

34
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ZARAGOZA”

**EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE
CELULAR Y HUMORAL EN PACIENTES CON
POLICITEMIA SECUNDARIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

ANTONIA GUILLERMINA ROJAS FERNANDEZ

FAUSTO BRITO ARIAS

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	1
II.	FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA	9
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
IV.	OBJETIVOS	11
V.	HIPOTESIS DE TRABAJO	12
VI.	MATERIAL Y METODOS	13
VII.	RESULTADOS	26
VIII.	DISCUSION DE RESULTADOS	55
IX.	CONCLUSIONES	56
X.	BIBLIOGRAFIA	57

I. INTRODUCCION

La policitemia. Un aumento del número de glóbulos rojos por encima de los valores normales puede ser relativo o absoluto. Si está disminuido el volumen del líquido en el cual se hallan suspendidos los glóbulos rojos, se produce aumento de su concentración. Este aumento se refleja en el recuento de glóbulos rojos y en el valor hematócrito. La masa total de glóbulos rojos no se modifica. Existe tal situación de policitemia relativa siempre que el volumen plasmático disminuye sin reducción concomitante de la masa de glóbulos rojos. Esta policitemia relativa aguda casi siempre se acompaña de desplazamiento o pérdida de agua corporal: en tales circunstancias el número de glóbulos rojos y la determinación del hematócrito son muy útiles para descubrir y valorar tales cambios. La policitemia relativa crónica (eritrocitosis) se cree que es secundaria a un volumen plasmático normalmente bajo. No conocemos los factores que producen el volumen plasmático bajo. En este tipo de pacientes no se presentan leucocitosis, trombocitosis ni esplenomegalia. En diversos pacientes de tipo ansioso y tenso, el trastorno se ha calificado como policitemia de alarma (stress polycytemia) (25, 27).

Un aumento absoluto de la masa de glóbulos rojos puede observarse como respuesta fisiológica a la anoxia tisular, o en el estado patológico conocido con el nombre de policitemia vera. En el primer caso, la policitemia es secundaria a una causa desencadenante reconocida; en el segundo caso, se califica de "primaria" ya que no se ha logrado identificar ninguna causa desencadenante (2, 36).

Puede producirse un aumento notable de la masa total de glóbulos rojos en cualquier situación que origine hipoxia de los tejidos. La privación de oxígeno es causa de aumento en la concentración de eritropoyetina, substancia humoral que se considera el elemento fundamental de la regulación de la eritropoyesis (12, 17, 18, 33). La eritropoyetina parece mediar la respuesta de la médula ósea a la hipoxia aumentando el número de células madres pluripotenciales que se transfor-

man en eritroblastos, e incrementando el ritmo con el cual desarrollan su complemento total de hemoglobina (1, 16, 23, 31).

Se produce policitemia en algunos procesos pulmonares crónicos, donde parece ser respuesta fisiológica a la disminución de la saturación arterial de oxígeno. Las anomalías pulmonares que más frecuentemente originan anoxemia son las siguientes:

- 1) Perfusion de alveolos poco o nada aireados.
- 2) Alteraciones de la membrana alveolar que dificulta el recambio gaseoso.
- 3) Fístulas arteriovenosas pulmonares directas.

El resultado final de cada una de estas alteraciones es una disminución de la saturación arterial de oxígeno (36). En el primer caso, la sangre pasa por segmentos poco o nada aireados, y no queda suficientemente expuesta al oxígeno. En el segundo caso los segmentos pulmonares están bien aireados pero las membranas alveolares se han alterado al punto que dificultan el recambio de gases entre alveolos y capilares. Las fístulas pulmonares arteriovenosas causan anoxia porque la sangre se desvía y no pasa por vasos donde tiene lugar el recambio gaseoso (6).

La correlación entre la insaturación arterial de oxígeno y la policitemia es particularmente evidente en la enfermedad pulmonar crónica. En tales pacientes un número de factores puede afectar el intercambio de oxígeno: la saturación de oxígeno en 24 horas, modificación en el equilibrio ácido-básico que altera la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, complicación de infecciones y deficiencia de hierro (21). Las causas desencadenantes o agravantes de la insuficiencia respiratoria y sus mecanismos fisiopatológicos son entre otras cosas resfriados y rerudescencias del proceso bronquítico, gripes e infecciones intercurrentes que provocan un empeoramiento transitorio de las condiciones ventilatorias del paciente, lo suficiente para hacerle entrar en la insuficiencia respiratoria o acentuándola si ya vivía con cierto grado de hipoxemia (13).

La respuesta inmune. La observación de que algunas enfermedades infecciosas difícilmente se repetían en el mismo individuo, condujo a la búsqueda de los factores y mecanismos que se hallaban involucrados en dicho fenómeno. Actualmente se sabe que es el resultado de la respuesta inmune inducida por el primer contacto con el agente infeccioso y que es llevada a cabo por proteínas plasmáticas llamadas anticuerpos (respuesta inmune humoral) y por células especializadas conocidas como linfocitos sensibilizados (respuesta inmune celular).

La respuesta inmune tiene cuatro características, que la diferencian de cualquier otro fenómeno biológico. En primer término, la respuesta es inducible debido a que sólo se presenta cuando una sustancia inductora, llamada antígeno, penetra en el organismo. En segundo lugar, la respuesta es específica y un sujeto inmunizado con un antígeno dado no presenta inmunidad para otro antígeno diferente. La tercera característica es la memoria que se refiere al hecho de que el segundo contacto con un determinado antígeno da por resultado una respuesta más rápida y vigorosa (respuesta secundaria) que en la primera ocasión (respuesta primaria). Finalmente la respuesta inmune puede ser transferible de un sujeto inmune a otro que no lo es, ya sea por medio de suero que contenga anticuerpos o de linfocitos sensibilizados.

Inducción de la respuesta inmune. El establecimiento de la respuesta inmune requiere de la interacción de varios tipos celulares que colaboren entre sí. Todo parece indicar que para inicio de la respuesta, es necesaria alguna modificación en la estructura o presentación del antígeno, efectuada por los macrófagos. Posteriormente intervienen los linfocitos, de los cuales se conocen dos variedades, conocidas como T y B. Los linfocitos T o timo dependientes requieren de la presencia de dicho órgano linfóide para adquirir la aptitud de responder a ciertos antígenos, dar origen a los linfocitos sensibilizados y cooperar con los B. Los linfocitos B se diferencian como tales en la bolsa de Fabricio de las aves o en algún órgano linfóide en los mamíferos, muy pro

bablemente la médula ósea.

Ambos tipos de linfocitos colonizan los órganos linfoides periféricos: ganglios linfáticos, bazo, amígdalas, apéndice, placas de Peyer, etc. distribuyéndose, no al azar, sino en áreas particulares. Además estos linfocitos están constantemente recirculando lo cual provoca tanto su contacto con los antígenos como sus interacciones.

Los linfocitos reaccionan con los antígenos por medio de receptores presentes en su membrana que son específicos para cada antígeno. En el caso de los linfocitos B los receptores son inmunoglobulinas y en el caso de los linfocitos T no se conoce bien su estructura química. Para la respuesta inmune celular parece que sólo intervienen los macrófagos y los linfocitos T, en tanto que para la respuesta inmune humoral con la mayoría de los antígenos se requiere la participación de los macrófagos, una subpoblación de linfocitos T y los linfocitos B (cooperación).

Tanto en la respuesta celular como en la humoral, los linfocitos que han entrado en contacto con los antígenos, sufren modificaciones en su metabolismo y tienen alteraciones morfológicas tales que culminan en una división celular acelerada asimétrica, la cual resulta en la formación de células terminales (linfocitos sensibilizados y células plasmáticas) y células de memoria (linfocitos T de memoria y linfocitos B de memoria).

La respuesta inmune se autorregula a través de diversos mecanismos, siendo el más importante el efectuado por una subpoblación de linfocitos T conocida como T supresora, (38).

Fagocitosis. En 1884 Metchnikoff observó que los leucocitos de conejo y de humano ingerían, matan y digieren diversas bacterias. A este fenómeno, lo denominó fagocitosis, proceso que se incrementa en los animales que están recuperándose de alguna infección o después de ser vacunados con una preparación de estos microorganismos. Posteriormente se demostró la existencia de dos tipos de leucocitos circulantes capaces -----

de fagocitar: los polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos y se propuso el término general de fagocitos para denominar estas células.

La fagocitosis que realizan los polimorfonucleares, se desarrolla en cinco fases interrelacionadas: quimiotaxis, opsonización, ingestión, desgranulación y destrucción (38).

La fagocitosis es un proceso activo que requiere consumo de energía, la cual obtiene el leucocito a través de la glucólisis anaeróbica (35, 22). La secuencia de las reacciones enzimáticas, parte de la glucólisis, la cual provee de NAD, NADH, y este compuesto se combina con el oxígeno, por medio de una enzima, la NADH-oxidasa para formar H_2O_2 (7). El compuesto H_2O_2 junto con la mieloperoxidasa y un halógeno, desempeña una función muy importante en la muerte y digestión de las bacterias (7).

Existen diferentes pruebas de laboratorio para evaluar la función fagocitaria. Todas estas pruebas pretenden, en su conjunto, evaluar las cinco etapas del proceso de la fagocitosis, entre las más utilizadas se encuentran: la fagocitosis de levaduras, la reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT) y la medición de la capacidad de adherencia de los PMN (38).

Linfocitos T y B. Los linfocitos son las células centrales del aparato inmunocompetente. En la etapa embrionaria se originan en saco vitelino, hígado y bazo y más adelante solamente en médula ósea, sitios de donde migran y colonizan otros órganos. Los que llegan al timo, se diferencian funcionalmente en una población llamada linfocitos T capaces de llevar a cabo ciertas funciones inmunológicas genéricamente conocidas como inmunidad celular. Existe otra población que para su diferenciación no requiere del timo, en las aves esta se lleva a cabo en la bolsa de Fabricio, órgano que no existe en los mamíferos y cuyo equivalente funcional aún está por identificarse aunque se sospecha que sea la misma médula ósea. A estos últimos linfocitos se les llama linfocitos B y son los precursores de las células formadoras de anticuerpos media-

dores de la inmunidad humoral. Ambas poblaciones de linfocitos colonizan a los llamados órganos linfoides periféricos (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas, apéndice y tejido linfoide de las submucosas) donde ocupan áreas definidas. Tanto los linfocitos T como los B no permanecen indefinidamente encerrados dentro de estos órganos, sino que pueden recircular utilizando tanto el torrente linfático como al sanguíneo.

Morfológicamente los linfocitos T y los linfocitos B son indistinguibles entre sí, sin embargo en su membrana celular poseen diferentes moléculas, algunas de las cuales son exclusivas de una u otra población (marcadores). Esto ha permitido diseñar métodos que permiten distinguir y enumerar a ambas poblaciones. Así, todos los linfocitos T poseen un receptor para alguna sustancia presente en el membrana de los eritrocitos de carnero, de modo que si estos últimos se agregan a una población purificada de linfocitos, solamente los que sean T quedarán cubiertos por los glóbulos rojos dando el aspecto de una roseta que en este caso se conoce como roseta E o roseta directa. Los linfocitos B también pueden formar rosetas siempre y cuando los glóbulos rojos estén recubiertos con anticuerpo y el fragmento C_{3b} (rosetas EAC o rosetas indirectas). Otra forma muy empleada para contar linfocitos B es con anti-Ig fluoresceinada que se combina con las inmunoglobulinas de superficie de estas células, (38).

Factor inhibidor de la Migración (MIF). Se ha demostrado -- que los linfocitos humanos producen el factor inhibidor de la migración (MIF). La producción de MIF inducido por la presencia de un antígeno -- está íntimamente asociada con la presencia de hipersensibilidad celular in vivo del huésped para el antígeno en cuestión. El MIF no se encuentra en el líquido del cultivo de linfocitos cultivados en ausencia del antígeno o en presencia de un antígeno para el cual el donador no es sensible, (15).

La producción de mediadores solubles por los linfocitos de individuos normales se correlaciona, por lo general, positivamente con el

estado de la inmunidad celular *in vivo* de la persona donadora. Los linfocitos provenientes de algunos enfermos con inmunidad celular deprimida, no producirán estos mediadores como respuesta a la estimulación por antígenos, (15).

Proteínas. Las proteínas de los mamíferos pueden ser clasificadas como : proteínas histicas y en proteínas hemáticas. A su vez, las proteínas hemáticas, pueden separarse en hemoglobina, proteínas de los glóbulos rojos y del plasma.

No sólo pueden estudiarse convenientemente las proteínas -- plasmáticas, sino que ocupan una posición central en el metabolismo proteico; interaccionan virtualmente con todos los tejidos o células del organismo y están íntimamente relacionadas con el metabolismo proteico del hígado.

Las proteínas plasmáticas tienen diversas funciones importantes, entre estas están las funciones de transporte; el mantenimiento -- del equilibrio osmótico (albúmina); la defensa contra las infecciones -- (inmunoglobulinas y complemento); la hemostasia (los factores de la coagulación); la contribución a las necesidades de nitrógeno y la regulación de la actividad y función celular. Como la albúmina y globulina-gamma se sintetizan a velocidades inferiores que las globulinas alfa y beta, estas fracciones no sufren el recambio a la misma velocidad. La albúmina tiene una vida media de aproximadamente 4 semanas y las globulinas gamma alrededor de 1-2 semanas. Se ha estimado que un hombre hipotético de 70 Kg. fabrica y descompone aproximadamente de 15-20 gramos de proteína plasmática al día.

Existen varios métodos para la determinación de proteínas -- plasmáticas, entre los que se encuentran el método de biuret, reacción de la ninhidrina, método del fenol, métodos nefelométricos y electroforesis. En la electroforesis, si la separación se lleva a cabo sobre un soporte se le denomina electroforesis de zona. En este caso los componentes de la mezcla quedan separados entre sí y para identificarlos hay

que teñirlos con algún colorante específico. La cuantificación de cada componente, puede realizarse midiendo densitométricamente la cantidad de colorante que se ha fijado a cada fracción la cual es directamente proporcional a su concentración.

Cuando el suero humano se somete a electroforesis de zona se separan cuatro fracciones denominadas albúmina y globulinas alfa, beta y gamma.

La importancia de la electroforesis del suero es que ayuda a identificar enfermedades que se acompañan de alteraciones en una o más de las proteínas séricas, por ejemplo: el mieloma múltiple y la agammaglobulinemia.

II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Diariamente, los bancos de sangre de las instituciones del Sector Salud son visitados por muchos pacientes con policitemia, la cual generalmente es secundaria a una cardiopatía o a una insuficiencia respiratoria.

La insuficiencia respiratoria, como una complicación de procesos infecciosos, es en la actualidad, una causa frecuente de policitemia secundaria.

La sangre venosa constituye una forma de tratamiento de la policitemia. Es un medio para reducir rápidamente el volumen de sangre y muchas veces brinda rápido alivio sintomático. Estas sangras, que generalmente van de 500-600 ml, dependen de la edad y peso del paciente así como de la evolución de la enfermedad del mismo. A la sangre de esta manera obtenida, no se le da ninguna utilidad en las instituciones del Sector Salud, siendo desechada por completo.

Actualmente no se han realizado estudios acerca de la inmunidad celular y humoral de estos enfermos, por lo que, si mediante este trabajo, encontramos que ésta es normal, esta sangre podría utilizarse para la obtención de preparados leucocitarios, los cuales pueden ser útiles en el tratamiento de pacientes con granulocitopenias, inmunodeficiencias, etc., evitando, de esta forma, que este tejido, insustituible hasta ahora, sea desechado.

Esta sangre también podría ser empleada en la obtención de reactivos biológicos, contribuyendo, de esta forma, a la obtención de los mismos a un menor costo, lo que reportaría un beneficio económico.

Finalmente, cabe la posibilidad de que a estos pacientes se les pudiese reincorporar plasma, para evitar que al ser sangrados se les prive de elementos con una lenta velocidad de recambio (por ejemplo proteínas).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A los enfermos de policitemia secundaria como parte de su tratamiento se les practican sangrias, las cuales en ocasiones llegan a ser muy frecuentes, como consecuencia de estas se les extraen elementos celulares y plasmáticos que no le son reintegrados, lo que podría traer como consecuencia una respuesta inmune deficiente o disminuida debido a la disminución de células y proteínas plasmáticas inmunocomprometidas que intervienen directamente en la respuesta inmune celular y humoral. Por lo que de manera general se puede plantear que los enfermos con politemia secundaria que han sido sometidos a este tipo de tratamiento pudieran tener una respuesta inmune celular y humoral disminuida.

IV. OBJETIVOS

- 1).- *Determinación de la capacidad fagocítica.*
- 2).- *Determinación de la capacidad de las células para elaborar linfocinas como respuesta a antígenos comunes.*
- 3).- *Cuantificación de linfocitos T y linfocitos B.*
- 4).- *Cuantificación de proteínas séricas totales.*
- 5).- *Cuantificación de las fracciones proteicas séricas.*
- 6).- *Determinación de la citometría hemática.*

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si consideramos que al realizar flebotomías a pacientes con policitemia secundaria, también se les están extrayendo anticuerpos y células inmunocompetentes que no les son reincorporadas, esperamos entonces, encontrar deprimida la respuesta inmune celular y humoral en ellos, debido a que la presencia de dichos elementos se correlaciona positivamente con el estado de la inmunidad.

VI. MATERIAL Y METODOS

Material biológico

- Grupo* de pacientes de ambos sexos, con policitemia secundaria.
- Grupo* control integrado por adultos de ambos sexos.

Ambos grupos fueron seleccionados en el Banco de Sangre del Hospital General de Zona No. 25 del I.M.S.S..

A los pacientes de los grupos antes citados se les realizaron sangrías entre las 7:00 y 8:00 horas, de la región del pliegue del codo.- La sangre colectada se distribuyó de la siguiente manera:

a) 5 ml en un tubo de 13 x 100 mm sin anticoagulante, para la determinación de proteínas totales por refractometría y sus fracciones séricas por electroforesis.

b) 45 ml repartidos en 8 tubos de 12 x 75 mm (tubos de plástico para cultivo de células) con heparina para la determinación de rose-tas T y B, MIF y reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT).

c) 5 ml en un tubo de 12 x 75 mm con 0.07 ml de EDTA al 0.5 %, para la realización de la citometría hemática completa.

La citometría hemática de rutina será efectuada en un contador de células automático (Counter Coulter Ss).

* No se establece el número de cada grupo, ya que en la práctica hay que sujetarse a su disponibilidad y asistencia.

Equipo

Centrífuga clínica, Aparatos científicos mod. Solvat.

Microscopio óptico, Carl Zeiss mod. 4966514.

Estufa de temperatura controlada, Maysa mod. HDP-334.

Baño de agua de temperatura controlada, Precision Scientific.
 Potenciómetro, Sargent-Welch Scientific Company mod. PBL.
 Espectrofotómetro, Bauch and Lomb.
 Balanza analítica, Mettler H-80.
 Vibrador, Vortex-genie.
 Refractómetro, American Optical.
 Densitómetro para electroforesis, mod. 345 Clifford Instrument.
 Cámara de electroforesis y aditamentos, mod. 345 Clifford Instrument.
 Parrilla eléctrica, Thermoline.
 Olla de presión, Presto mod. 5-12L.
 Contador de células, Counter Coulter Ss.

Material

Cámaras de Neubauer
 Cubrehematímetros
 Pipetas de Thoma para glóbulos blancos
 Gradilla
 Tubos de ensayo de 13 x 100 y de 12 x 75 mm
 Tubos de ensayo de plástico de 12 x 75 mm
 Cajas de Petri
 Cámara doble para MIF, tipo Bloom
 Tubos capilares
 Porta y cubreobjetos
 Matraces aforados de 25, 50, 100, 500 y 1000 ml
 Matraz erlenmeyer de 125 ml
 Mechero Fisher
 Jeringas desechables de 1, 5 y 20 ml, con aguja del No. 18
 Pipetas Pasteur
 Pipetas graduadas de 0.1, 1, 5 y 10 ml
 Espátula de acero inoxidable
 Vasos de precipitado de 250 ml

Perilla de seguridad
 Tripilé
 Tela de alambre con centro de asbesto
 Torundas con alcohol
 Torundas con Benzal
 Parafina
 Papel parafilm

Reactivos

Heparina 1000 UI / ml Lipo-Hepin
 Medio esencial mínimo Eagle (MEN)
 Hemolisina IgM
 Suspensión de eritrocitos de carnero
 Nitroazul de xatazolio Sigma
 Zimosan Sigma
 Piridina Baker
 Membranas de acetato de celulosa
 Tiocianato de potasio Baker
 Acido sulfúrico concentrado Baker
 Alcohol etílico Baker
 Cloruro de sodio Baker
 Cloruro de potasio Baker
 Cloruro de calcio Baker
 Fosfato diácido de potasio Baker
 Sulfato de magnesio heptahidratado Baker
 Glucosa Merck
 Bicarbonato de sodio Baker
 Citrato de sodio dihidratado Baker
 Acido cítrico monohidratado Baker
 Rojo de fenol Sigma
 Tris Baker

Fosfato dibásico de sodio Técnica Química
 Cloruro de calcio dihidratado Baker
 Silicón Sigma
 Acido clorhídrico concentrado Baker
 Azul de metileno Sigma
 Eosina Sigma
 Antígenos (PPD, varidasa, candidina y tricofitina)

Preparación de soluciones

-Solución salina amortiguada pH 7.4 (SSA)

Reactivos	Cantidad (gramos)
NaCl	8.0000
KCl	0.4000
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2000
Na ₂ HPO ₄	0.0450
KH ₂ PO ₄	0.0600
Disolver en 500 ml de agua destilada, (solución A).	

CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.1470
Disolver en 500 ml de agua destilada, (solución B).	

Glucosa	1.0000
Disolver en 10 ml de agua destilada y mezclar con partes iguales de las soluciones A y B, (solución C).	

Rojo de fenol	0.0020
Disolver en 10 ml de agua destilada y añadir a la mezcla anterior (solución C).	

Tris	19.1000
Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar a pH 7.4 con HCl, aforar	

a 1000 ml con agua destilada (solución D).

Solución de trabajo: mezclar volúmenes iguales de las soluciones C y D- y reajustar el pH a 7.4, si es necesario.

-Solución de Krebs-Henseleit

Reactivos

1.- NaCl (0.1540 M)	100 partes	8.9990 gr./lt.
2.- KCl (0.1540 M)	4 "	0.5740 gr./50 ml
3.- CaCl ₂ (0.1100 M)	3 "	0.6103 gr./25 ml
4.- KH ₂ PO ₄ (0.1540 M)	1 "	0.5238 gr./25 ml
5.- MgSO ₄ . 7 H ₂ O (0.1540 M)	1 "	0.9485 gr./25 ml
6.- Glucosa		0.2600 gr./130 partes
7.- NaHCO ₃	21 "	3.2500 gr./250 ml

Se mezclan las partes respectivas del 1 al 6 ajustando el pH a 7.4 con aproximadamente 12 ml de NaHCO₃, se completan las 21 partes con - NaHCO₃ burbujeados con CO₂ durante una hora. Esta solución sirve para que las células estén en una solución buffer y se mantengan más tiempo vivas.

-Solución de Alsever

Reactivos

Glucosa	20.5000 gr.
Citrato de sodio dihidratado	08.0000 "
Acido cítrico monohidratado	00.5500 "
Cloruro de sodio	04.2000 "

Disolver en agua destilada y aforar a 1000 ml. Esterilizar a 10 libras-- por 15 minutos.

-Preparación de partículas opsonizadas

Preparar una solución de Zymosan de 10 mg./ml en agua destilada. Estas partículas se lavan dos veces con agua destilada centrifugando a 3000 rpm, desechando el sobrenadante. El paquete de partículas de Zymosan se resuspende en el mismo volumen inicial con suero humano fresco; la

mezcla se homogeniza y se incuba a 37 °C por 20 minutos. Los componentes no unidos se eliminan lavando dos veces con agua destilada, resuspendiendo el paquete en el volumen inicial de agua. Esta solución es estable durante una semana a 4 °C.

-Preparación del nitroazul de tetrazolio (NAT)

Disolver 0.01 gramos de nitroazul de tetrazolio en 10 ml de -- agua destilada. Una vez disuelto se agregan 0.0850 gramos de NaCl.

-Líquido diluyente

Acido acético glacial	2.0 ml
Solución acuosa de violeta de genciana al 1 %	1.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

-Medio mínimo esencial de Eagle (MEM)

Se disuelven 9.6 gramos de medio en un litro de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.2 (color salmón) con bicarbonato de sodio y se esteriliza por filtración en millipore.

Métodos

-Método espectrofotométrico para la reducción del nitroazul de tetrazo---
lio (NAT)

Fundamento:

El NAT, compuesto hidrosoluble de color amarillo, puede ser -- convertido, al ser fagocitado por los leucocitos normales, en una sustancia soluble, formazán, de color azul oscuro, por medio de una reducción química. Esta reducción tiene lugar en la vacuola fagocítica, al contacto con las enzimas lisosomales y se observa in vitro minutos después de ser fagocitado. La reducción del NAT se mide cuantitativamente por medio de densidades ópticas, hechas en el espectrofotómetro.

Procedimiento:

Obtener 20 ml de sangre por punción venosa, en una jeringa de plástico que contenga 250 UI de heparina, mezclar bien, transferir a tubos de 13 x 75 mm y dejar sedimentar a 37 °C de 1 a 2 horas. Cuando haya una buena separación de los eritrocitos, transferir el plasma rico en leucocitos a un tubo de 13 x 75 mm. Centrifugar los leucocitos a 1500 rpm durante 10 minutos. Lavar tres veces las células con solución de Krebs-Henseleit por centrifugación en las mismas condiciones. El último sedimento se resuspende en la misma solución y se hace una cuenta de células usando como diluyente líquido de Turk.

Las células se ajustan con solución de Krebs-Henseleit a una concentración de 20×10^6 células/ml. Enseguida proceder de acuerdo al siguiente cuadro, para cada muestra se hace un duplicado:

SOLUCIONES	PROBLEMAS		CONTROLES	
	F	R	F	R
Sol. de Krebs-Henseleit	0.3 ml	0.4 ml	0.3 ml	0.4 ml
Partículas opsonizadas	0.1 ml	-----	0.1 ml	-----
Sol. de KCN 0.1 N	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Solución de NAT	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml

Todos los tubos se incuban a 37 °C por 15 minutos. A todos los tubos se les agregan 0.1 ml de células ajustadas a 20×10^6 células/ml y se incuban 20 minutos a 37 °C. Transcurrida la incubación, parar la reacción con 2 ml de HCl 2.5 N. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, desechar el sobrenadante. Agregar 1 ml de piridina a cada tubo y poner en baño maría a ebullición por 20 minutos. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, leer a 515 nm el sobrenadante contra un blanco de piridina.

NOTA:

F fagocitando
R reposando

-Determinación del factor inhibidor de la migración (MIF)

Fundamento:

Esta prueba se basa en el hecho de que en una población de leucocitos, los linfocitos sensibilizados se transforman al estar en contacto con el antígeno específico y producen MIF, el cual actúa inmovilizando a las células fagocíticas presentes en la misma población.

Procedimiento:

Obtener 20 ml de sangre por punción venosa, en una jeringa de plástico que contenga 250 UI de heparina, mezclar bien, transferir a tubos de 13 x 75 mm y dejar sedimentar a 37 °C. Continuar la incubación durante 1 a 2 horas, hasta que haya una buena separación de los eritrocitos. El plasma rico en leucocitos se transfiere a un tubo de 13 x 75 mm. Los leucocitos se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos y se lavan 2 veces con Alsever por centrifugación en las mismas condiciones. El último sedimento se resuspende en 0.5 ml de medio de cultivo (MEM), y se hace una cuenta celular, en una cámara de Neubauer, usando líquido de Turk como líquido diluyente. Las células se ajustan a una concentración de 5×10^7 células/ml. Con la suspensión anterior se llenan capilares, se sellan a la flama y se centrifugan a 1500 rpm durante 3 minutos.

Cada capilar se corta en la interfase, células-sobrenadante, y la porción que contiene el paquete celular se coloca en la cámara de MIF con piso, fijándolo sobre la gota de silicón. Ya fijos los capilares, las cámaras se cubren con un cubreobjetos y éstos se sellan con parafina. Las cámaras se llenan por los orificios laterales una con medio de cultivo y la otra con medio y 0.1 ml de antígeno. Deben llenarse completamente, sin dejar burbujas. Se sellan los orificios con parafina y las cámaras se incuban perfectamente horizontales, a 37 °C por 48 horas. Lo anterior se repite para cada uno de los siguientes antígenos: varidasa, PPD (tuberculina), candidina y tricofitina.

NOTA: Todo el procedimiento debe hacerse en condiciones de esterilidad.

A las 48 horas se miden las áreas de migración, proyectándolas sobre un papel con la ayuda de una lámpara, las áreas de migración se dibujan sobre el papel, se recortan y se pesan. Se calcula la inhibición -

de la migración por el antígeno, tomando como 100 % de migración la de los capilares incubados sin antígeno.

Si los capilares incubados con antígeno presentan una inhibición mayor al 15 %, indica que hubo producción de MIF, por el contrario, si los capilares incubados con antígeno no muestran inhibición en su migración, o ésta es menor al 15 %, se considera que no hubo producción de MIF.

-Separación de Linfocitos por centrifugación en Ficoll-Hypaque

Fundamento:

Las pruebas para las células T y B humanas son hechas de ordinario en suspensiones purificadas de células sanguíneas mononucleares. -- El procedimiento aceptado para la obtención de suspensiones de estas células se basa en la centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque.

Procedimiento:

Extraer 5 ml de sangre venosa con una jeringa de plástico a la cual previamente se le colocan 100 UI de heparina. Mezclar la sangre dentro de la jeringa. La sangre heparinizada se diluye con un volumen semejante de solución salina amortiguada (SSA) pH 7.4.

Colocar dentro de un tubo de 13 x 100 mm 3 ml de una mezcla de Ficoll-Hypaque (Ficoll al 9 %, 24 partes e Hypaque al 34 %, 10 partes) y estratificar sobre esta mezcla 4 ml de la sangre diluida. Centrifugar a 1500 rpm durante 40 minutos. Separar la fracción rica en linfocitos (separada como una capa de células en la interfase) con ayuda de una pipeta Pasteur. Transferir esta capa de células a un tubo de 13 x 100 mm y lavar las células por centrifugación con la solución salina amortiguada pH 7.4. Repetir el proceso de lavado por tres ocasiones. Contar el número de células recuperadas y ajustarlo a 4×10^6 células/ml.

-Cuantificación de linfocitos B por el método de "rosetas indirectas" o "rosetas B"

Fundamento:

Este método se basa en que los linfocitos B tienen receptores sobre su superficie para el componente C_{3b} del complemento (C_{3b}), por lo tanto, eritrocitos a los cuales se les ha fijado C_{3b} sobre su superficie podrán unirse a los linfocitos B para formar lo que se conoce como -- "roseta B".

Procedimiento:

Colocar en un tubo 5 ml de una suspensión de eritrocitos de -- carnero lavados y ajustados al 5 % en SSA a la mitad del título de aglutinación (determinado previamente). Incubar esta mezcla a 37 °C durante 30 minutos, agitando frecuentemente; lavar los eritrocitos por centrifugación tres veces con SSA y resuspender en 5 ml de SSA; añadir 5 ml de suero humano fresco (como fuente de complemento) diluido 1:40 en SSA e incubar a 37 °C durante 30 minutos agitando frecuentemente; lavar los eritrocitos por centrifugación tres veces con SSA y ajustar la suspensión al -- 1 %.

Colocar en un tubo de 13 x 75 mm 0.2 ml de la suspensión anterior de eritrocitos al 1 % y mezclar con 0.25 ml de suspensión de linfocitos que contenga 4×10^6 células/ml. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, dejar reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.

Aspirar parte del sobrenadante y resuspender las células mediante suave agitación. Colocar una gota entre porta y cubreobjetos, contar al microscopio un total de 100 linfocitos. Aquellos linfocitos que presenten adheridos sobre su superficie tres o más eritrocitos se considerarán rosetas (positivos).

-Cuantificación de linfocitos T por el método de "rosetas directas" o -- "rosetas T"

Fundamento:

La presencia de receptores para eritrocitos de carnero que poseen los linfocitos humanos T, permite que al mezclar bajo determinadas condiciones estos dos tipos de células, se formen las llamadas "rosetas directas" o "rosetas T".

Procedimiento:

Colocar en un tubo de 13 x 75 mm 0.25 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero lavados y ajustados al 1 % en SSA, agregar 0.25 ml de una suspensión de linfocitos que contenga 4×10^6 células/ml. Incubar a 37°C durante 15 minutos, centrifugar a 1500 rpm durante tres minutos y dejar en baño de hielo toda la noche.

Aspirar parte del sobrenadante y resuspender las células muy suavemente, colocar una gota entre cubre y portaobjetos, contar al microscopio un total de 100 linfocitos, siguiendo el mismo criterio usado para contar rosetas B.

-Cuantificación de proteínas totales por refractometría**Fundamento:**

Cuando una radiación pasa de un medio a otro, una parte de ella se refleja y otra se transmite. En el nuevo medio, la radiación transmitida conserva su frecuencia, pero tanto la velocidad como la dirección de propagación puede cambiar. Cuando una radiación electromagnética incide sobre una molécula, esta tiende a polarizarse, ya que el campo eléctrico de la onda desplaza electrones dando lugar a un dipolo. La energía producida por la polarización da lugar a la emisión de una radiación secundaria, que interfiere con la radiación incidente y causa los fenómenos de refracción, reflexión y dispersión de la luz. El refractómetro contiene una celda en la parte superior de un prisma de vidrio en la que se colocan las muestras líquidas. La luz monocromada entra a la superficie horizontal del prisma y se observa por un telescopio móvil. La determinación del índice de refracción es proporcional a la concentración de proteínas (41).

Procedimiento:

Obtener 5 ml de sangre por punción venosa, con una jeringa de plástico de 5 ml, transferir la sangre a un tubo de 13 x 100 mm y dejar coagular. Remover el coágulo y centrifugar 3500 rpm durante 5 minutos, separar el suero.

Del suero obtenido, colocar una gota en la placa del refractómetro (American Optical) y realizar la lectura.

-Cuantificación de proteínas séricas por electroforesis de zona

Fundamento:

La identificación de las proteínas séricas se realiza casi siempre por electroforesis. La determinación se basa en que los diferentes tipos de proteínas muestran en un campo eléctrico diversos grados de migración en relación con su forma, tamaño y carga.

En la electroforesis de zona las partículas cargadas se colocan sobre un medio estabilizador (acetato de celulosa), sobre el que se depositan en el curso de su emigración, de manera que, posteriormente, en este medio, las proteínas pueden ser sometidas a tinción.

Procedimiento:

Remojar la membrana de acetato de celulosa en solución reguladora (buffer de Barbitol pH 8.6) durante 10 minutos, secar entre papel-filtro absorbente. Colocar la membrana sobre el soporte y ponerlo en la cámara previamente llenada con solución reguladora. Aplíquese la muestra. Aplicar durante 20 minutos una corriente de 200 voltios. Secar la membrana y teñir.

Tinción: Sumergir la membrana en rojo Ponceau por 10 minutos. -- Pasarla a una tina con 100 ml de tricloroacético al 5 % en agua destilada. Enjuagar en ácido acético al 5 % en agua destilada hasta decolorar. Pasar al siguiente reactivo durante dos minutos:

mezcla A: 95 ml de etanol y 5 ml de isopropanol.

Pasar al siguiente reactivo durante un minuto:

mezcla B: 70 ml de la mezcla A y 30 ml de ciclohexanona.

Dejar secar al aire y leer las membranas en un densitómetro.

NOTA: la muestra para aplicar se tomará del suero obtenido para la determinación de proteínas totales.

-Método estadístico

Los resultados serán analizados utilizando el análisis de varianza (ANADEVIA), el cual es una prueba paramétrica que permite encontrar diferencias estadísticas con un nivel de significancia dado entre varias poblaciones de estudio, con el objeto de saber si las diferencias son debidas a la variabilidad biológica o a los tratamientos.

El ANADEVIA es una prueba inovada por R. A. Fisher, la cual -- consiste en dividir las fuentes de variación de los datos en fragmentos que son estimados a través de una sumatoria de cuadrados que nos brindan estimadores insesgados y de mínima varianza del efecto de un tratamiento y del error experimental. Cuando se compara este par de estimadores y la mayor carga numérica se desplaza hacia el efecto de tratamientos (entre grupos) podemos asegurar, con la confianza a la cual se trabajó, que -- existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, de lo contrario las variaciones de los resultados son debidas al error experimental (dentro de los grupos) producto de las diferencias inherentes de los individuos en estudio, es decir, a la variabilidad biológica de los mismos, (39, 40).

Se propuso una hipótesis nula (H_0) que afirma que los grupos son iguales y una hipótesis alternativa que afirma que los grupos son diferentes (H_a).

VII. RESULTADOS

Los resultados fueron tratados mediante el análisis de varianza (ANADEVVA). Se determinó un valor de F (F calculada) con la relación de las medias cuadráticas (estimadores de varianza), obtenidas para el tratamiento (entre grupos) y para la variabilidad biológica (dentro de los grupos). Este valor se comparó con una F de tablas para un nivel de significancia dado, por lo que si F calculada es mayor que F de tablas, la hipótesis nula (H_0) se rechaza, de lo contrario la hipótesis nula (H_0) no se rechaza.

Como regla de decisión se consideró que si " F probable " (--- probabilidad de rechazo de H_0) es mayor de 0.05 (nivel de significancia) no hay diferencia estadística entre ambos grupos. Si " F probable " es menor de 0.05, entonces, si hay diferencia estadística entre el grupo control y el grupo de poliglobúlicos.

A continuación se presentan los resultados del tratamiento estadístico ANADEVVA, así como las gráficas que muestran las medias aritméticas de los grupos para cada determinación.

VARIABLE	PROBABILIDAD DE RECHAZO DE H_0 (F probable)
Hemoglobina	$P < 0.05$
Hematócrito	"
Eritrocitos	"
V.G.M.	$P > 0.05^{**}$
H.G.M.	"
C.M.H.G.	"
Leucocitos	"
Linfocitos	$P < 0.05^*$
Monocitos	$P > 0.05^{**}$
Eosinófilos	"
Basófilos	"
Neutrófilos	$P < 0.05^*$
En banda	$P > 0.05^{**}$
Rosetas T	"
Rosetas B	"
Reducc. del NAT	"
MIF: candidina	"
tricotitina	"
varidasa	"
PPD	"
Prot. totales	"
Albúmina	$P < 0.05^*$
Globulinas alfa 1	$P > 0.05^{**}$
Globulinas alfa 2	"
Globulinas beta	$P < 0.05^*$
Globulinas gamma	$P > 0.05^{**}$

* F calculada $<$ F tablas; H_0 no se rechaza, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los grupos.

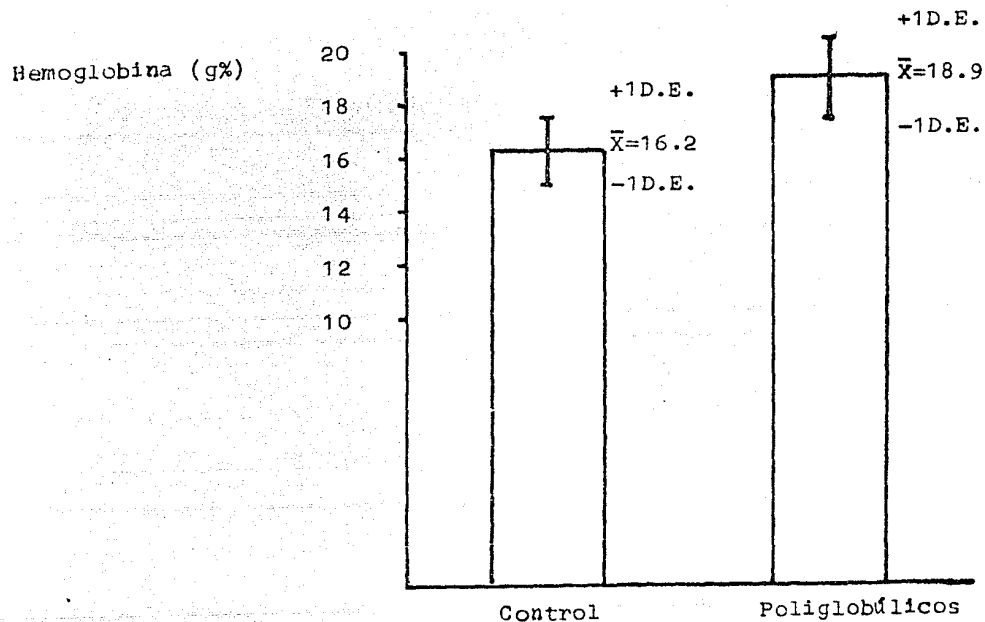
** F calculada $>$ F tablas; H_0 se rechaza, por lo tanto si hay diferencias significativas entre los grupos.

De acuerdo con el cuadro de resultados, las variables que fueron estadísticamente significativas son las siguientes: linfocitos, neutrófilos, albúmina y betaglobulinas, ya que $P < 0.05$ (F de Fisher). -- Las demás variables no fueron estadísticamente significativas, ya que -- $P > 0.05$ (F de Fisher).

NOTA:

Las variables hemoglobina, hematócrito y número de glóbulos rojos no se consideran para la discusión de resultados, ya que de hecho, estas dan la diferencia entre uno y otro grupo, es decir, para que un individuo sea clasificado dentro del grupo de poliglobúlicos debe tener estos parámetros muy aumentados.

Hemoglobina promedio de grupo control y grupo de poliglobulicos

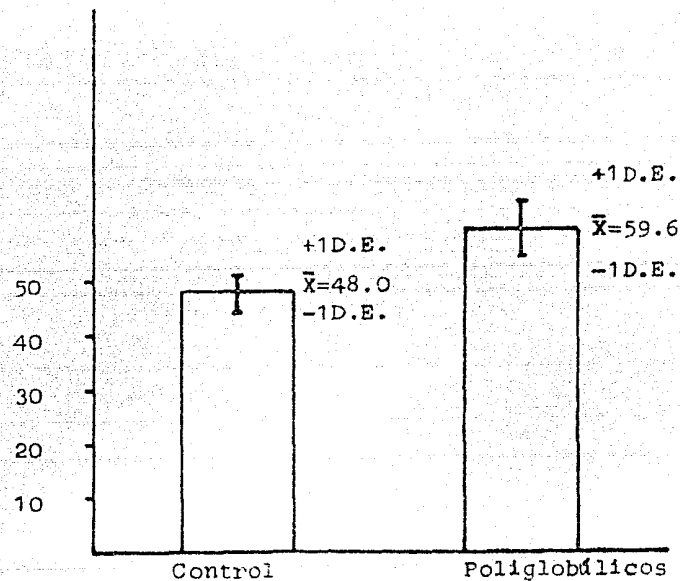


Grafica No. 1

P menor de 0.05; si hay diferencia estadística

Hematocrito promedio de grupo control y grupo poliglobúlicos

Hematocrito (%)

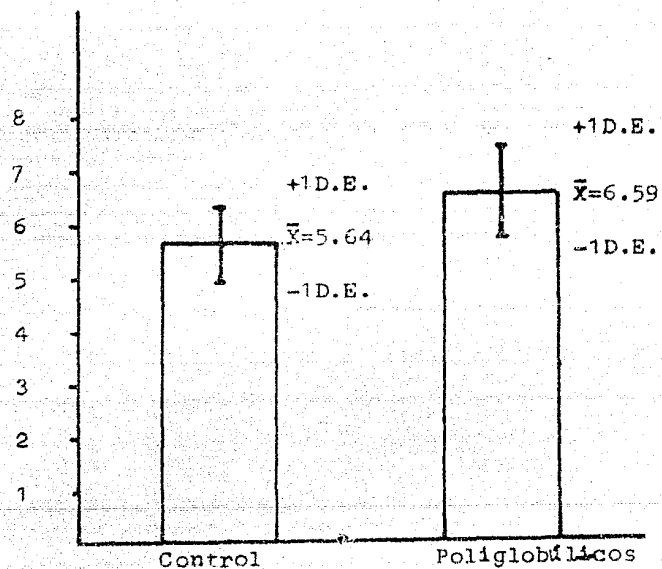


Grafica No. 2

P menor de 0.05; si hay diferencia estadística

Media del No. de eritrocitos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

No. de eritrocitos/ mm³
(X 10⁶)

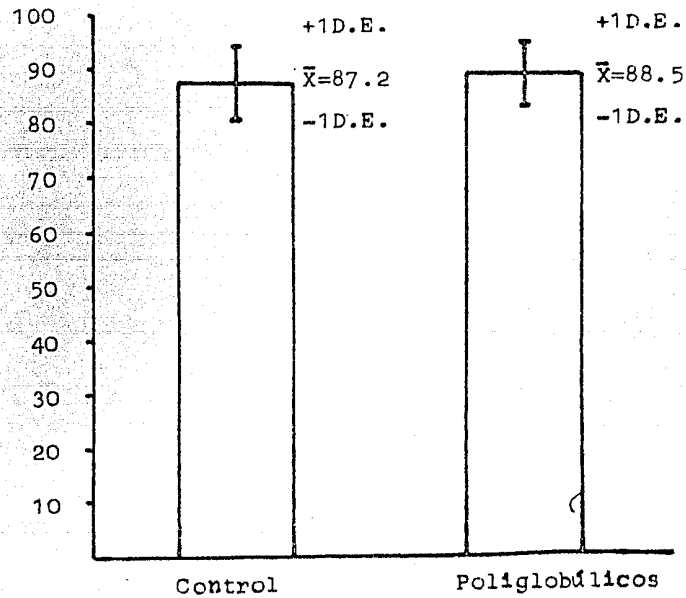


Grafica No.3

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Volumen Globular Medio de grupo control y grupo de poliglobulicos

V.G.M. (μ^3)

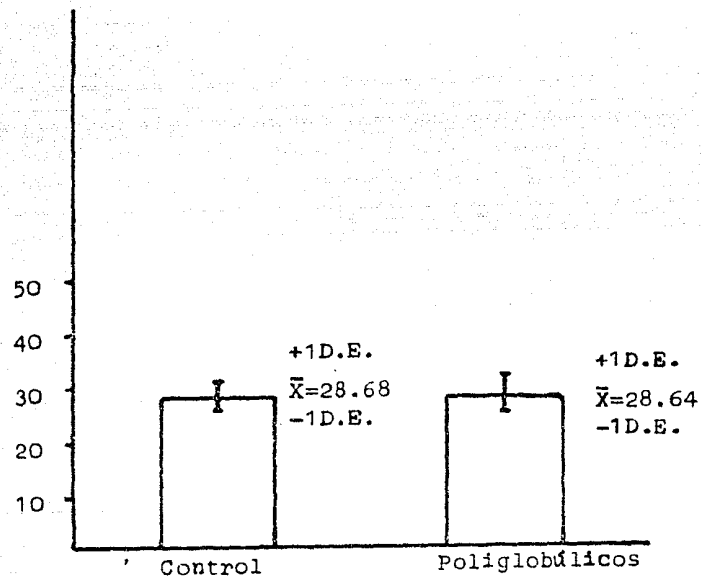


Grafica No. 4

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Hemoglobina Globular Media de grupo control y grupo de poliglobúlicos

H.G.M. (g)



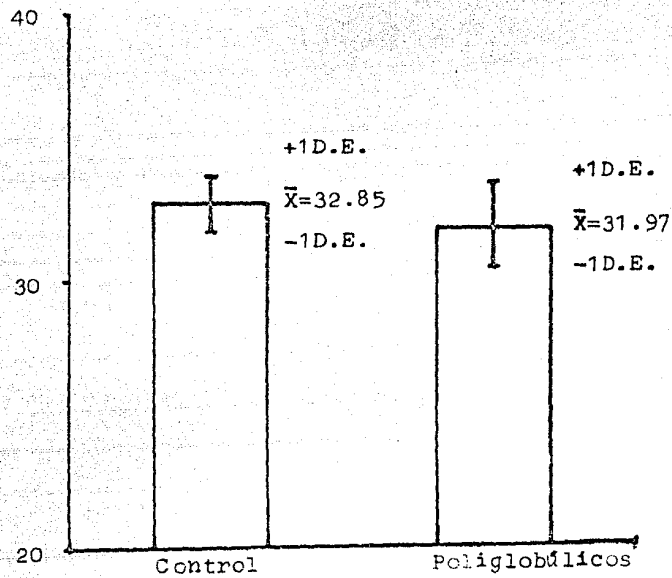
Grafica No. 5

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Concentración Media de Hemoglobina Globular de grupo control y

grupo de poliglobúlicos

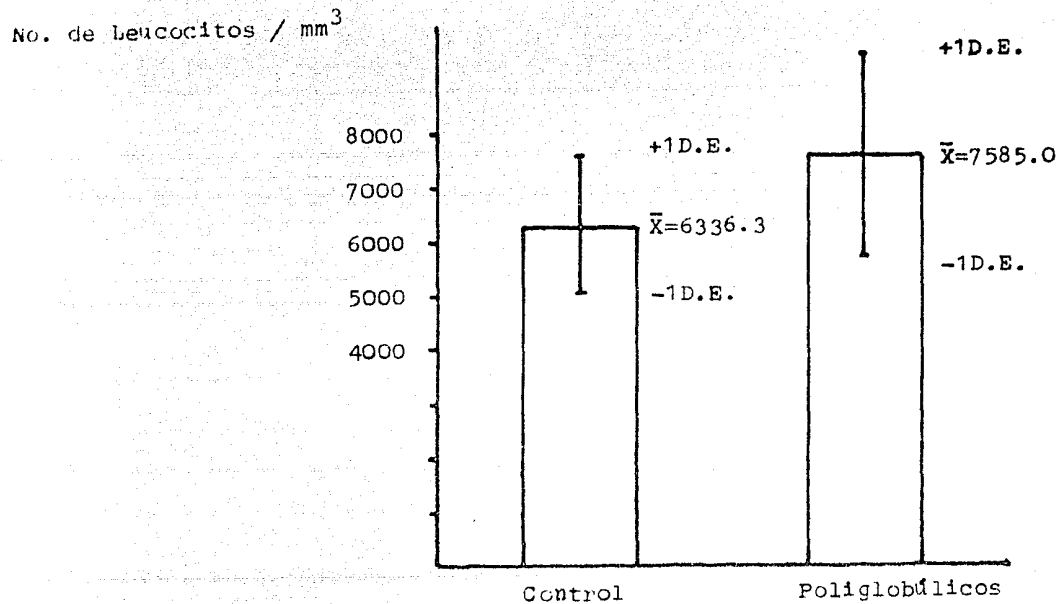
C.M.H.G. (%)



Grafica No. 6

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

No. de Leucocitos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

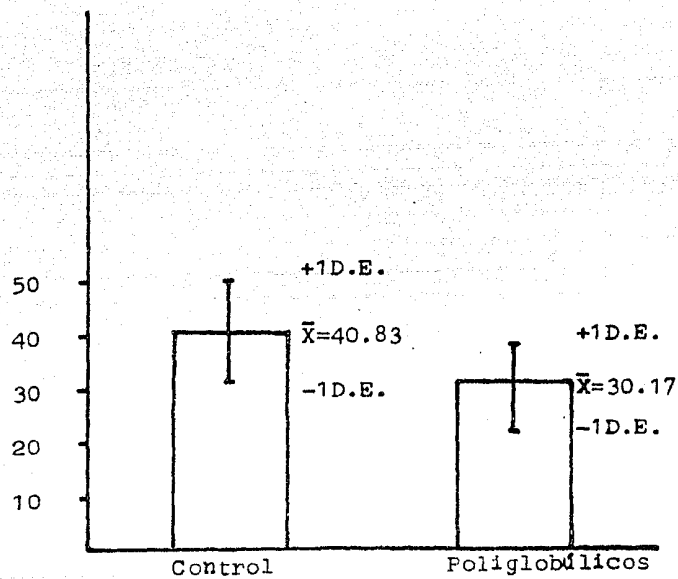


Grafica No. 7

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Linfocitos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

Linfocitos (%)

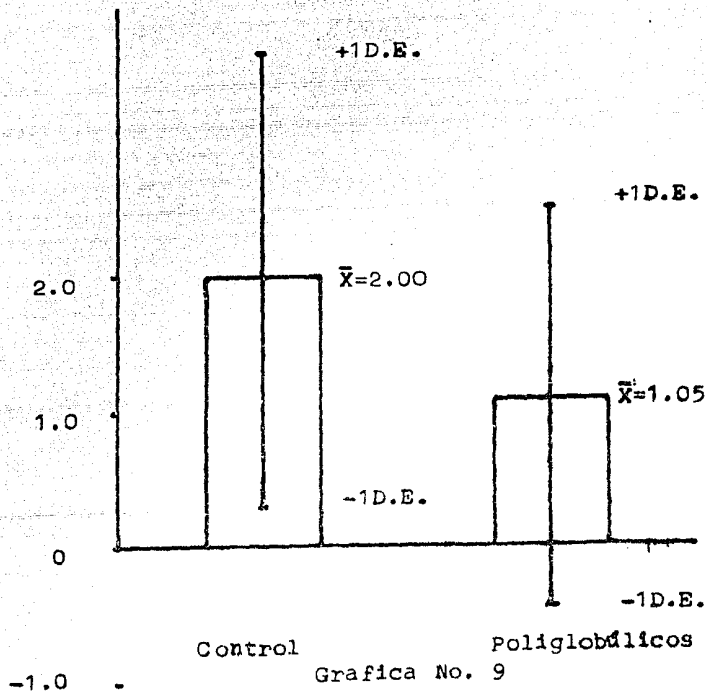


Grafica No. 8

P menor de 0.05; si hay diferencia estadística

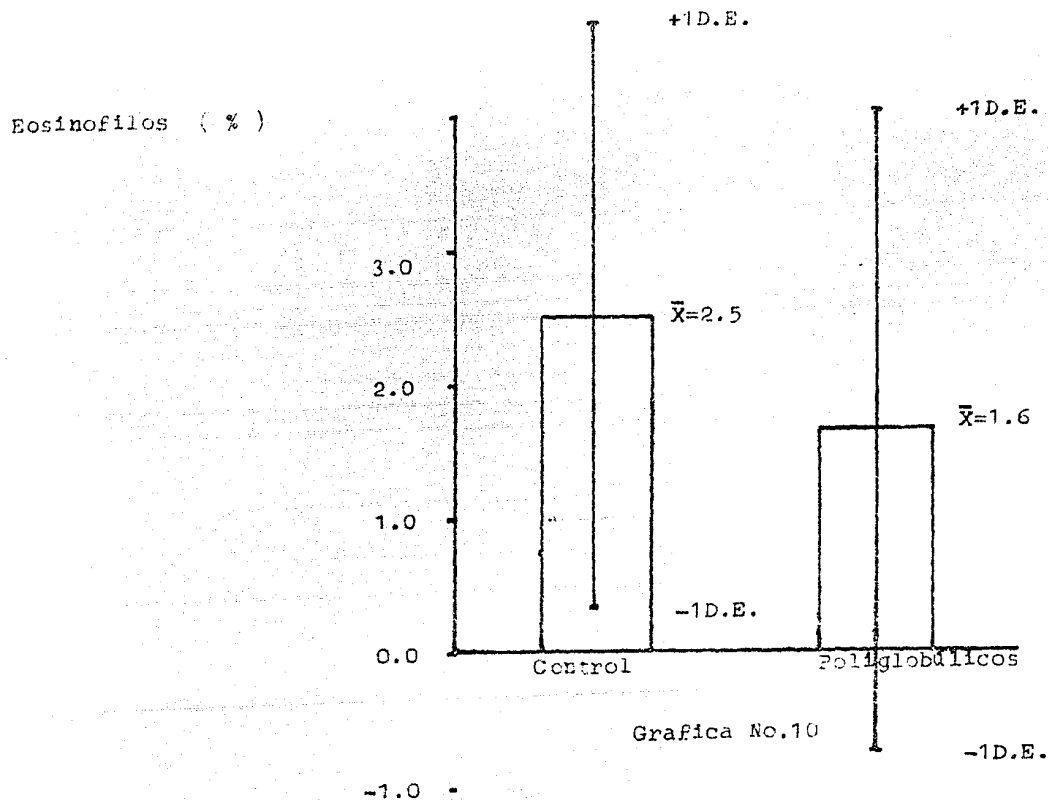
Monocitos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

Monocitos (%)



P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Eosinofilos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

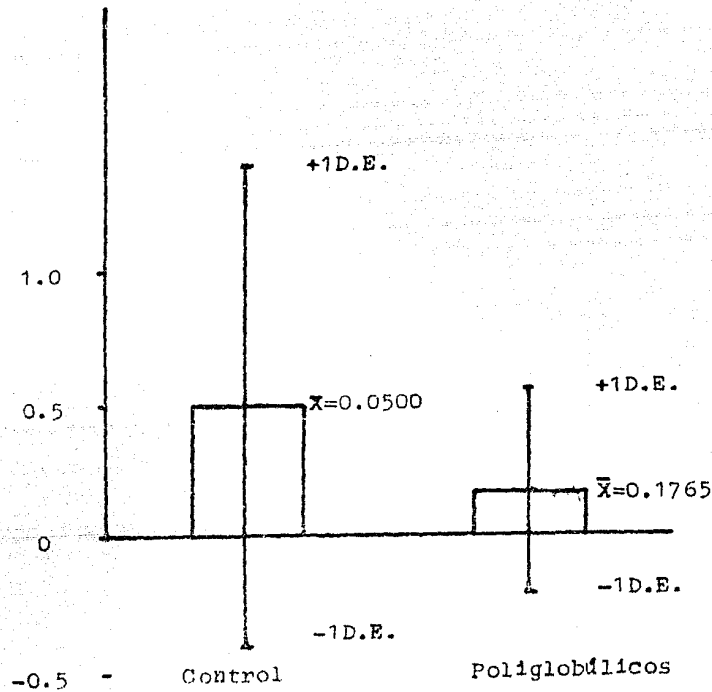


Grafica No.10

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Basofilos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

Basofilos (%)

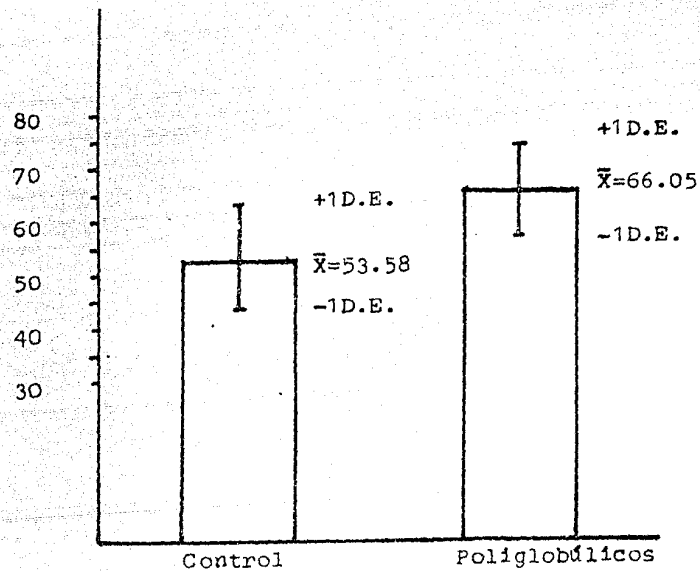


Grafica No. 11

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Neutrofilos de grupo control y grupo de poliglobúlicos

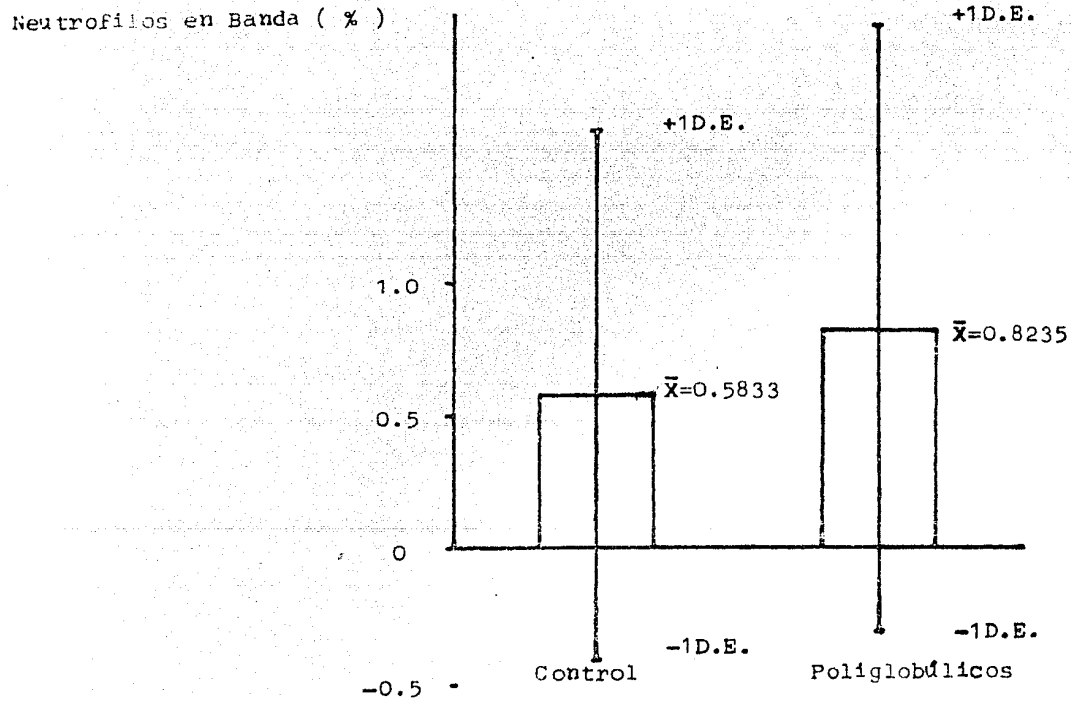
Neutrofilos (%)



Grafica No. 12

P menor de 0.05; si hay diferencia estadística

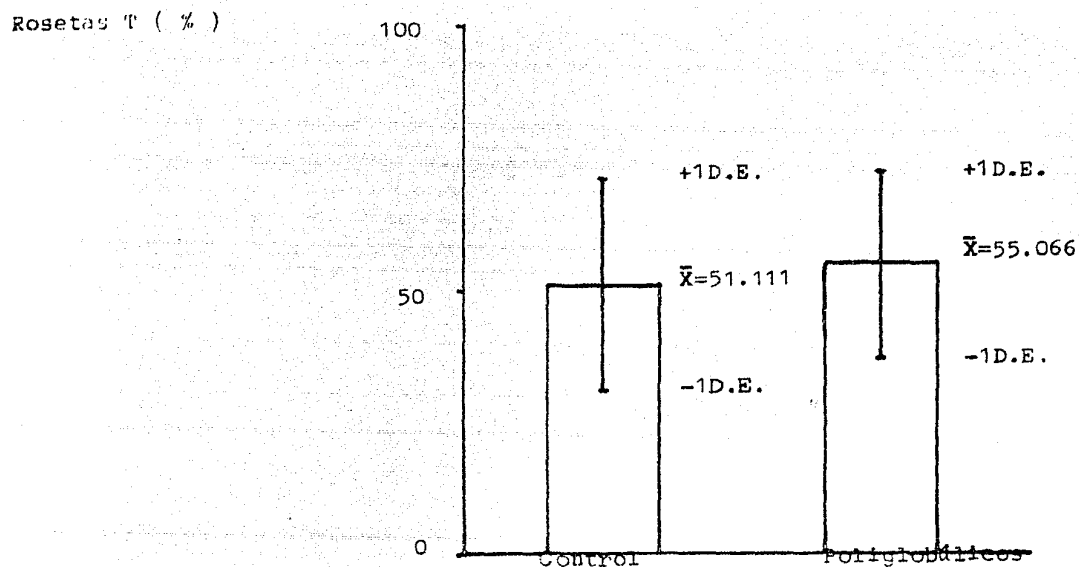
Neutrofilos en Banda de grupo control y grupo de poliglobulicos



Grafica No. 13

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

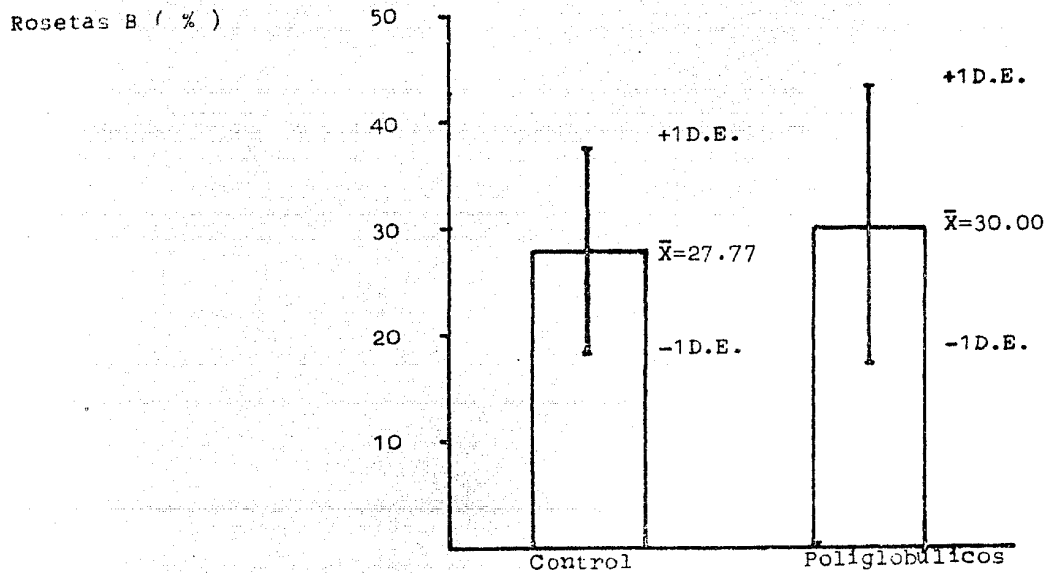
Rosetas T de grupo control y de grupo de poliglobúlicos



Grafica No. 14

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

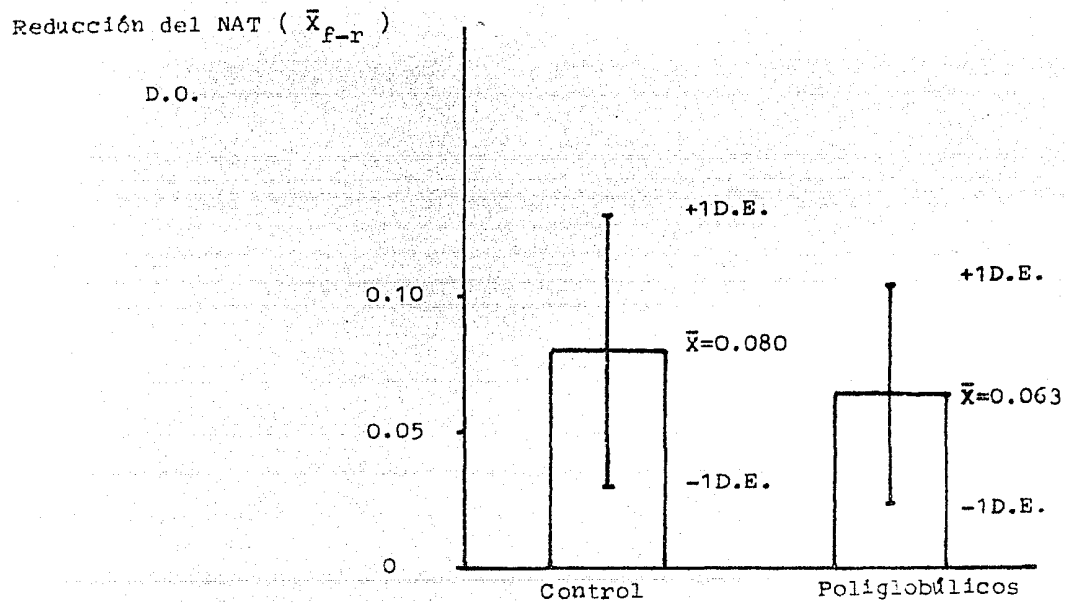
Rosetas B de grupo control y grupo de poliglobúlicos



Grafica No. 15

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Reducción del N.A.T. en grupo control y grupo de poliglobúlicos

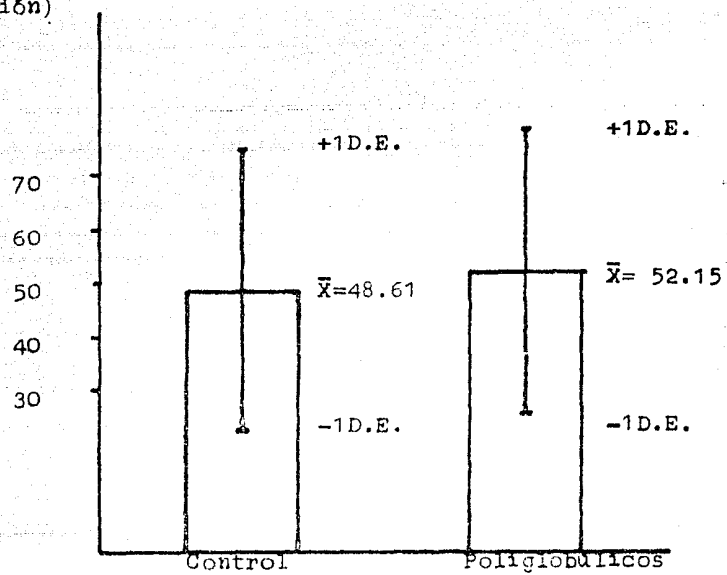


Grafica No. 16

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

M.I.F. (candidina) de grupo control y grupo de poliglobúlicos

MIF candidina (% inhibición)

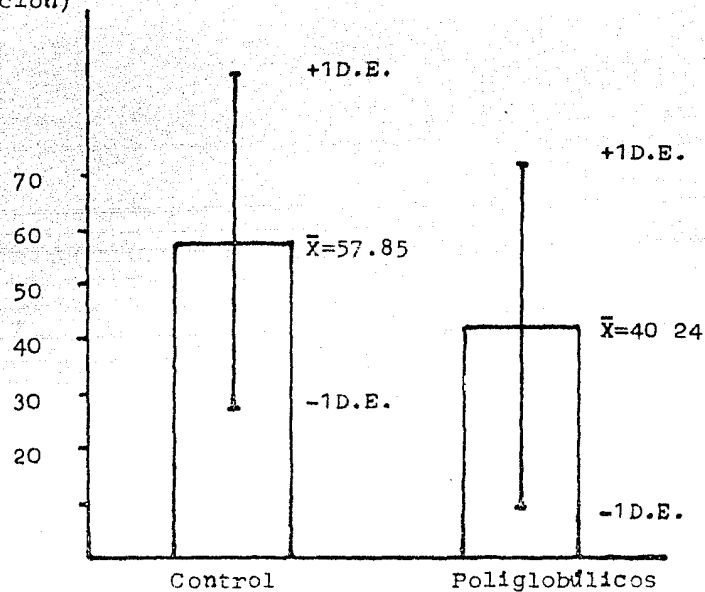


Grafica No. 17

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

M.I.F. (tricofitina) de grupo control y grupo de poliglobúlicos

MIF tricofitina (% inhibición)

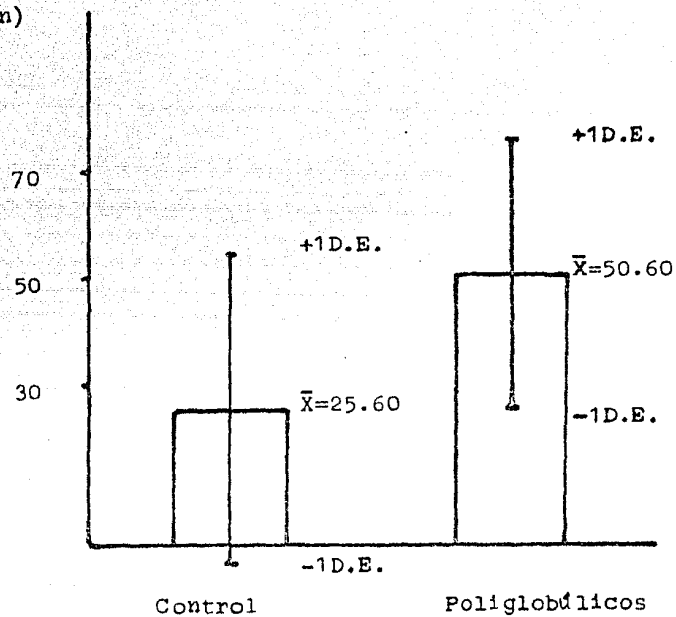


Grafica No. 18

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

M.I.F. (varidasa) de grupo control y grupo de poliglobúlicos

MIF varidasa (% inhibición)

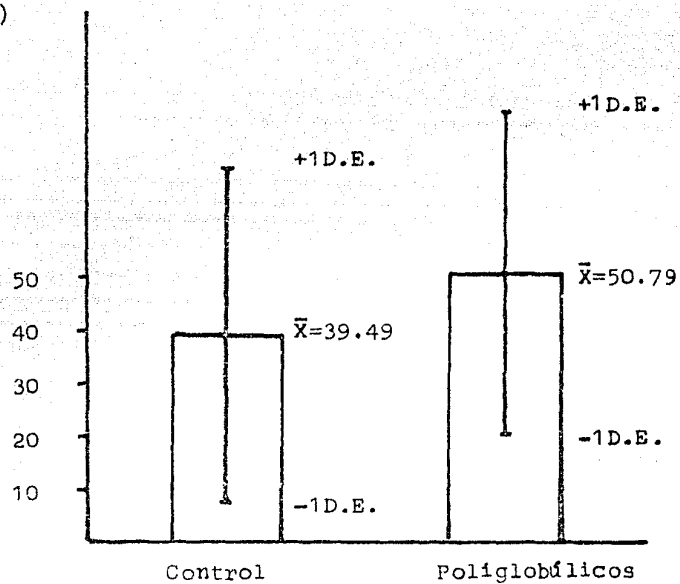


Grafica No. 19

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

M.I.F. (PPD) de grupo control y grupo de poliglobúlicos

MIF PPD (% inhibición)

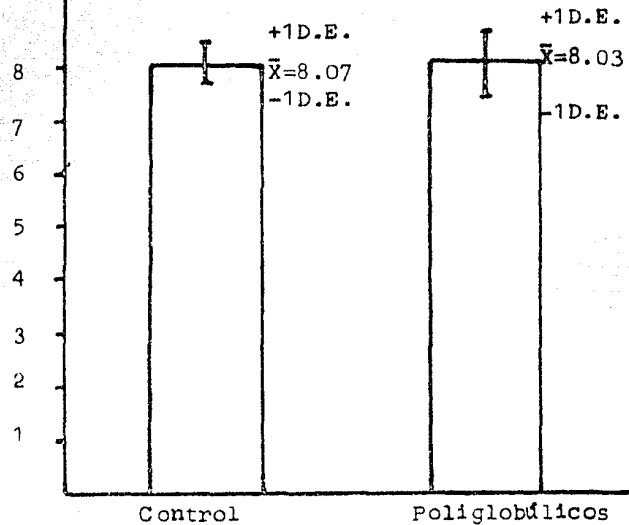


Grafica No. 20

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Proteínas totales de grupo control y grupo de poliglobúlicos

Proteínas totales (g%)

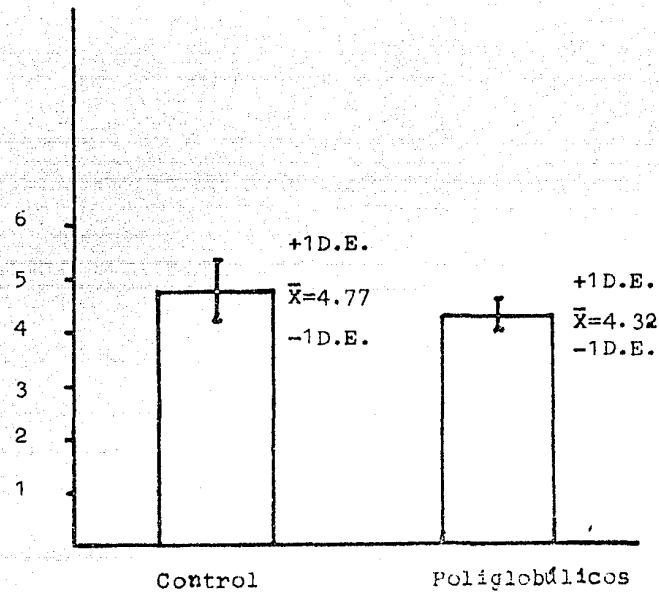


Grafica No. 21

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Albumina de grupo control y grupo de poliglobúlicos

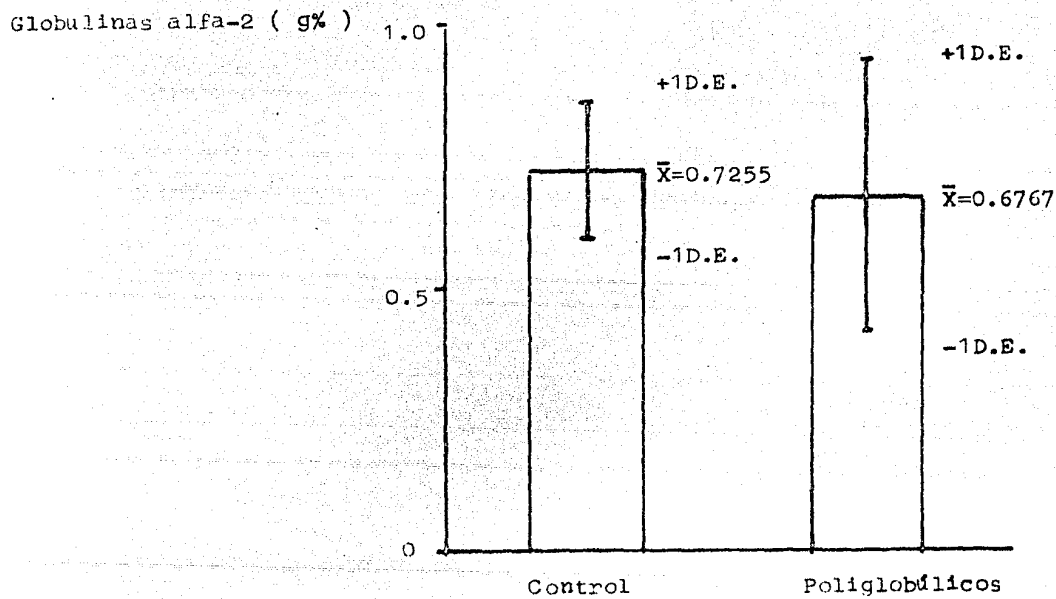
Albumina (g%)



Grafica No. 22

P menor de 0.05; si hay diferencia estadística

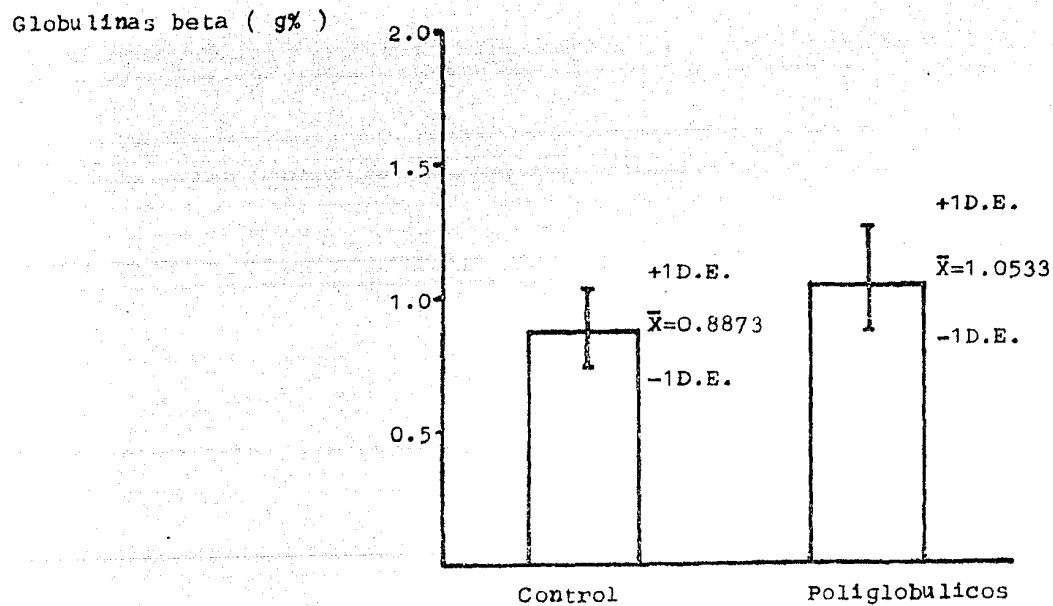
Globulinas alfa - 2 de grupo control y grupo de poliglobúlicos



Gráfica No. 24

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

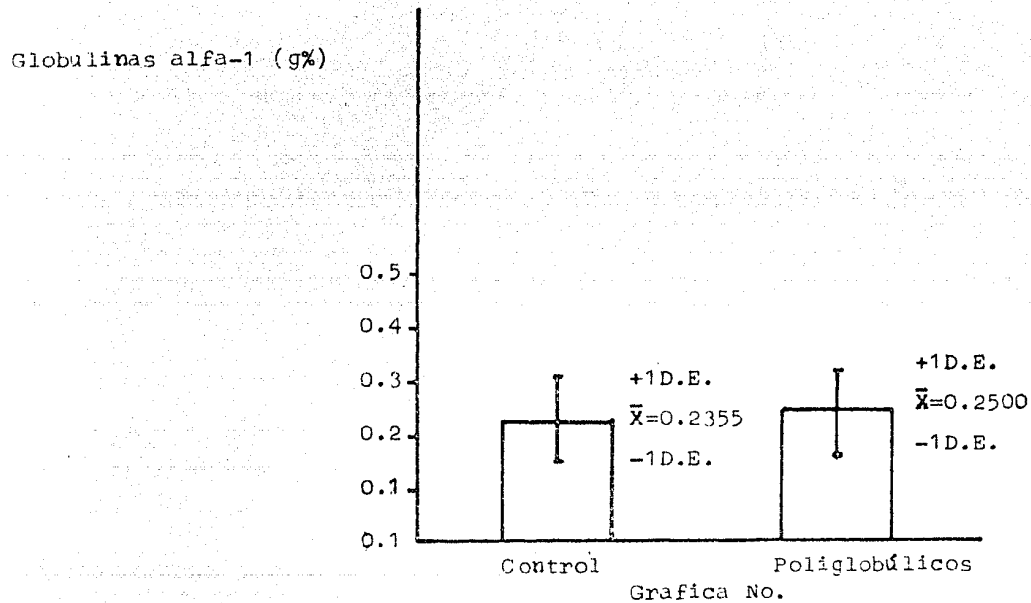
Globulinas beta de grupo control y grupo de poliglobulicos



Grafica No. 25

P menor de 0.05; si hay diferencia estadística

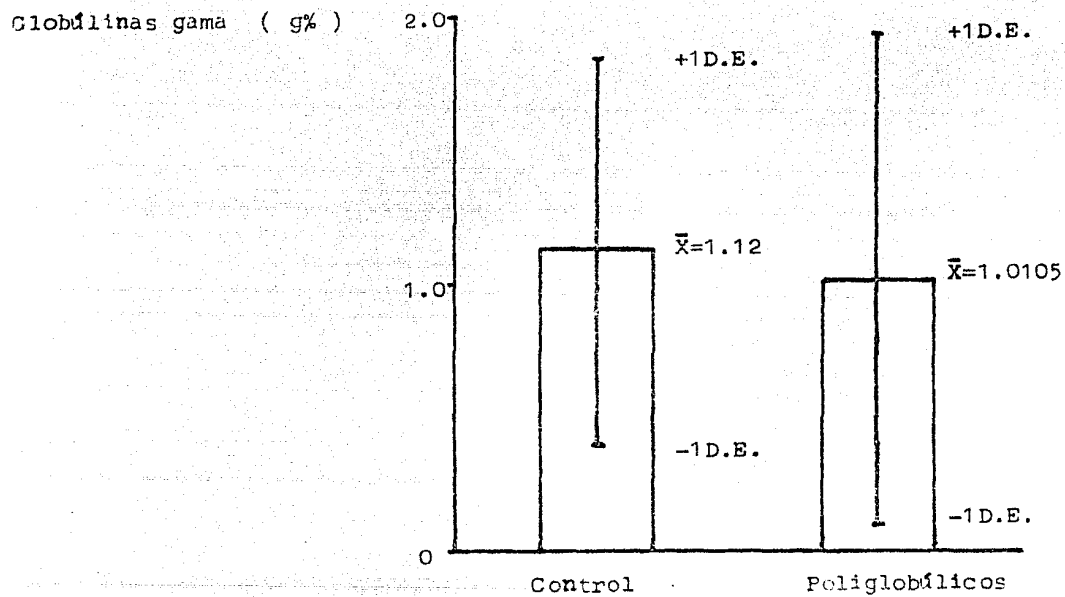
Globulinas alfa - 1 de grupo control y grupo de poliglobúlicos



23

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

Globulinas gama de grupo control y grupo de poliglobúlicos



Grafica No. 26

P mayor de 0.05; no hay diferencia estadística

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los siguientes parámetros:

- El valor relativo de linfocitos en el grupo de poliglobúlicos lo encontramos bajo en relación con el grupo control, considerando que esto es debido a las flebotomías, ya que se trata de células de una vida media muy prolongada por lo tanto de lento recambio, pero a pesar de esto encontramos normal la calidad de la respuesta mediada por estas células lo cual fue demostrado en las determinaciones de MIF y gammaglobulinas.
- El número relativo de neutrófilos en el grupo de pacientes se aprecia elevado, pero esto por un ajuste matemático ya que se trata de valores expresados en porcentaje y no por un aumento real de estas células ya que son recambiadas a una velocidad extraordinaria.
- La fracción albúmina de las proteínas séricas en el grupo de poliglobúlicos también se encontró disminuida. Creemos que esta situación obedece a la práctica de sangrías frecuentes en este tipo de pacientes, por el hecho de que la albúmina, cuya vida media es de aproximadamente cuatro semanas, no se produce a la misma velocidad con la que se extrae.
- La fracción de las betaglobulinas se aprecia elevada en el grupo de poliglobúlicos. La diferencia aquí dada, requiere de más estudios para poder ser explicada, debido a que esta fracción incluye un número amplio de proteínas que pudiesen tener relación con este incremento.

IX. CONCLUSIONES

- Al analizar los resultados encontramos que tanto la respuesta inmune celular como la respuesta inmune humoral de los pacientes no estaban alteradas como supusimos en un principio, ya que al evaluar ambas respuestas no encontramos diferencias significativas con respecto al grupo control.

- Consideramos que sería adecuado reintegrar el plasma y leucocitos a estos pacientes después de practicarse la flebotomía, ya que se les están quitando elementos hemáticos de lento recambio.

- Recomendamos la utilización del plasma de estos pacientes para la elaboración de reactivos biológicos. Se puede citar como ejemplo la producción de antisueros hemotipificadores, lo cual es fácil de realizar y que como producto comercial tiene un precio elevadísimo.

- Así mismo, si se demostrase, mediante pruebas de fragilidad de membrana, que los eritrocitos de estos pacientes tienen la misma resistencia y supervivencia que los de una persona normal, entonces también podrían ser usados en la elaboración de reactivos biológicos, (por ejemplo células panel), o incluso ser transfundidos como se hace con los donadores remunerados, los cuales se conoce no son el prototipo de individuos normales.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo queda abierto a ulteriores investigaciones para la posible utilización de la sangre obtenida de estos pacientes.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adamson, J.W. y Finch, C.A.: *Erythropoietin and the polycythemia*. - *Am. N.Y. Acad. Sci.*, 149:560, 1968.
- 2.- Altschule, M.D., Volk, M.C. y Henstell, H.: *Cardiac and respiratory function at rest in patients with uncomplicated polycythemia vera*. *Am. J.M. Sc.*, 200:478, 1940.
- 3.- Bachner, R. R., Nathan, D. G.: *Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease*. *N. Engl. J. Med.*, 278:981-986; 1968.
- 4.- Bellanti, J.A.: *Inmunología. Nva. Editorial Interamericana. 2a ed.*, México, 1981. 649-650.
- 5.- Bloom, B. R., Glade, P. R.: *In vitro methods in cell-mediated immunity*. Academic Press, 1970.
- 6.- Burchell, H.B., Clagett, O. T.: *The clinical syndrome associated with pulmonary arteriovenous fistulas, including a case report of a surgical cure*. *Am. Heart J.*, 34:151, 1968.
- 7.- Cagan, R. H. y Kavnovsky, M. L.: *Enzymatic bases of the respiratory stimulation during phagocytosis*. *Nature*. 204:255, 1964.
- 8.- Cambell, R.C.: *Statistics for biologists*. Cambridge at the University Press. 1a ed., England. 1967. 229-230.
- 9.- Cantarrow, A. y Schepartz, R.: *Biochemistry*. N.B. Saunders Company. -- 4th ed. Philadelphia. 1967.
- 10.- Davidsohn, I., Henry, J.B.: *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. - Salvat Editores S.A.. 2a. ed.. España, 1979. 249-250, 261.
- 11.- Edwards, P. A., Gold, G.R.: *Dependence of the rhythm of hepatic D₂OH D-CH₂ glutary CoA on ribonucleic acid synthesis. A possible second site of inhibition by cholesterol*. *J. Biological Chemistry*, 249:2891, 1974.
- 12.- Erslev, A.: *Humoral regulation of red cell production*. *Blood*, 8:349,- 1953.
- 13.- Ferreras, V.P.: *Medicina interna*. Ed. Marín S.A.. 1a. ed.. México, - 1978. Tomo I (666), tomo II (331-338).

- 14.-Favour, C.B.: *Antigen-antibody reactions in tissue culture. Immunological methods.* Blackwell Scientific Publ.. Oxford, 1964. 195-223.
- 15.-Fudenberg, H.H., Stites, D.D., Caldwell, D.L. and Wells, J.V.: *Manual de Inmunología clínica.* Ed. El manual moderno. 2a. ed.. México, 1980. 147-159, 434-436, 464.
- 16.-Gordon, A.S., Cooper, G.W. y Zanjani, E.D.: *The kidney and erythropoiesis.* Semin. Hemat., 4:337, 1967.
- 17.-Grant, W.C. y Root, W.S.: *Fundamental stimulus for erythropoiesis.* - *Physiol. Rev.*, 32:449, 1952.
- 18.-Gurney, C.W., Goldwasser, E. y Pan, C.: *Studies on erythropoiesis. Erythropoietin in human plasma.* J. Lab. and Clin. Med., 50:534, 1957.
- 19.-Guyton, A.C.: *Tratado de fisiología médica.* Ed. Interamericana S.A.. 5a. ed.. México, 1977. 64, 572-583.
- 20.-Harris, R.: *Mobilization of defensive cells in inflammatory tissue.* -- *Bact. Rev.* 24:3, 1960.
- 21.-Hillman, R.S., Finch, C.A. Boggs, D.R., Winkelstein, A., Horcker, L.A.: *Manual de hematología.* Ed. El Manual moderno S.A. México, 1977. 70-78.
- 22.-Holmes, B., Page, A.R., Good, R.A.: *studies on the metabolic activity of leucocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function.* J. Clin. Invest. 16:1422, 1967.
- 23.-Huff, R.L., Elmlinger, P.J., Garcia, J.F., Oda, J.H., Cockerrell, M.C. y Lawrence, J.H.: *Ferrokinetics in normal persons and in patients having various erythropoietic disorders.* J. Clin. Invest., 30:1512, 1951.
- 24.-Humphrey, J.J. y White, R.G.: *Immunology for students of medicine.* - Blackwell Scientific Pub.. Third ed.. England, 1970. 7-9.
- 25.-Kaung, D.T. y Peterson, R.E.: *"Relative polycythemia" or "pseudo-polycythemia"* . Arch. Int. Med., 110:456, 1962.
- 26.-Lam, M.E. y Stetson, Jr. CH. A.: *Inflamation clinical immunology.* Academic Press. 1972. 139-155.
- 27.-Lawrence, J.H. y Berlin, N.I.: *Relative polycythemia - polycythemia of stress.* Yale J. Biol. and Med., 24: 498, 1952.
- 28.-Leavell, S.B. y Thorup, A.O. : *Hematología clínica.* Interamericana S. A.. 3a. ed., México, 1973. 284-304.

- 29.-Lynch, M.J., Rafael, S.S., Mellor, L.D., Spore P.D. y Inwood, M.J.: -
Métodos de laboratorio. Ed. Interamericana. 2a ed., México, 1972. -
315-316 y 751.
- 30.-Miescher, P.A. y Muller-Eberhard, H.J.: Tratado de inmunología. Ed.
Científico-Médica. Barcelona, 1971. 45-46.
- 31.-Penington, D.G.: The relation of erythropoietin to polycytemia. *Proc.*
Roy. Soc. Med., 59:1091, 1966.
- 32.-Platt, W.R.: Color atlas and textbook of hematology. J.B. Lippincott
Company. Second ed. U.S.A., 1979. 480-484.
- 33.-Reissmann, K.R.: Studies on the mechanism of erythropoietic stimula-
tion in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*, 5:372, 1950.
- 34.-Reyes, R.M.: Valor de la prueba nitroazul de tetrazolio en el estu-
dio de la fagocitosis. *Alergia*, 22: 47-57, 1975.
- 35.-Sbarra, A.J., Jacobs, A., Straus, R.R., Paul, B.B., Mitchell, Jr.G.
N.: The biochemical and antimicrobial activities of phagocytizing -
cells. *Am. J. Clin. Nutrition*. 24:272-281, 1971.
- 36.-Selzer, A.: Chronic cyanosis. *Am. J. Med.*, 10:334, 1951.
- 37.-Williams, J.W., Beutler, E., Erslev, A.J. y Rundles, R.W.: Hematolo-
gy. Mc Graw-Hill Book Company. Second ed. U.S.A., 1977. 641-646.
- 38.-Manual de prácticas de Inmunología Básica y Clínica; varios autores;
ENCB-IPN, Sección de graduados, Depto. de Inmunología: México. págs.
1, 3-5, 75 y 92-93; 1980.
- 39.-Scheffler, W.C.: Bioestadística. Ed. Fondo Educativo Interamericano--
S.A.. U.S.A. 122-130. 1981.
- 40.-Daniel, W.W.: Bioestadística. Ed. Linusa S.A.. México., 193-195, 1984.
- 41.-Watly, B.M.: Química Analítica. cap. 25. Ed. Alhambra Mexicana S.A..
México, 1982.