

2º. 14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**RINOESCLEROMA: ESTUDIOS DE TRANSFORMACION
BLASTOIDE, Y DETERMINACION DE LINFOCITOS T
TOTALES, SUPRESORES Y COOPERADORES.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ

MEXICO, D. F.

1 9 8 7.



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.

I N D I C E

	Pags.
I.- INTRODUCCION -----	1
A.- Sistema Inmune -----	1
A.1.- Bases moleculares de la inmunidad ad- quirida-----	2
A.2.- Origen y diferenciación de los linfo- citos-----	3
A.3.- Respuesta inmune celular -----	4
A.3.1.- Linfocitos T-----	4
A.3.2.- Valoración de la respuesta inmu- ne celular-----	6
B.- Rinoscleroma-----	12
B.1.- Características generales-----	12
B.2.- Etiología-----	13
B.3.- <u>Klebsiella rhinoscleromatis</u> -----	14
B.4.- Cuadro clínico-----	15
B.5.- Epidemiología -----	17
B.6.- Tratamiento-----	18
B.7.- Estudios inmunológicos-----	18
II.- MATERIAL Y METODOS -----	22
A.- Población de pacientes con rinoscleroma- -----	22
B.- Obtención de células mononucleares por -- la técnica de Böyum-----	26
C.- Determinación de linfocitos T por forma- ción de Rosetas-E -----	27

D.- Determinación de subclases de linfocitos T con anticuerpos monoclonales-----	28
E.- Determinación de la transformación blastoide por estimulación con Con-A-----	32
III.- RESULTADOS -----	34
IV.- DISCUSION -----	42
V.- APENDICE -----	45
VI.- BIBLIOGRAFIA -----	48

INDICE DE FIGURA, TABLAS Y CUADROS.

	Pags.
Figura 1: Diferenciación de los linfocitos -----	11
Cuadro 1: Datos clínicos de los pacientes con rino- escleroma -----	24
Tabla I: Características de los anticuerpos monoclo- nales utilizado para identificar a los di- ferentes linfocitos T -----	30
Tabla II: Cuantificación de células mononucleares -- en sangre periférica -----	36
Tabla III: Determinación de linfocitos T totales, T- cooperadores y T supresores -----	37
Figura 2: Comparación de valores individuales de lin- focitos Tt, linfocitos T cooperadores y -- linfocitos T supresores, tanto de pacien - tes con rinoscleroma como de controles---	38
Tabla IV.- Valores promedio de la respuesta de linfg citos a la concanavalina-A -----	39
Figura3: Comparación de los valores individuales de- la respuesta linfocitaria al estímulo mitó genico con con-A -----	40
Figura4: Dosis-respuesta de linfocitos de pacientes- con escleroma o individuos normales a la -- con-A -----	41

I.- INTRODUCCION.

A. SISTEMA INMUNE:

El grupo de fenómenos que integran la respuesta inmune se encuentra, por razones históricas, asociado a un concepto de "protección", de defensa contra las agresiones externas para el organismo donde se desarrolla.

La etimología de la palabra inmune (del latín immunis: libre, exento) sugiere el carácter protector del fenómeno.

El hecho que la respuesta inmune participe en gran número de fenómenos biológicos aparentemente no relacionados entre sí (infecciones, trasplantes de tejido, enfermedades de hipersensibilidad, cáncer y más recientemente, homeostasis), sugiere multiplicidad de funciones que pueden reducirse a una fundamental: La respuesta inmune es un mecanismo de los vertebrados que distingue sustancias "propias" de las "no propias" a nivel molecular y tiende a asegurar así la individualidad del organismo que la desarrolla (1).

1.- Inmunidad Natural e Inespecífica:

Representa la suma de sustancias orgánicas y actividades celulares destinadas a enfrentarse a estímulos externos producidos por expresión espontánea de la información genética de las células que integran a un individuo.

Algunos ejemplos son, la lisozima de la saliva, lágrimas y tejidos, barreras físicas de la piel y membranas mucosas, efecto mecánico, sistema proteico del complemento y la fagocitosis.

Otra característica de este tipo de inmunidad es que la exposición primaria o secundaria a una misma sustancia extraña, tendrá las mismas consecuencias.

2.- Inmunidad Adquirida o Específica:

Inducida por una sustancia extraña habitualmente externa, conocida como antígeno, que dará el estímulo para desencadenar la respuesta inmune y que será específica a él. Con la peculiaridad de que una exposición secundaria al mismo antígeno, montará respuestas más rápidas y eficaces (2).

A.1: BASES MOLECULARES DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA:

Las células responsables de la inmunidad son leucocitos conocidos como linfocitos. Estos se han dividido en linfocitos B que son productores de anticuerpos específicos que reaccionan con el antígeno que les dió origen, y los linfocitos T que involucran la generación de células especializadas que interactúan con el antígeno asociado al sistema principal de histocompatibilidad, con activación del linfocito que provoca la liberación de sustancias solubles que tienen diversos efectos biológicos.

Estos se definieron a partir de los experimentos de Chase y Landsteiner (3), quienes demostraron que algunos tipos de reacción inmune pueden transferirse de un animal a otro por medio de células vivas (inmunidad celular), mientras que otras podían transmitirse mediante suero sanguíneo (inmunidad humoral).

Tanto células como anticuerpos, llegan a la mayoría de los tejidos por el flujo sanguíneo, penetrando en ellos a través de las paredes de los capilares sanguíneos. Después de este desplazamiento vuelven por su propio sistema vascular, el sistema linfático. El árbol de los vasos linfáticos recoge linfocitos y anticuerpos, junto con otras células, moléculas y líquido intersticial que baña todos los tejidos del cuerpo, y vierte su contenido a la corriente sanguínea al unirse a las venas subclavas por detrás de la clavícula. Los linfocitos se encuentran en grandes concentraciones en los ganglios linfáticos, y en lugares donde se generan, la médula ósea, el timo y el bazo.

A.2: ORIGEN Y DIFERENCIACION DE LOS LINFOCITOS:

El desarrollo inmunológico en los mamíferos se origina en etapas tempranas durante la vida embrionaria; las células precursoras llamadas hematopoyéticas pluripotenciales migran del saco vitelino a través del bazo y del hígado a la médula ósea, donde se dividen y diversifican produciendo una variedad de células.

Las células linfoides sufren una diferenciación fuera de la médula ósea. Algunas se dirigen al timo donde es promovida su maduración y posteriormente son liberados como linfocitos T, con capacidad de responder al estímulo antigénico. Otras migran a la bursa de Fabricio (aves) ó su equivalente en mamíferos (médula ósea); son las llamadas células B que al contacto con el antígeno, maduran en células plasmáticas con la posterior liberación de anticuerpo (Fig. 1) (4).

A.3: RESPUESTA INMUNE CELULAR:

Está asociada a interacciones de tipo "célula blanco". Interviene en procesos de resistencia microbiana adquirida, sobre todo la asociada a parasitismo intracelular, en inmunidad de trasplantes y en rechazo de tumores. La inmunidad celular es relevante cuando el antígeno es intracelular o bien arquitectónicamente inaccesible, y en donde el anticuerpo parece ser relativamente ineficaz. La respuesta inmune celular está mediatizada fundamentalmente por las subpoblaciones de linfocitos T y macrófagos.

A.3.1: LINFOCITOS T:

Las células T representan una población uniforme capaz de una gran variedad de funciones inmunológicas, incluyendo activación o supresión de la respuesta inmune. Se postuló pri

maro que el tipo o modo de estimulación antigénica, determinaba cuál función de la célula T se expresaría. Otra hipótesis fue que las células T consistían de subpoblaciones especializadas, las cuales estaban equipadas para una función determinada.

A raíz de esto se originaron estudios selectivos de las células, donde se separaron poblaciones de células T periféricas mediante la identificación de glicoproteínas de superficie expresadas sobre algunas de las células provenientes del timo, utilizando anticuerpos específicos o investigando sus propiedades inmunológicas específicas en pruebas realizadas *in vivo* e *in vitro* (5). Así, se determinó que los linfocitos de ratón presentaban sobre su superficie el antígeno Thy, constando de dos alelos: Thy-1 y Thy-2 que son codificados por el gene localizado en el cromosoma 9.

Otro antígeno de superficie es el Lyt, del cual se han descrito tres antígenos de diferenciación Lyt-1, Lyt-2 y Lyt-3 que son controlados por dos regiones genéticas separadas. El antígeno Lyt-1 controlado por un locus presente en el cromosoma 19 y los antígenos Lyt-2 y Lyt-3 codificados por genes localizados en el cromosoma 6.

El estudio de la expresión de los antígenos Lyt permite identificar 3 clases de linfocitos:

- 1) Los que presentan el marcador Lyt-1, que exhiben función cooperadora y hipersensibilidad retardada.
- 2) Los que expresan el antígeno Lyt-2 con propiedades supresoras.

3) Los que tienen marcadores Lyt-1, Lyt-2 y Lyt-3 que se consideran como un grupo indiferenciado, donde se encuentran los precursores de las células Lyt-1 y Lyt-2 (6).

A.3.2: VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR:

La valoración de este tipo de inmunidad se lleva a cabo por las siguientes pruebas: Hipersensibilidad cutánea, - formación de rosetas, medición de subpoblaciones de linfocitos T, transformación blastoide, citotoxicidad espontánea, liberación de linfocinas y actividad celular fagocítica.

Algunas de las técnicas utilizadas para valorar la respuesta inmune celular en el presente estudio fueron, la obtención de células mononucleares por la técnica de B2-yum, donde se utiliza un gradiente de ficoll-hipsaque para aislar las células mononucleares (linfocitos y monocitos) de sangre periférica heparinizada. El método se basa en el gradiente de densidad que se forma durante la - centrifugación. La separación de las diferentes estirpes celulares se lleva a cabo cuando los eritrocitos atraviesan el gradiente junto con los polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y se depositan en el fondo del tubo. Por otra parte, las células mononucleares se mantienen en la interfase del gradiente por ser - menos densas y por tener una velocidad de sedimentación menor que la de los eritrocitos en ese medio. Las variables que participan en la sedimentación son el diámetro de la partícula, la fuerza gravitacional, la viscosidad

del líquido; todo este debe ser tomado en cuenta para obtener una separación con alta eficiencia (7).

Otro parámetro es la determinación de linfocitos T por formación de rosetas (CFR-E), en donde los linfocitos T se identifican por sus receptores para eritrocitos de cordero, propiedad que permite la cuantificación de esta población (8,9), mientras que las células B se identifican por sus inmunoglobulinas de superficie.

Esto ha permitido la separación y purificación de las dos poblaciones, lo que ha facilitado el mejor entendimiento de los requerimientos en la interacción de las células T y B, tanto in vivo como in vitro, así como la inducción de la proliferación de una estirpe en particular por medio de mitógenos (10, 11).

Los valores de linfocitos T en individuos normales determinados por el método de rosetas, son del $65.5 \pm 9.6\%$; (12) el porcentaje en estudios con mexicanos es de $54 \pm 2\%$ (54) significativamente menor al encontrado en la literatura norteamericana, este porcentaje disminuye cuando se almacena la sangre.

Hoy en día las subpoblaciones de linfocitos T pueden ser determinadas por anticuerpos monoclonales; estos fueron obtenidos cuando Milstein y colegas, fusionaron células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con determinado antígeno.

Las células del mieloma híbrido resultante o "híbrido", expresaban tanto la propiedad del linfocito de producir anticuerpos específicos como el carácter inmortal de las células mielomatosas.

Estas células híbridas pueden manipularse mediante las técnicas aplicables a los cultivos permanentes de células

lulas animales. Cada célula híbrida puede clonarse y cada clona produce grandes cantidades de un anticuerpo específico dirigidos contra uno solo de los determinantes antigénicos. A su vez, las clonas pueden conservarse indefinidamente y en cualquier momento pueden tomarse muestras de ellos para su cultivo o inyección en animales a fin de obtener anticuerpo monoclonal en gran escala (13,14) De esta manera se obtienen anticuerpos monoclonales dirigidos a los componentes antigénicos de la membrana de los linfocitos, lo que permite clasificarlos también funcionalmente. Son anticuerpos homogéneos y específicos de la misma clase, con idéntica afinidad para un determinante antigénico; no precipita (sólo empleando otro simultáneamente), y según la clase podría aglutinar o fijar complemento, en general con poca eficiencia; son muy sensibles a pH y temperatura. Se pueden obtener grandes cantidades (cientos de miligramos) del líquido ascítico de pocos animales, y se requiere un mínimo de 4 a 6 meses para generar un híbrido estable.

En cambio, en la respuesta inmune polyclonal se producen mezcla de anticuerpos de diferentes clases, con diferentes afinidades, para varios determinantes antigénicos, con títulos variables y con capacidad para precipitar, aglutinar o fijar complemento.

Otro recurso utilizado para la detección e identificación de marcadores de superficie de linfocitos es el uso de lectinas. Estas son proteínas que contienen carbohidratos -

(glicoproteínas), y que también provocan la aglutinación celular. Dichas sustancias se combinan no covalentemente con mono- y oligosacáridos, del mismo modo que el anti - cuerpo se une al antígeno; la unión puede involucrar uniones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y rara vez electrostáticas. Las lectinas son multivalentes con respecto a los sitios de unión del azúcar; también precipitan polisacáridos y glicoproteínas en solución.

Las lectinas como fitoheماغtulinina y concanavalina-A han sido de interés para los inmunólogos por sus propiedades mitogénicas, es decir, su habilidad para inducir blastogénesis y para estimular la proliferación de linfocitos.

Las lectinas son mitógenos policlonales; sin embargo no se ha esclarecido cual es el mecanismo por el cual ciertas lectinas disparan la proliferación de cierta clase de linfocitos, por ejemplo, la concanavalina-A estimula preferentemente células T pero no células B (15,16).

La concanavalina-A tiene un peso molecular de 108 000 daltons, es específica para azúcares y glucosos; y tiene cuatro sitios de combinación por molécula (17).

Los linfocitos pueden cultivarse varios días si se mantienen suspendidos en un medio de cultivo estéril, rico en nutrientes y determinada humedad y tensión de oxígeno.

Si a estos cultivos se les agregan diferentes concentraciones de un mitógeno como la concanavalina-A, la magnitud de la respuesta es dependiente de la concentración del mitógeno (18). La respuesta puede ser evaluada -

cualitativamente, por observación directa de las modificaciones morfológicas que sufren los linfocitos al dividirse, o cuantitativamente, evaluando la división celular - por medio de la incorporación de timidina marcada con tritio ($^3\text{H-TdR}$) (15).

La $^3\text{H-TdR}$ se adiciona 48 horas después del estímulo con la concanavalina-A a cada uno de los pozos de los cultivos de linfocitos; si se adiciona antes se puede obtener un fondo alto debido a la síntesis de DNA asincrónico que no guarda relación al mitógeno.

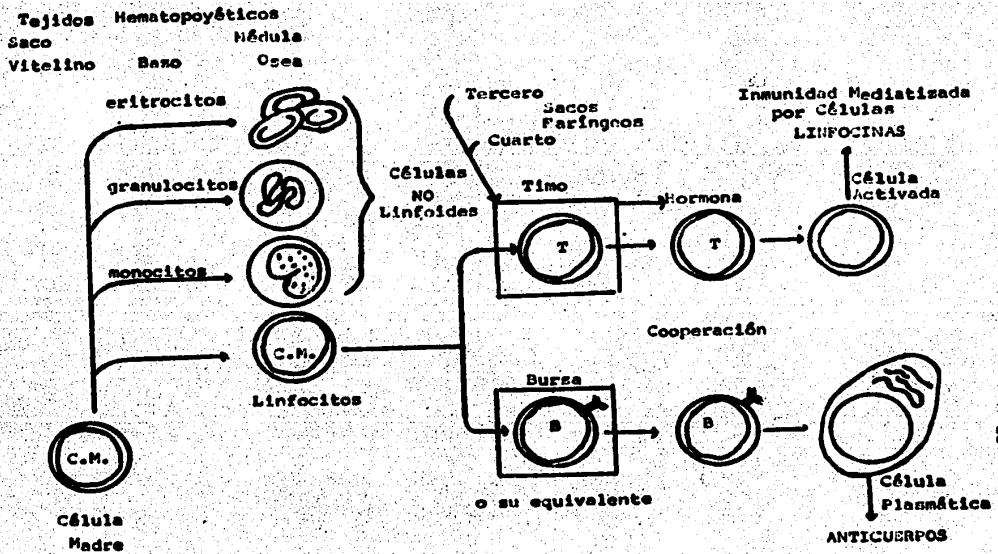


Fig. 1: DIFERENCIACION DE LOS LINFOCITOS.

B.1: CARACTERISTICAS GENERALES:

Es una enfermedad que actualmente se designa como "escleroma", término propuesto en 1932 en el Segundo Congreso Internacional de Otolología, Rinología y Laringología en Madrid, España, por considerarse el más apropiado ya que la enfermedad puede involucrar otras áreas del tracto respiratorio además de la nariz; sin embargo, la designación de rinoescleroma propuesta inicialmente por Von Hebra y Kaposi en 1870, posee méritos no solamente por el largo tiempo que se ha utilizado sino porque además el padecimiento generalmente se circunscribe a la nariz. El prefijo "rino", elimina confusión con otros desórdenes que llevan nombres similares como: escleroderma y esclerosis múltiple (30). El escleroma es una afección inflamatoria, de naturaleza granulomatosa crónica, poco contagiosa, relativamente benigna pero incapacitante, de evolución lenta y que se localiza en el revestimiento de la mucosa del tracto respiratorio superior.

Las características macroscópicas observadas inicialmente consisten de un engrosamiento de la mucosa y presencia de nódulos rojizos en la mucosa nasal con grados variables de obstrucción. Con frecuencia las lesiones son tan severas que destruyen la estructura nasal faríngea y traqueal, dando lugar a deformidades resultantes de la cicatrización.

A un nivel microscópico se observa atrofia y frecuente metaplasia escamosa de la mucosa nasal. El estroma muestra inflamación pleomórfica e infiltración de numerosas células plasmáticas maduras con un retículo endoplasmático bien desarrollado, abundante en cuerpos de Russell, indicando una producción local de inmunoglobulinas. También se presentan histiocitos grandes y vacuolados de 100 a 200 micras, con núcleos excéntricos y que contienen en su citoplasma K. rhinoscleromatia; se les conoce como células de Mikulicz en honor a su descubridor. La lesión muestra también escasos neutrófilos y fibroblastos. En las formas crónicas predomina un tejido denso fibroso (21).

B. 2: ETIOLOGIA:

En 1882, von Frish (22) aisló una bacteria de las lesiones nasales de un paciente con escleroma, a la que se le dio el nombre de bacilo de Frish; posteriormente Trevisan (23) en 1885, la denominó como Klebsiella rhinoscleromatia, asentando así la etiología bacteriana de la enfermedad. Este concepto para el escleroma es ahora generalmente aceptado, ya que es innegable el papel de la K. rhinoscleromatia en el desarrollo de la enfermedad. Además en 1961 Steffer y Smith (24) demuestran en ratones sibinos que cumple con los postulados de Koch.

Se ha demostrado la incidencia frecuente del microorganismo en el tejido afectado por inmunofluorescencia con anticuerpos espe-

eficaces contra K. rhinoscleromatia y por microscopía electrónica (25).

Se ha postulado la posibilidad de una etiología virus-bacteriana; sin embargo por microscopía no ha sido demostrada la presencia de partículas virales (26). Por otro lado, la microscopía de barrido ha revelado en las membranas de la mucosa la presencia de esporas e hifas de hongo asociados a K. rhinoscleromatia. (27).

8.3: KLEBSIELLA RHINOSCLEROMATIS:

Pertenece al orden Eubacteriales(IV), a la tribu Escherichieae (I), a la familia Enterobacteriaceae (IV), al género Klebsiella, y a la especie rhinoscleromatia.

Es un bacilo corto, gram negativo, grueso, de bordes paralelos y extremos redondeados, encapsulado, inmóvil y que puede aparecer aislado, en pares o formando cadenas cortas. Se le cultiva en medio de extracto de carne; no crece con amonio como fuente de nitrógeno ó con glucosa como fuente de carbono. Las colonias son elevadas, blancas, bordes enteros, opacas o brillantes, de consistencia viscosa, aunque depende en gran parte de la cepa y de la composición del medio. La temperatura y pH óptimo de crecimiento es de 35°C a 37°C y 7.2 respectivamente. La identificación de K. rhinoscleromatia, se basa en su morfología colonial y microscópica, así como en su comportamiento

to bioquímico sobre distintos sustratos y son:

<u>SUSTRATO</u>	<u>K. rhinoscleromatis</u>
Indol	-
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Citrato de Simmons	-
H ₂ S	-
Urea	-
Glucosa (gas)	-
Lactosa	+
Glicerol	-
Movilidad	-

Desde el punto de vista antigénico Kauffman en 1949 (28) clasificó a este género según sus antígenos O (somático) y K (capsular). La K. rhinoscleromatis. se clasifica como O2:K3; ningún otro organismo presenta este patrón.

Las cepas de Klebsiella son resistentes a las dosis generalmente usadas de penicilina, pero son sensibles a concentraciones elevadas. Además son sensibles a ampicilina, cefalosporina, estreptomina, cloramfenicol, tetraciclina, neomicina y kanamicina, (22,29).

B. 4: CUARRO CLINICO:

La enfermedad cursa generalmente por tres estadios, pero la secuencia no es rígida, ya que pueden demostrarse varias etapas al mismo tiempo, estas son:

I.- Etapa Atr6fica o Catarral:

El primer sintoma observado es un cambio en la mucosa nasal, semejante a una rinitis atr6fica, con formaci6n de costras; - la cavidad nasal se ve inundada con un exudado cremoso, la -- mayoria de las veces con obstrucci6n nasal bilateral aunque - puede ser unilateral. Se aprecian cambios en el epitelio cilia do columnar a tipo escamoso. Histol6gicamente se evidencia una invasi6n ligera de linfocitos plasmáticos, polimorfonucleares, c6lulas de Mikulicz y escasos corp6sculos de Russell; el bacilo se encuentra principalmente en las secreciones.

II.- Etapa Granulomatosa:

La infiltraci6n de la submucosa causa un aumento en la obstru - ci6n nasal que aparece como una inflamaci6n inespecifica; tam - bi6n hay aparici6n de n6dulos y gr6nulos aislados 6 confluentes de diversos tamaños de color rojizo, a menudo cubiertos por fog - neciones costrosas, con sangrado, que pueden extenderse a la - regi6n cutánea de la nariz, del labio superior, o invadir farin - ge, laringe, tr6quea y bronquios. Una biopsia en esta etapa - muestra una gran infiltraci6n del estroma con c6lulas plasmáticas, c6lulas de Mikulicz, corp6sculos de Russel, escasos neu - tr6filos, algunos fibroblastos y los capilares se ven dilata - dos.

III. Etapa Cicatricial:

Se caracteriza por la formaci6n de tejido fibroso de cicatriza - ci6n; los cambios en el tejido conectivo son lentos e irrever -

sibles, acompañándose de estenosis y endurecimiento del tejido afectado. La estenosis progresiva del sistema la ringotraqueal puede causar asfixia, recurriéndose en la mayoría de los casos a la traqueotomía. Si la laringe es afectada la voz cambia de una manera muy peculiar. También puede presentarse disfonía y disnea.

Microscópicamente se observa una tendencia a la desaparición de elementos linfoplasmahistiocitarios, con predominio de tejido conectivo fibrodensso. Los bacilos se encuentran en cantidad limitada o ausentes (20,30,31).

B.5: EPIDEMIOLOGIA:

El escleroma es una enfermedad con alta incidencia en países con clima tropical o templado. Es excepcional en la infancia, la mayoría de las veces se presenta en pacientes entre los 20 y 50 años, para decrecer después de esta edad. No se ha encontrado una asociación con el sexo. La casi totalidad de los casos reportados en todo el mundo corresponde a individuos de estrato económico inferior, por lo que la enfermedad se asocia con marcadas deficiencias en la alimentación y en la higiene (32).

Se ha establecido que la enfermedad proviene del centro de Europa (Bélinoff, 1932), de donde se ha extendido a todo el mundo. Es endémica en Europa Occidental, en el Norte y Centro de Africa, Sureste de Asia y Cercano

Oriente (33). En América es endémica en Guatemala, Salvador, Nicaragua, México, Venezuela y Colombia (32).

B.6: TRATAMIENTO:

Varias formas de terapia han sido ensayadas, entre ellas la radioterapia que en la mayoría de los casos inhibe temporalmente el proceso. El efecto de los antibióticos en estudios in vitro no guarda relación con lo que se observa in vivo. Así, diversos antibióticos inhiben in vitro el crecimiento del bacilo mientras que in vivo no son capaces de eliminarlo, quizá por la distribución intracelular del microorganismo. Otro recurso terapéutico es la extirpación quirúrgica completa, siendo contraproducente en la primera y segunda etapa de la enfermedad, por lo que se evita este procedimiento antes de la cicatrización. Estos tratamientos han reducido las severas deformidades mencionadas (34).

B.7: ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS:

Hasta la fecha pocos son los estudios realizados en esta área. Así, tenemos la reacción de fijación de complemento, utilizando un extracto de K. rhinoscleromatis (35,36) El valor significativo de esta prueba ha sido muy discutido por diversos autores.

Asimismo, se ha demostrado una reacción de precipitación entre los polisacáridos capsulares de K. rhinoscleromatis, y sueros de conejos inmunizados con la K. rhinoscleromatis o sueros de pacientes con escleroma (37).

Se ha utilizado también la prueba de hemaglutinación pasiva para determinar la presencia de anticuerpos en pacientes con escleroma; los eritrocitos se sensibilizaron con el polisacárido capsular. Los resultados mostraron títulos más elevados en los enfermos que en los sueros de individuos normales (38,39).

Por la técnica de inmunofluorescencia se ha podido demostrar la presencia de gamma globulina en la pared de la mucosa, en la pared celular de K. rhinoscleromatis y entre el citoplasma de las células de Mikulicz (40,41).

En el estado granulomatoso y atrófico del escleroma se ha demostrado una elevación de linfocitos B (42)

Se ha medido la actividad bactericida del suero de pacientes con escleroma; el ensayo se ha llevado a cabo, poniendo en contacto la K. rhinoscleromatis marcada con ^{14}C con el suero en estudio. Estas investigaciones han mostrado que estos sueros tienen una actividad bactericida igual que la de sueros controles. Es necesario considerar que el ambiente de la nasofaringe es diferente y que el estudio in vitro no refleja necesariamente las condiciones in situ (43).

El papel de la inmunidad celular en este padecimiento es aún desconocido. Se han realizado pruebas como la "ventana" de piel para rinoscleroma (modificación de la prueba de Roebuck, 1958), donde se usaron macerados de K. rhinoscleromatis del propio paciente y una cepa de laboratorio, se aplicaron en una escarificación de la piel, donde se midió el porcentaje de blastos en diferentes tiempos, del infiltrado celular en cada una de las "ventanas" problema, se encontró que la transformación blastoide tendía a ser menor que la obtenida en los sujetos control (44).

Un reporte similar al que aquí se presenta, pero realizado in situ, cuantifica las subclases de linfocitos T en cortes de tejidos de los granulomas de lepra lepromatosa, rinoscleroma, sarcoidosis y lepra tuberculoides. Los estudios demostraron tanto en la lepra lepromatosa como el rinoscleroma una distribución de células T cooperadoras y T supresoras entre los agregados histiocíticos. Por otra parte en la lepra tuberculoides y sarcoidosis, las células T supresoras se localizaban en la periferia del granuloma y las células T cooperadoras aparecían distribuidas entre los agregados de células epiteloides del granuloma (45).

En resumen, el rinoscleroma es una infección crónica intracelular donde existe una incapacidad para eliminar al agente etiológico, que puede ser debida a una alteración en la inmunidad mediada por células.

En este reporte se describe una alteración en la inmunidad mediada por células en pacientes con rinoscleroma. Tal anomalía se caracteriza por un aumento en la población de células supresoras y en una disminución a la respuesta de un mitógeno específico a linfocitos T.

II.- MATERIAL Y METODOS

A. POBLACION DE PACIENTES CON RINOESCLEROMA:

Se seleccionaron pacientes con rinoescleroma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Hospital Central Médico Militar.

La edad en que aparecen los signos y síntomas de la enfermedad y en la que generalmente se efectúa el diagnóstico, es la de adulto joven, tal como se confirma en este estudio, donde la gran mayoría presenta entre 19 y - 35 años. Los pacientes pertenecían a un estrato social bajo y medio, con predominio del primero, reafirmando lo dicho en el capítulo B. En todos ellos, excepto uno, se aisló K. rhinoscleromatis por cultivo que se confirmó por pruebas bioquímicas específicas. La biopsia, en algunos de los casos resultó compatible con rinoescleroma pero en otros sólo se encontraron datos de inflamación crónica, con cuerpos de Russell y células plasmáticas, seguramente debido a una producción importante de anticuerpos.

En general, el tratamiento más usado fueron los antibióticos, específicamente; tetraciclina y estreptomicina. Ningún paciente había sido tratado con inmunosupresores. Como se ha mencionado, el escleroma cursa por varias etapas, siendo el sujeto ideal para el estudio, aquel

que estuviera en la etapa granulomatosa florida; sin embargo, la mayor parte de ellos se encontraba en etapas de transición, ya sea de la catarral a la granulomatosa o de esta última a la cicatricial. También participaron pacientes cuya infección había supuestamente cadido y en los que se presentaron síntomas nuevamente.

En el cuadro 1 se encuentran resumidos, en forma general, los datos más importantes de los pacientes.

La población normal consistió en individuos clínicamente sanos.

Cuadro 1: DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES CON RINOSCLEROMA

Caso	Edad (años)	Evolución (años)	Datos nasales	Hallazgos Clínicos	Obstrucción Granulomatosa y/o Fibrosa	Asistencia de <u>Microbiología</u> <u>Patológica</u> <u>Oral</u>	Biopsia
1	19	8	+	Costras, disfonía, infiltrado de submucosa, inflamación	III	+	Compatible con rinoscleroma.
2	64	15	+	Disfonía, laringoscopia con hiperemia	II	+	Compatible con rinoscleroma.
3	18	3	+	Costras, mucosa granulosa.	I	-	Inflamación crónica/aguda, metaplasia epiteloidal.
4	30	3	+	Infiltrado de submucosa, mucosa granulosa, inflamación	II	+	Hiperplasia glandular, inflamación crónica.
5	24	5	+	Atrofia en cuerdas vocales, inflamación, mucosa granulosa	II	+	Metaplasia epiteloidal, inflamación crónica.
6	30	10	+	Costras en los cornetes.	III	+	Compatible con rinoscleroma, cuerpos de Russell/células plasmáticas.

Datos nasales: rinitis atrofica y congestión.
si desconocido.

CONTINUACION: Cuadro 1.

Caso	Edad (años)	Evolución (años)	Debos Nasales	Hallazgos Clínicos	Obstrucción Granulosa y/o Fibras	Aislamiento de Histoplasma capsulatum	Biopsia
7	30	4	+	Costras, disfonía, mucosa granulosa, infiltrado de submucosa, inflamación	II	+	Inflamación crónica/células plasmáticas.
8	35	- ^a	+	Inflamación, mucosa granulosa con lesiones	III	+	Compatible con rinoscleroma.
9	24	4	+	Atrofia discreta y submucosa despulimentada.	I	+	Inflamación crónica e inespecífica, compatible con rinoscleroma.
10	35	3	+	Costras, mucosa granulosa	III	+	Compatible con rinoscleroma
11	20	- ^a	+	Mucosa granulosa, inflamación, infiltración de submucosa	I	+	Inflamación crónica, metaplasia epidermoide.
12	32	4	+	Costras, infiltrado de submucosa, fibrosis	III	+	Inflamación crónica
13	27	12	+	Costras, infiltrado de submucosa	II	+	Compatible con rinoscleroma.

Obstrucción: I leve, II Moderada, III Severa y IV Completa.

B. OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES POR LA TECNICA DE BOYUM:

El método se realiza en condiciones de esterilidad de la siguiente manera:

- a. La sangre obtenida por punción venosa se separa en dos alícuotas de 5 ml y se les adiciona 3 ml de solución salina balanceada de Hank (SSBH) frío.
- b. Mezclar cuidadosamente la suspensión y mantenerla en baño de hielo. Adicionar a tubos estériles de 17 X 100 mm con tapón, 4 ml de ficoll-hipeque.
- c. Adicionar por las paredes del tubo 6 ml de sangre diluida, teniendo cuidado de mantener la interfase entre los dos líquidos, de tal manera de no romper el gradiente.
- d. Centrifugar 400 G durante 30 min, a temperatura ambiente; es necesario realizar una aceleración rápida para obtener una separación limpia.
- e. extraer con una pipeta Pasteur las células mononucleares localizadas en la interfase.
- f. Colocar las células en tubos estériles y lavar 2 a 3 veces con SSBH frío, centrifugando a 400 G por 10 min; se descarta el sobrenadante.
- g. Suspender las células sedimentadas en 1 ml de RPMI-1640 suplementando con 5% de suero fetal de ternera (SFT).
- h. Contar las células mononucleares en un hematómetro.
- i. Determinar viabilidad celular por medio de la incorporación del azul tripano (0.4%, Gibco).

C. DETERMINACION DE LINFOCITOS T POR FORMACION DE ROSETAS-E:

El método se realiza de la manera siguiente:

- a. Se ajustan las células mononucleares a 2×10^6 células por cada 0,25 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFT y colocarlas en tubos de 12 X 75 mm con tapón.
- b. Adicionar 0,25 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 10 2% en SSBH (v/v). Incubar 15 min a 37°C .
- c. Centrifugar a 200 G por 10 min. Incubar a 4°C durante 18 horas.
- d. Resuspender cuidadosamente el sedimento celular por movimientos giratorios.
- e. Contar las células que formen rosetas, en numerando aquellas que contengan 3 o más eritrocitos de carnero adheridos a su membrana; determinar también las células que no formen rosetas.
- f. Obtener el porcentaje de viabilidad con azul de tripano al 0.4% (Gibco).
- g. Determinar en hematímetro el número de rosetas-E y expresarlas por ml o en porcentaje (46).

D. DETERMINACION DE SUBCLASES DE LINFOCITOS T CON
ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales designados como OKT (Ortho Pharmaceutical Corp., N.J.) se obtuvieron contra determinantes antigénicos de la superficie del linfocito T periférico humano, y se usaron para clasificarlo en diferentes subclases, con lo cual posteriormente pudimos analizarlo funcionalmente.

Los anticuerpos monoclonales OKT se probaron sobre las poblaciones de células T por el método de inmunofluorescencia indirecta. En esta población el 55-60% reaccionó con un anticuerpo denominado OKT 4+, el cual no reconoció a otras células como las nulas o los macrófagos. Otra población fue la OKT 4- que contiene a la población citotóxica/supresora. Esto se logró separando las células OKT 4+ y OKT 4- por medio de un selector celular. Ambas poblaciones proliferan en presencia de Con-A, fitohemaglutinina y aloantígenos.

Los OKT 4+ responden con antígenos solubles y los OKT 4- son citotóxicos previa sensibilización con el antígeno. Esto sugirió que OKT 4+ es la población cooperadora y OKT 4- la citotóxica, designada posteriormente como OKT 8 (47;48). La tabla 1 muestra otras características de dichos anticuerpos monoclonales.

Con esta metodología se determina el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica.

Se ha encontrado que células OKT 4+ están en un porcentaje del $52.3 \pm 1.6\%$ en personas de alrededor de 30 a 70 años, observándose un descenso no significativo en ancianos.

Los niveles de OKT 8 en jóvenes son de $24.8 \pm 0.9\%$ disminuyendo durante la vejez a niveles significativos debajo del $19.8 \pm 1.6\%$ (49).

Anteriormente el análisis de antígenos de superficie de las células se hacía con autoanticuerpos espontáneos, o con heteroanticuerpos, pero esto tenía un valor relativo para la medicina clínica debido a la heterogeneidad de las preparaciones de anticuerpos (50).

El método se realiza de la siguiente manera:

- a. Las células monoclonales se ajustan a la densidad de 1×10^7 células por ml en un amortiguador de fosfatos salino (PBS), con 2% de SPT. Dos tubos rotulados uno problema y el otro control con el anticuerpo monoclonal que se desea estimar.
- b. Poner 100 microlitros de suspensión celular en cada tubo y baño de hielo. Poner 10 microlitros de PBS en el tubo control y 10 microlitros del anticuerpo monoclonal en estudio.

Tabla I: Características de los anticuerpos monoclonales utilizados para identificar a los diferentes linfocitos T.

ANTICUERPO MONOCLONAL	DISTRIBUCION CELULAR	SUBCLASE DE Ig	FIJA COMPLEMENTO
OKT 3	95% de linfocitos T periféricos. 20% de timocitos 30% de esplenocitos.	IgG 2a	si
OKT 4	65% de linfocitos T periféricos 75% de timocitos 15% de esplenocitos.	IgG 2b	si
OKT 6	70% de timocitos	IgG 1	no
OKT 8	35% de linfocitos T periféricos 80% de timocitos 15% de esplenocitos.	IgG 2	si
OKT 11	95% de células fagocitadoras de rosetas E. 95% de timocitos 10% de linfocitos de médula ósea.	IgG 2	si

- c. Mezclar suavemente e incubar la suspensión celular a $2^{\circ}-8^{\circ}\text{C}$ por 15 min a 30 min. Agitar una o dos veces durante este período.
- d. Lavar con 2 ml de PBS frío, centrifugando a 400 G con una temperatura de $2^{\circ}-8^{\circ}\text{C}$ por 5 min y descartar el sobrenadante.
- e. Resuspender el sedimento celular en 1 ml de PBS frío y mantener las muestras en baño de hielo. Se analizan en un portaobjetos, protegiendo con un cubreobjetos; se leen 100 células en el microscopio de fluorescencia tanto fluorescentes como no fluorescentes y se determina el porcentaje (51).

E. DETERMINACION DE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE POR ESTIMULACION CON CONCAVALINA-A.

- a. Ajustar las células mononucleares del enfermo y del control a 2.2×10^6 por ml.
- b. Colocar 2.2×10^5 células (0.1 ml) de cada uno, por duplicado en 16 pozos.
- c. Adicionar 0.1 ml de medio (RPMI-1640 suplementado con 5% de SFT) a los primeros 4 pozos de la serie.
- d. Adicionar a los siguientes 4 pozos 0.1 ml de una solución de Con-A que contenga $1 \mu\text{g/ml}$.
- e. Adicionar a los siguientes pozos de la serie 0.1 ml de una solución de Con-A que contienen $10 \mu\text{g/ml}$.
- f. Adicionar a los últimos pozos de la serie 0.1 ml de una solución de Con-A que contienen $100 \mu\text{g/ml}$.
- g. Así, el primer cuadruplicado de la serie sirve de blanco ó fondo y los siguientes, son dosis logarítmicas de Con-A.
- h. Incubar las placas de cultivo a 37°C , en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO_2 en aire.
- i. Después de 48 hr de cultivo se adiciona a todos los pozos $25 \mu\text{l}$ de una solución de timidina tritiada con una jeringa de insulina que contienen $1 \mu\text{Ci}$.
- j. Colectar en un papel filtro 18 hr después con un cosechador automático.
- k. Los filtros se secan durante 12 hr a 37°C y se colocan en viales para centelleografía.
- l. Se adicionan de 3 a 4 ml de líquido de centelleo por vial.

m. Los viales se dejan en reposo 45 min a 4°C en la oscuridad y se leen en un contador de centelleo para radiaciones beta.

n. Las lecturas del contador se expresan en cuentas por minuto (cpm), los que son usadas como medición de la proliferación linfocitaria.

III.- RESULTADOS

La determinación de células mononucleares en la sangre periférica de pacientes con escleroma no mostró diferencias con la obtenida en los individuos del grupo control (Tabla II). Asimismo, el estudio en estas células de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T por inmunofluorescencia usando los anticuerpos monoclonales OKT correspondientes, indicó que los valores de linfocitos T totales (LTt) y de cooperadores (LTc) fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, el número de linfocitos T supresores (LTs) fué significativamente más elevado en los enfermos con escleroma que los controles (Tabla III).

Los pacientes con escleroma presentan una relación LTc/LTs de 0.837 ± 0.0423 , es decir, presentan una mayor cantidad de LTs. Este valor es menor al obtenido en el grupo control de 1.4 ± 0.0732 , donde se observa una relación superior a 1.0 que indica un mayor número de LTc. A pesar de la gran variabilidad de los valores obtenidos en los grupos estudiados, se observa la tendencia de los LTt y LTc de individuos con escleroma a ser menor que los del grupo de individuos sanos. Por otra parte, los LTs se inclinan a ser más numerosos en los pacientes que en los controles (Fig. II).

Por lo que se refiere a la respuesta de los linfocitos de los grupos en estudio a la Con-A, se observó que la proliferación celular fue más elevada en los controles cuando se estimularon con 1 y 10^4 g/ml; sin embargo, fué menor cuan

de se adicionaron 100 g/ml del mitógeno. Las diferencias observadas en la incorporación de ^3H -TdR con cada una de las dosis ensayadas son significativas (Tabla IV, Fig. III y Fig. IV).

T A B L A # I I .

CUANTIFICACION DE CELULAS MONONUCLEARES EN SANGRE PERIFERICA.

GRUPO	No. EXAMINADO	células mononucleares/microlitro*
ENFERMOS	22	1399 ± 113
CONTROLES	16	1519 ± 126

***P : 0.05**

T A B L A # III.

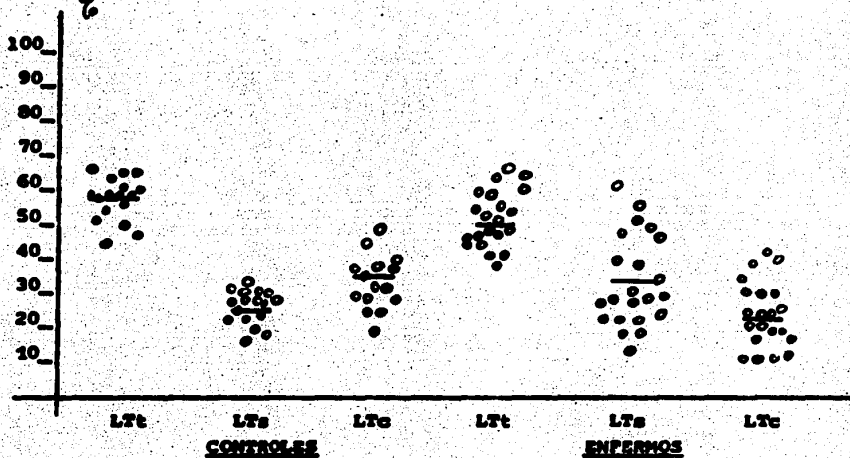
DETERMINACION DE LINFOCITOS T TOTALES (LTt), T COOPERADORES (LTc)
Y T SUPRESORES (LTs).

Linfocitos T estudiados	<u>Promedio porcentual + desviación tipo</u>		p **
	ESCLEROMA	CONTROLES	
LTt ROSETAS	52 ± 1.6	59 ± 1.59	0.05
LTs OKT 8	33 ± 2.69	22 ± 1.23	0.002
LTc OKT 4	27 ± 1.92	33 ± 1.75	0.05

** 52 y 53

FIGURA # 2.

**COMPARACION DE VALORES INDIVIDUALES DE LINFOCITOS Tt, LINFOCITOS Tc Y
LINFOCITOS Ts, TANTO DE PACIENTES CON RINOESCLEROMA
COMO DE CONTROLES.**



T A B L A # I V

VALORES PROMEDIO DE LA RESPUESTA DE LINPOCITOS A LA CONCAVALINA-A.

CONCENTRACION DE CON-A ENSAYADA (μ g/ml)	INCORPORACION DE $^3\text{H-TdR}$ (Promedio de cpm \pm desviación tipo)		P
	ESCLEROMA	NORMALES	
1	22,447 \pm 6,512	66,066 \pm 3,401	0.002
10	66,200 \pm 12,401	142,862 \pm 9,700	0.05
100	40,393 \pm 10,870	4,191 \pm 602	0.002

FIGURA 2.

**COMPARACION DE LOS VALORES INDIVIDUALES DE LA RESPUESTA LIMFOCITARIA
AL ESTIMULO MITOGENICO CON CONCAVALINA-A.
(cpm x 10⁻³)**

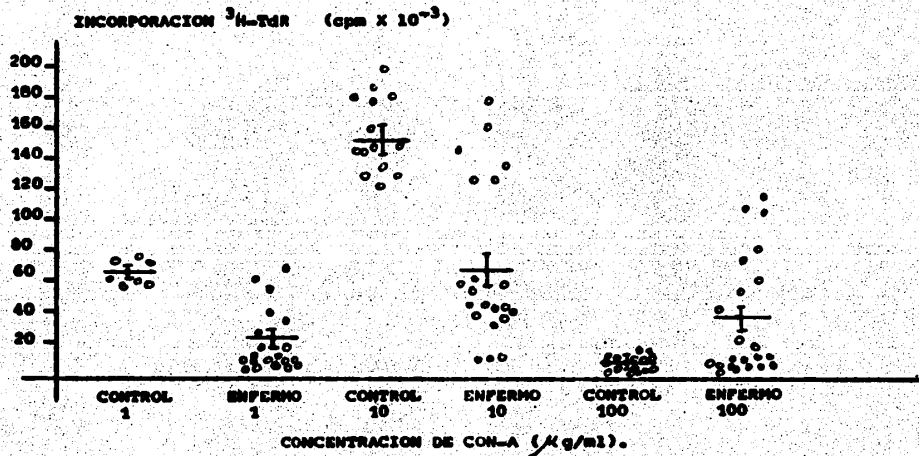
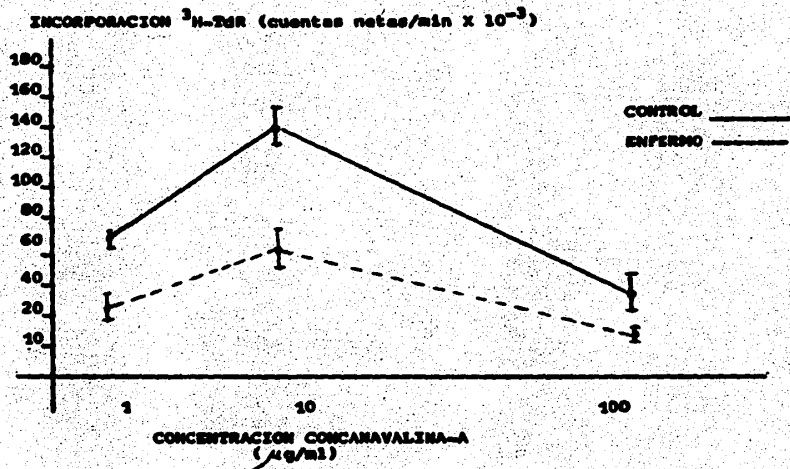


FIGURA 4 IV.

DOSIS-RESPUESTA DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON ESCLEROMA O INDIVIDUOS NORMALES A LA CONCAVALINA - A.



IV.- D I S C U S I O N .

Los resultados que aquí se informan indican que existe una alteración importante de los linfocitos T en pacientes con rinoscleroma. Los datos obtenidos no precisan el defecto íntimo que permite la sobrevivencia del germen intracelular. Sin embargo, la alteración significativa del aumento de linfocitos T supresores sugiere que esta función aumentada puede interferir con la activación de células mononucleares, lo que explicaría la persistencia de la infección crónica de la bacteria, pero no así la hipergamaglobulinemia casi constante que se ha demostrado en estos pacientes. Una posible explicación para esta alteración es que la K₂₃ rinosclerotica tuviera propiedades de activación policlonal, lo cual sería importante esclarecer.

En la misma forma el abatimiento y anomalía de la respuesta de los linfocitos T de los pacientes al estímulo mitogénico de Con-A, es indicativo de que el linfocito T efector tiene alterada su capacidad normal de responder a la Con-A. Estos resultados junto con el incremento de linfocitos T supresores sólo nos permite señalar la alteración en la inmunidad celular en estos sujetos con rinoscleroma. En trabajos semejantes realizados en otras infecciones por microorganismos intracelulares, se han reportado también alteraciones de la población de linfocitos T. Así, en un estudio efectuado en pacientes con lepra lepromatosa se encon-

traron alteraciones similares. El mayor conocimiento de los pacientes de lepra ha permitido su mejor clasificación clínica y mayor homogeneidad de resultados en este tipo de estudios; en cambio no se tiene el mismo conocimiento en el escleroma lo que pudiera explicar la heterogeneidad de los resultados obtenidos (54,55).

Los estudios inmunológicos hasta ahora realizados en pacientes con escleroma no explican la cronicidad de la infección intracelular. El reporte que aquí se presenta constituye el primero donde se pone de manifiesto una alteración en las subpoblaciones de linfocitos T, específicamente, un aumento en el número de linfocitos T supresores y además una alteración en la respuesta de las células linfoides de los enfermos con escleroma a un mitógeno de células T. Esta alteración pudiera ser importante en la explicación de la cronicidad.

Modlin y col. (45) encontraron que L_{Tc} y L_{Ts} se encontraban difusamente distribuidos entre los fagocitos mononucleares. La íntima repartición de estos linfocitos se asoció con la presencia de fagocitos mononucleares inmaduros y la proliferación bacteriana. Se ha sugerido que estas alteraciones pueden impedir la respuesta inmune, al prevenir posiblemente la maduración de histiocitos a células epiteloides bacteriolíticas.

Los resultados que aquí se presentan indican que pacientes con rinoscleroma presentan un mayor número de linfocitos T supresores y una baja respuesta a un mitógeno de células T, además apoyan la existencia de una deficiente inmunidad celular, lo que permite que el bacilo sobreviva y se disemine.

V.- A P E N D I C E

PREPARACION DE SOLUCIONES

1.- GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE:

Ficoll 400 (Pharmacia)

Hypaque al 50% P/V (Wintrop Laboratories).

Preparación:

24 partes de ficoll al 9%

10 parte de hypaque al 33.9%

La solución final con una densidad de 1.077 a 1.090, se esteriliza por filtración (membrana 0.45 micras) y se mantiene en obscuridad y a temperatura ambiente.

2. SOLUCION SALINA BALANCEADA DE HANK (10X).

Solución madre #1:

Dextrosa anhidra 10.0g

KH_2PO_4 anhidra 0.6g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9g

Rojo de fenol 0.1g

Disolver y llevar a 1000 ml con agua destilada y mantener la solución a 4°C.

Solución Madre #2:

CaCl_2 anhidro 1.4g

KCl anhidro 4.0g

NaCl anhidro 80.0g

$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g

MgSO_4 anhidro 1.0g

Disolver y llevar a 1000 ml con agua destilada y mantener la solución a 4°C.

Solución de trabajo:

Tomar 100 ml de la solución madre #1 y adicionarle 700 ml de agua destilada y mezclar; ahora añadir 100 ml de la solución madre # 2 y aforar a un litro; ajustarle el pH a 7.2-7.4, esterilizar por filtración y mantener a 4°C.

3. MEDIO DE CULTIVO RPMI-1640 SUPLEMENTEADO:

(Rosewell Park Memorial Institute) pH= 7.2-7.4

95.6 ml de RPMI-1650 (Gibco)

1.- ml de penicilina (10,000 UI)/estreptomocina (10,000 g).

1.0 ml de piruvato de sodio 100 mM

1.0 ml de aminoácidos no esenciales 100 mM.

0.1 ml de L glutamina (200 mM)

1.4 ml de NaHCO₃ al 7.5% para ajustar pH

El cultivo de células se completa adicionando 5% de SFT, se esteriliza por filtración y se mantiene en congelación.

4.- CONCAVALINA-A:

Se pesan 40 mg de con-A y se adicionan a 2 ml de NaCl (6.2M) estéril; la mezcla se deja reposar 18 hr a 4°C, se centrifuga a 16,000 rpm durante 60 min a 4°C, el sobrenadante, se separa en alícuotas y se mantiene en congelación. Se preparan soluciones madres de 200 µg/ml haciendo diluciones en RPMI-1640 sin SFT, hasta obtener las concentraciones finales de 1, 10 y 100 µg/ml.

5. TIMIDINA TRITIADA ($^3\text{H-TdR}$):

Metil timidina tritiada (New England Nuclear) con una actividad específica de 6.7 Ci/mM y una concentración de 1mCi/ml. Se hacen diluciones con RPMI-1640 sin SPT, hasta calcular una concentración final de 1 μCi /cultivo.

Teóricamente 1 μCi = 2.2×10^6 DPM.

6. LIQUIDO DE GENTILERO:

BPO(2,5 difenil oxazol) 4.0g

POPOP(p,bis(2-(5-fenil oxazol))benceno 0.4g

La solución se mantiene a 4°C en la oscuridad.

7. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO (PBS, 10X).

NaCl	4.0g
KCl	0.1g
KH_2PO_4	0.1g
Na_2HPO_4	1.08g
pH	7.2-7.4

Disolver y llevar a 50 ml con agua destilada; almacenar a 2° - 8°C; diluir 1:10 para obtener la solución de trabajo.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pérez T.R., Larralde, C. y Kretschmer, R.: *Inmunopatología*. La Prensa Médica Mexicana, (1966).
- 2.- Alberts, B., Bray, D., y Lewis, J.: *Molecular Biology of the Cell. The Immune System*, (1984).
- 3.- Jerne, K.: El sistema inmunitario. *Scientific American. Inmunología*. Ed. Labor, S.A. (1983).
- 4.- Cooper, D.M.: El desarrollo del sistema inmunitario. *Scientific American, Inmunología*. Ed Labor, S.A. (1974).
- 5.- Cantor, H., Weissman, I.: Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes. *Prog. Allergy*, 20:1, 1976.
- 6.- Cantor, H.: T lymphocytes. En *Fundamental Immunology* (W.S. Paul, ed) Raven Press, New York, 1984. pp.57
- 7.- Ebyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Invest.* 21:77, 1968
- 8.- Moretta, L. y Ferrarini, M.: Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. *J. Immunol* 117:2171, 1976
- 9.- Nowacznyk, M.: Fractionation of human T lymphocytes on the basis of their high, medium and low SRBC-rosette-forming affinity: Efficiency of the method. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 26:393, 1978
- 10.- Dean, J. y Silva, J.: Funcional activities of rosette separated human peripheral blood leukocytes. *J. Immunol.* 115:1449, 1975
- 11.- West, W.H. y Pyne, S.M.: Human T lymphocyte subpopulations: Correlation between E-rosette-forming affinity and expression of Fc receptor. *J. Immunol.* 119: 548, 1977
- 12.- Hofman, P.M.: Stability of T- and B-cell numbers in human peripheral blood. *Am. J. Clin. Pathol.* 77:710, 1982
- 13.- Goshert, P.J.: Generation of immunoglobulin variable gene diversity. *Immunol. Today* 114:107, 1982
- 14.- Milstein, C.: Anticuerpos monoclonales. *Scientific American. Inmunología*. Ed Labor, S.A. (1980).
- 15.- Sharon, N.: Cell surface receptors for lectins: mar_

- kers of murine and human lymphocyte subpopulations. In Progress in Immunology IV (M. Fangerau y J. Doussat, ed). Academic Press, London, 1980. pp. 254-278.
- 16.- Dwyer and Johnson: The use of con-A study the immunoregulation of human T cells. Clin. Exp. Immunol. 46: ,1981
- 17.- Oppenheim, J.J. y Rosenstreich, D.L.: Mitogens in Immunology. Academic Press. N.Y., 1976, 1976.
- 18.- Foad, B.S. y Adams, C.E.: Phytoantigen responses of peripheral blood lymphocytes in young and older subjects. Clin Exp. Immunol. 17: , 1974.
- 19.- Kay, N.E. y Johnson, J.: Effects of human-T-cell subpopulations on B-cell proliferation as determined by (³H)-thymidine incorporation. Diagnostic Immunology 2:11,1983
- 20.- Stiernberg, C.M. y Clark, W.D.: Rhinoscleroma, a diagnostic challenge. Laryngoscope 93:866,1983
- 21.- Marquis-Monter, H.: Pathology and pathogenesis of respiratory scleroma. Patologia 12:171,1973
- 22.- Carbone, J.: Estudios microbiológicos en Klebsiella rhinoscleromatis. Rev. Latinoam. Microbiol. 4:191,1961
- 23.- The bacteriology of Enterobacteriaceae. Kauffman, P. (1965)
- 24.- Steffen, J. y Smith, I.M.: Scleroma, Klebsiella rhinoscleromatis and its effect on mice. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 70:935,1961
- 25.- Lam, G.S.: In vivo and vitro studies of rhinoscleroma. Laryngol. Otol. 40:69,1971
- 26.- Tualat, M., Soliman, A. y Gaafar, H.: Experimental scleroma: A histopathological study. J. Laryngol. Otol. 11:481,1978
- 27.- Gaafar, H. y Harada, Y.: Transmission and scanning electron microscopic studies of rhinoscleroma. Laryngol. Otol. 93:983,1979.
- 28.- Kauffman, P.: On the serology of the Klebsiella group. Acta Path. Microbiol. Scand. 26:381,1949
- 29.- García, G.M.: Diagnostic serológica del rhinoscleroma.

Tesis Escuela de Ciencias Biológicas, I.N.P., 1971.

30.- Szeali, K.C.: The management of rhinoscleroma.

J. Laryngol. Otol. 89:91, 1975

31.- Kakar, P.K. y Sood, V.P.: Scleroma. Rev. Laryngol. 93:552, 1972.

32.- Meyer, R.P. y Shumm, T.K.: Scleroma (Rhinoscleroma); A histologic immunohistochemical study with bacteriologic correlates. Arch. Pathol. Lab. Med. 107:377, 1983

33.- Liomba, M.G. y Hutt, S.B.: Rhinoscleroma in Malawi and Eastern Africa. J. Trop. Med. Hyg. 83:187, 1980

34.- Shner, M. y Risk, I.: Local acriflavine: A new therapy for rhinoscleroma. J. Laryngol. Otol. 95:701, 1981

35.- Topposada, H.: The complement fixation test in rhinoscleroma. J. Laryngol. Otol. 97: 55, 1983

36.- Geisman, M. y Kerdel-Vegas, F.: Rhinoscleroma. Springfield III, Charles C. Thomas, Publishers, 1963.

37.- Rojas-Rojas, O. y Estrada-Parra, S.: Immunochemistry of the capsular polysaccharide of *K. rhinoscleromatis*. Rev. Latinoam. Microbiol. Parasitol. 10:7, 1968

38.- Godoy, A.: Hemaglutinación con polisacárido capsular de *K. rhinoscleromatis*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol. 8:117, 1966

39.- Rojas, O., García, M., Barrón, B. y Estrada-Parra: Algunos hallazgos serológicos en pacientes con rhinoscleroma. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 12:59, 1971

40.- Hoffman, E., Correa, P. y Luján, B.: Inmunofluorescencia en el rhinoscleroma. Rev. Lat. Anat. Pat. 7:67, 1963

41.- Hoffman, E. y Loese, L.D.: The Mikulicz cell in rhinoscleroma. Light, fluorescent and electron microscopic studies. Am. J. Path. 73:47, 1973

42.- Sasura, A.S., Tarak, M.K. y Hafiz, M.: Bacteriological and immunological aspects of rhinoscleroma. Armed Forces Med. J. 24:61, 1982

43.- North, M.S. y Newton, D.J.: Bacteriocidal activity of serum for *K. rhinoscleromatis*: Studies on serum from a patient with rhinoscleroma and sera deficient in antibody and complement. J. Med. Microbiol. 15:267, 1982

- 44.-Topposada, H. y Eisey, M.: The skin window test in rhinoscleroma contacts. *J. Laryngol. Otol.* 98:475,1984
- 45.- Modlin, R.L., Hofman, P.M. y Meyer, P.R.: *In situ* demonstration of T lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: Leprosy, rhinoscleroma y sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.* 51:430,1983
- 46.- Bradley, M.L.: Selected Methods in Cellular Immunology. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
- 47.- Kung, P.C. y Goldstein, G: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 205:347,1979
- 48.- Nagel, J.E. y Chest, F.J.: Enumeration of T lymphocyte subsets of human T cells by monoclonal antibodies in young and aged humans. *J. Immunol.* 127:2086,1981
- 49.- Reinherz, E.L. y Kung, P.C.: Separation of functional subsets of human T cell by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4061,1979.
- 50.- Levy, R. y Miller, R.A.: Biological and clinical implications of lymphocyte hybridomas. *Am. Rev. Med.* 14:107,1983
- 51.- Monoclonal Antibodies. En manual de Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan, New Jersey U.S.A. Revised April 1984.
- Lehman, E.L.: Testing Statistical Hypothesis. Wiley, New York, 1959.
- 53.- Dixon, W.J.: Introduction to Statistical Analysis. Mac Graw-Hill, New York, 1969.
- 54.- Castellanos, C.B., Isles, R.A. y Ortiz-Ortiz L: Lepromatous leprosy: Studies of some subpopulations of lymphocytes and its functional analysis. *Arch. Invest. Med.* 16:217,1985
- 55.- Bloom, B.R. y Mehra, U.: Immunological unresponsiveness in adults. *Immunol. Rev.* 80:5,1984