante y su número fue de  $28 \pm 6.1$  mientras que en los controles normales fue de  $67.8 \pm 1.32$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B mostraron un aumento importante y su número fue de  $32 \pm 5.64$  mientras que en los controles normales es de  $15.7 \pm 0.806$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

**En el grupo 6:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $43.2 \pm 3.95$  mientras que en los controles normales fue de  $67.8 \pm 1.32$  la diferencia entre am

-bos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B mostraron un aumento importante y su número fue de  $26.57 \pm 3.16$  mientras que en los controles normales de  $15.7 \pm 0.805$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Y los resultados se pueden observar ampliamente en las gráficas 3 y 4.

Esto es lo que podríamos considerar como los valores encontrados en estos grupos de pacientes en nuestro medio. Sin embargo también nos llamó la atención el significado estadístico que pudiera existir entre el grupo formado por todos los pacientes con A.R. (grupo 1,2 y 3) y el grupo formado por todos los pacientes con L.E.S. (grupo 4,5 y 6).

Y cada uno de estos grupos (A.R. y L.E.S.) con el grupo control.

Grupo	Linfocitos T		Linfocitos B	
	%	mmc	%	mmc
A.R.	$50.6 \pm 3.48$	$1088.4 \pm 92.15$	$18.86 \pm 1.77$	$460.88 \pm 76.43$
L.E.S	$39.44 \pm 3.06$	$796.97 \pm 105.23$	$32.23 \pm 3.05$	$594.93 \pm 85.8$
CONTROL	$67.8 \pm 1.32$	$1679.8 \pm 145.08$	$15.7 \pm 0.806$	$375.4 \pm 25.82$

En el grupo de A.R. para valores en porcentaje:

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $50.6 \pm 3.48$  mientras que en los controles normales fue de  $67.8 \pm 1.32$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B fueron de  $18.88 \pm 1.77$  y en los controles normales de  $15.7 \pm 0.806$  no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

En el grupo de L.E.S. para valores en porcentaje:

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $39.44 \pm 3.06$  mientras que en los controles normales fue de  $67.8 \pm 1.32$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B mostraron un aumento importante y su número fue de  $32.23 \pm 3.05$ , mientras que en los controles normales fue de  $15.7 \pm 0.806$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Comparando los grupos A.R. y L.E.S. en por ciento.

Las células T formadoras de rosetas en pacientes con A.R. --

muestran valores de  $50.6 \pm 3.48$  mas alto, comparándolos con los obtenidos en pacientes con L.E.S. cuyas cifras son de  $-39.44 \pm 3.06$ , la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa con una  $p < 0.02$ .

Las cifras para linfocitos B en pacientes con A.R. muestra valores de  $18.88 \pm 1.77$  menores de los encontrados en L.E.S., - que son  $32.23 \pm 3.05$  la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

**En el grupo A.R., para valores en milímetro cúbico:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución importante y su número fue de  $1088.4 \pm 92.15$  mientras que en los controles normales fue de  $1679.8 \pm 145.08$  la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B fueron de  $460.88 \pm 76.43$  y en los controles normales de  $15.7 \pm 0.806$ , no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

**En el grupo de L.E.S., para valores en milímetro cúbico:**

Los linfocitos T formadores de rosetas mostraron una disminución muy importante y su número fue de  $796.97 \pm 105.23$  mientras que en los controles normales son de  $1679.8 \pm 145.08$ , la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significati-

-va con una  $p < 0.001$ .

Las cifras para linfocitos B fueron de  $594.93 \pm 85.8$  mientras que en los controles normales fue de  $375.4 \pm 25.82$  no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

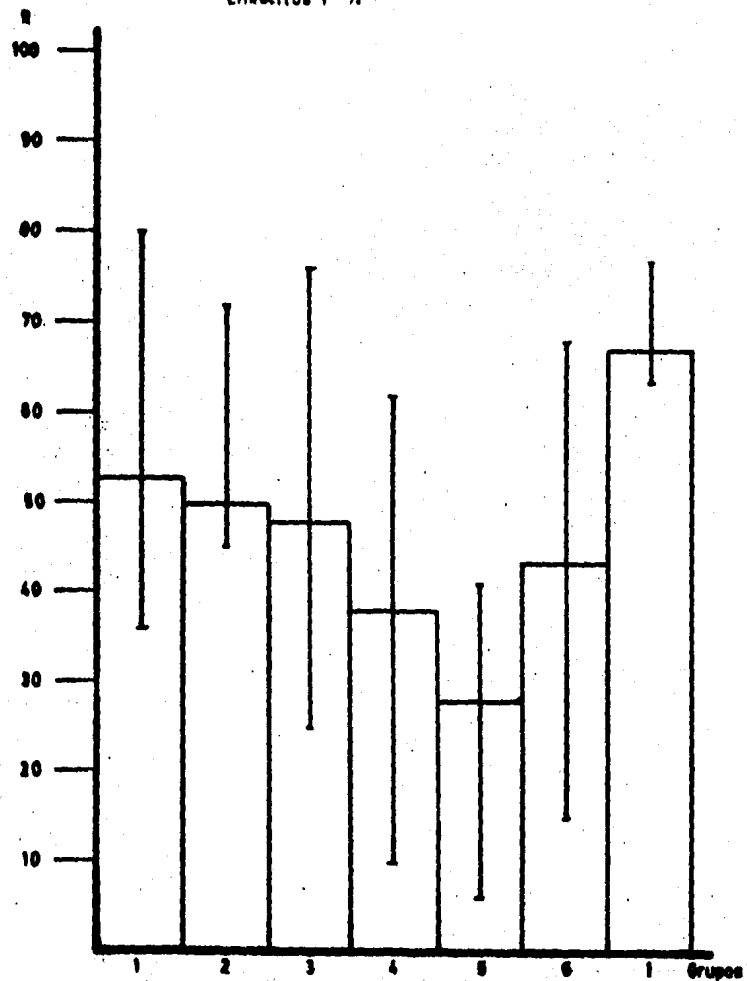
Comparando los valores de los grupos A.R. y L.E.S., en milímetro cúbico:

Las células T formadores de rosetas en pacientes con A.R., muestran valores de  $1088.4 \pm 92.15$  mas alta comparados con los obtenidos en pacientes con L.E.S., cuyas cifras son de  $796.97 \pm 105.23$ , la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$ .

Las cifras para linfocitos B en pacientes con A.R., fueron de  $460.88 \pm 76.43$  y los encontrados en pacientes con L.E.S., son de  $594.93 \pm 85.8$ , no hubo diferencia estadísticamente en ambos grupos.

Linfocitos T %

Gráfica número 3



1- A.R. Activa con prednisona.

2- A.R. Activa sin prednisona.

3- A.R. Inactiva sin prednisona.

4- L.E.S. Activo con prednisona.

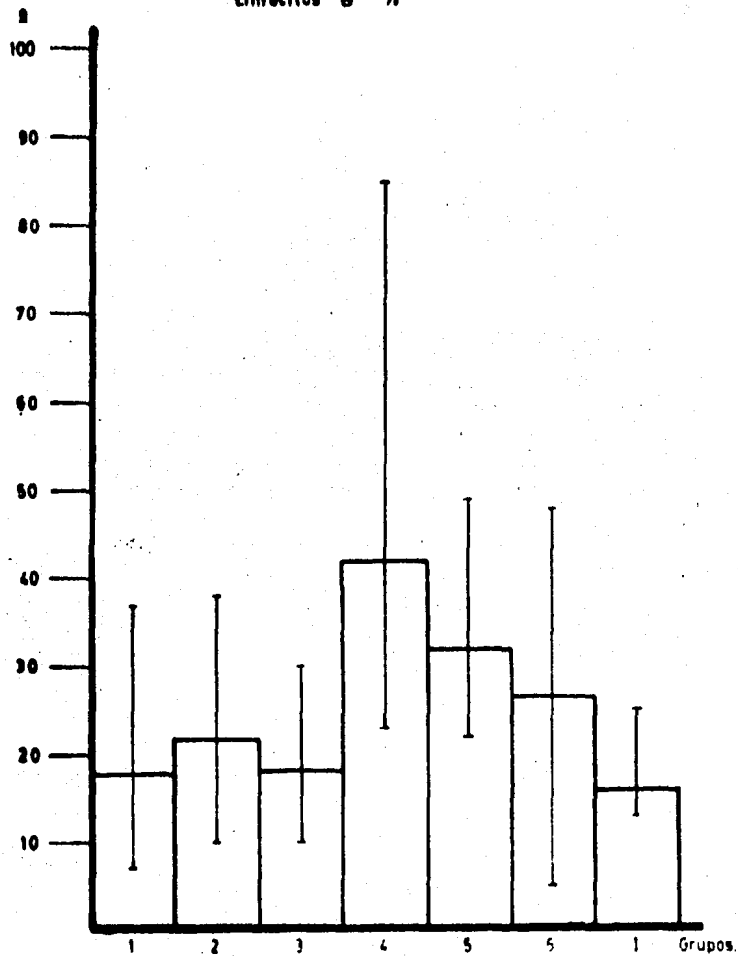
5- L.E.S. Activo sin tratamiento.

6- L.E.S. Inactiva con prednisona.

7- Control.

Linfocitos B %

Gráfica número 4



1- A. R. Activa con prednisona.

2- A. R. Activa sin prednisona.

3- A. R. Inactiva sin prednisona.

4- L. E. S. Activo con prednisona.

5- L. E. S. Activo sin tratamiento.

6- L. E. S. Inactivo con prednisona.

7- Control.



V

D I S C U S I O N

De acuerdo a los hallazgos encontrados en este trabajo, donde se observa una disminución importante en porcentaje y números absolutos de células T en todos los grupos lo que no difiere de lo informado previamente por Messner en L.E.S., y por Froland en A.R. (24) (10). Los resultados obtenidos se relacionan con la actividad clínica, sin poder concluir que pudiera deberse también al efecto terapéutico.

Los eventos fisiopatológicos de A.R., son regulados por la inmunidad mediada por células en esta enfermedad la respuesta "in vitro" de los linfocitos es variable, pero en general se ha encontrado que en pacientes inactivos, las cifras de linfocitos T y B son parecidas a los normales, mientras que en pacientes con actividad de la enfermedad hay disminución significativa de las células T, algunos investigadores han encontrado aumento en porcentaje de células nulas o sin marcador. Otros sugieren que en L.E.S., los anticuerpos linfocitotóxicos son responsables de la depresión de células T. (32) (24)

Los siguientes investigadores examinaron el porcentaje de células B de terminadas por inmunoglobulinas en su superficie.

Papamichail y colaboradores estudiaron 16 pacientes encontrando 45% de linfocitos B. (26)

Mellbye y colaboradores inicialmente encontraron un ligero decremento en células B por esta técnica. (22)

En el estudio hecho por Williams y colaboradores esta pequeña diferencia desaparece. (32)

Froland y colaboradores también encontraron porcentajes normales de células B en sangre de pacientes con A.R. (10)

En el estudio hecho por Mellbye y colaboradores se usó un segundo marcador para células B formadores de rosetas C3 la diferencia fue despreciable y correspondió a los datos encontrados por la técnica de inmunofluorescencia con suero anti-inmunoglobulinas, Williams y colaboradores usaron un suero-anticélulas T, el porcentaje de células T en pacientes con mayor actividad de la enfermedad tienden a decrecer, en este mismo grupo de pacientes encontraron que tenían un porcentaje significativo de células no identificadas como células T o células B que llamaron células nulas. Froland y colaboradores estudiaron ocho pacientes encontrando un decremento de células T con respecto a los controles normales.

Los resultados obtenidos para valores de referencia en el presente estudio coinciden con los informados previamente en la literatura por Williams Jr., y colaboradores. (32)

	Células T %	Células B %
Williams Jr., y Colab.	75.3 ± 13.95 %	22.9 ± 7.1 %
Valores de Referencia encontrados en este trabajo.	67.8 ± 1.32	15.7 ± 0.806

Las razones para estas discrepancias pueden ser debidas a diferencia en la metodología usada por cada uno de los investigadores y también a la diferencia en la población de pacientes estudiados.

En el estudio que nos ocupa en todos los grupos se observa un aumento tanto en números absolutos como en porcentajes con respecto a los controles normales de células B, siendo dicho incremento muy ligero, no significativo estadísticamente en células B de pacientes con A.R., no así en los pacientes con L.E.S., donde encontramos un nivel de linfocitos B más alto en los pacientes con enfermedad activa, encontrando una diferencia entre los casos con tratamiento y sin él, siendo mayor en estos últimos, pero también se vieron incrementadas las cifras de linfocitos B en los pacientes con L.E.S., inactivo con respecto a los sujetos normales.

VI

R E S U M E N

Se estudiaron las poblaciones de linfocitos en sangre periférica de 59 pacientes de ambos sexos con edades de 20 a 45 años del Servicio de - Reumatología Hospital General Centro Médico la Raza, y 19 sujetos aparentemente "sanos" como grupo control.

Los pacientes se dividieron en 6 grupos, 3 con diagnóstico de A.R., y 3 con diagnóstico de L.E.S., en actividad con y sin tratamiento e inactividad de la enfermedad con tratamiento.

Los linfocitos se separaron por el método de Boyum en gradiente de Ficoll-Hypaque, usando solución de Hank, para mantener la viabilidad de los linfocitos y ajustados a una suspensión de  $4 \times 10^6$  linfocitos por mmc.

De esta suspensión se procede a determinar los linfocitos T por formación de rosetas con glóbulos rojos de camero tratados con neuraminidasa y los linfocitos B por inmunofluorescencia directa.

Los linfocitos T y B en % como en mmc de todos los grupos de pacientes se graficaron comparándolos con el grupo control.

En el análisis de las gráficas se observaron los siguientes cambios en los linfocitos T y B.

La fracción de linfocitos B por mmc fueron mas o menos semejantes - gráfica y estadísticamente en los grupos 1, 2, 3 y 4, los grupos 5 y

6 tienen estadísticamente más linfocitos B por mmc en comparación con el grupo control.

El grupo control tiene estadísticamente más linfocitos T en porcentaje que todos los grupos de enfermos.

En la gráfica de linfocitos T en mmc también el control tiene estadísticamente más linfocitos T.

Los enfermos de L.E.S., activo tienen un nivel de linfocitos B en porcentaje más alto que los demás grupos incluyendo el control.

L I N F O C I T O S T		
Grupo	%	mmc
1. A.R. activa con prednisona	52.9 $\pm$ 4.98	1114.69 $\pm$ 141.37
2. A.R. activa sin prednisona	50 $\pm$ 7.54	864.66 $\pm$ 87.9
3. A.R. inactiva sin prednisona	47.87 $\pm$ 7.03	1182.57 $\pm$ 209.08
4. L.E.S. activa con prednisona	38 $\pm$ 6.2	533 $\pm$ 108.8
5. L.E.S. activa sin tratamiento	28 $\pm$ 6.1	753.38 $\pm$ 257
6. L.E.S. inactiva con prednisona	43.2 $\pm$ 3.95	947.34 $\pm$ 161.7
I. C O N T R O L	67.8 $\pm$ 1.32	1679.8 $\pm$ 145.08

L I N F O C I T O S   B		
Grupo	%	mmc
1. A.R. activa con prednisona	17.81 $\pm$ 2.85	455.57 $\pm$ 141.41
2. A.R. activa sin prednisona	21.8 $\pm$ 4.05	468.5 $\pm$ 125.87
3. A.R.inactiva sin prednisona	18.12 $\pm$ 2.52	462.45 $\pm$ 122.97
4. L.E.S.activo con prednisona	42.1 $\pm$ 7.4	507.8 $\pm$ 115.5
5. L.E.S.activo sin tratamiento	32 $\pm$ 5.64	767 $\pm$ 133
6. L.E.S.inactivo con prednisona	26.57 $\pm$ 3.16	595.5 $\pm$ 137.97
I. C O N T R O L	15.7 $\pm$ 0.806	375.4 $\pm$ 25.82



**VII**

**CONCLUSIONES**

Los pacientes estudiados mostraron en todos los casos disminución de células T, es posible que esta variación en A.R., se deba a la presencia de complejos inmunes intra-articulares, o bien al bloqueo del receptor Fc por el factor reumatoide circulante, disminuyendo así la capacidad que tienen las células T para formar rosetas. En los pacientes con L.E.S., la disminución de células formadoras de rosetas T probablemente se deba a la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos.

En todos los grupos se observa un aumento tanto en números absolutos como en porcentaje con respecto a los normales de células B siendo dicho incremento muy ligero, no significativo estadísticamente en células B de pacientes con A.R., no así en los pacientes con L.E.S., donde encontramos un nivel de linfocitos B más alto en los pacientes con enfermedad activa, encontrando una diferencia entre los grupos con tratamiento, y sin tratamiento, siendo mayor en estos últimos.

En pacientes que tienen gran actividad clínica se desarrollan títulos altos de factor reumatoide dando como resultado la disminución de linfocitos T en sangre periférica, por lo tanto puede suponerse que la subpoblación de células T supresoras está afectada en virtud de que son incapaces de "frenar" a la células B, en la producción de factor reumatoide, y así el daño tisular será perpetuo; esto es solo una hipótesis ya que los factores de los que depende la génesis de la autoinmunidad y la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos, así como la aberración de los mecanismos inmunorregulatorios requieren de mayor investigación.

VIII

**BIBLIOGRAFIA**

1. ALAN I. BRENNER, MORTON A SCHEINBERG, and EDGAR S. CATHCART. Surface characteristics of synovial fluid and peripheral blood lymphocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 18:207, 1975.
2. ALARCON SEGOVIA DONATO. Introducción a la Reumatología. Sociedad Mexicana de Reumatología, A.D., 1977.
3. A. BOYUM. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand. J. Clin Lab. Invest.* 1 suppl. 97, 51, 1968.
4. A. BOYUM Isolation of leucocytes from human blood. *J. Clin. Lab. Invest.*, 1 suppl. 97, 9, 1968.
5. A. BOYUM. Isolation of leucocytes from human blood further observations. *J. Clin. Lab. Invest.* 1 suppl. 97, 31, 1968.
6. A. BOYUM. Isolation of mononuclear cells and granulocytes by -- combining centrifugation and sedimentation at 1 G *J. Clin. Lab. Invest.* 1 suppl. 97, 77, 1968.
7. A BOYUM. General discussion. *J. Clin. Lab. Invest.* 1 suppl. 97, 107, 1968.
9. FROLAND, S.S., Binding of sheep eritrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T lymphocytes. *Scand. J. Immunol* 1, 269, 1972.
10. FROLAND, S.S., NATVING, J.B. and HUSBY, G. Immunological characterization of lymphocytes in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 2, 67, 1973.
11. FROLAND, S.S. and NATVIG, J.B. Surface - bound immunoglobulin on - lymphocytes from normal and immuno deficient humans. *Scand. J* -

Immunol. 1: 1, 1972.

12. H. HUGH FUDENBERG and E.C. FRANKLIN. Rheumatoid factors and the etiology of rheumatoid arthritis. Departaments of Medicine, University of California School of Medicine, San Francisco, Calif., and New York University Scholl of Medicine, New York, N.Y. 1962.
13. GALILI, U. and MICHAEL SCHELESINGER. The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. J. Immunol. 112: 1628, 1974.
14. Herrera, E.R. y Col. Poblaciones de linfocitos en artritis reumatoide. Arch. Invest. Méd. (Méx) 12:153, 1981.
15. HORWITS, D.A, M.D. JOHN B. COUSAR M.D. a relationship between impaired cellular immunity, humoral suppression of lymphocytes - fuction and severity of systemic lupus erythematosus. Am. J.Med. 58: 829, 1975.
16. HORWITS, D.A. and PETER J. LOBO. Characterization of two populations of human lymphocytes bearing easily detectable surface -- immunoglobulin. J. Clin. Invest. 56: 1464, 1975.
17. H. HUGH. FUDENBERG Inmunología clínica segunda edición. El manual moderno, S.A. Méx. 11, D.F., 1980.
18. JOHNSON, T.M. and JAMES E. GARVIN. Separation of lymphocytes in blood by means of glass wool clumn. Acta Haematol 35: 294, 1966.
19. KEITH, H.J. and H.L.F. CURREY. Rosette formation by peripheral - blood lymphocytes in rheumatoid arthritis. Ann Rheum. Dis. 32: 202, 1973.

20. KREYSZIG, E. Introducción a la estadística matemática.  
Editorial Limusa México 1981.
21. M.H. WILLIAMS. Leucocyte migration inhibition induced by Ig  
in rheumatoid arthritis. Lancet, 1071, 1971.
22. MELLBYE, O.J. RONALD P. MESSNER, JAMES T. DEBORD and RALPH C. -  
WILLIAMS, Jr. Arthritis Rheum 15: 371, 1972.
23. MESSNER R.P. Clinical Aspects of T and B lymphocytes in rheu  
matic diseases. Arthritis Rheum 17: 339, 1974.
24. MESSNER, R.P., FOLKE. D. LINDSTROM, and RALPH. C. WILLIAMS Jr. Pe  
ripheral blood lymphocyte cell surface markers during the course  
of sistemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest.52: 3046, 1973.
25. NAKAMURA, R.M. Immunopathology Little, Brown and company. First  
edition, 1974.
26. PAPAMICHAIL. M., J.C. BROWN, E.J. HOLBOROW. Immunoglobulins on -  
the surface of human lymphocytes. Lancet. 850, 1971.
27. PERNIS B., M.D., LUCIANA FORNJI, and LUISA AMANTE. Immunoglobulin  
spots on the surface of rabbit lymphocytes J. Exp. Med. 132:1001,  
1970.
28. RABELLINO E. and HOWARD M. GREY. Immunoglobulins on the surface  
of lymphocytes: III. Bursal origin of surface immunoglobulins on  
chicken lymphocytes. J. Immunol 106: 1418, 1971.
29. RABELLINO E., SONIA COLON, HOWARD M. GREY, M.D., and EMIL R. UNANUE  
M.D., Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. J. Exp. Med.  
133: 156, 1970.

30. UNANUE, E.R. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. J. Exp. Med. 133: 1188, 1971.
31. WEINER M.S., CELSO BIANCO and VICTOR NUSSENZWEIG. Blood. 42: 939, 1973.
32. WILLIAMS, RALPH C. Jr. JAMES R. DEBOARD, OVE S. MELLBYE RONALD P. MESSNER, and FOLKE D. LINDSTROM. Studies of T and B lymphocytes in patients with connective Tissue diseases. J. Clin. Invest. 52: 283, 1973.
33. WYBRAN JOSEPH, M.D.H. HUGH FUDENBERG, M.D. Thymus derived. rosette-forming cells. N. Engl. Med. 288: 1072 1973.
34. ZIFF MORRIS. Viruses and the connective tissue diseases. Ann Intern. Med. 75: 951. 1971.