870127
27
2ej

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD OPSONICA Y CITOTOXICA DE LOS PREPARADOS DE GAMMAGLOBULINAS COMERCIALES, FRENTE A MICROORGANISMOS PATOGENOS.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JORGE EDUARDO RUIZ PALOMERA

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García

GUADALAJARA, JALISCO **1986**

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

	PAG
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- GENERALIDADES.....	4
2.1. Gammaglobulinas	4
2.1.1 Origen.....	4
2.1.2 Actividad.....	7
2.1.2.1 Estructura de Inmunoglobulinas.....	8
2.1.2.2 Monografía de Inmunoglobulinas.....	10
2.1.2.3 Sitios activos de las moléculas de Inmunoglobulinas.....	13
2.1.2.4 Sitio de combinación de las Inmunoglobulinas....	15
2.1.2.5 Otros sitios efectores de las Inmunoglobulinas..	16
2.1.2.6 Receptores en las diferentes células.....	17
2.2 Mecanismo de Fagocitosis.....	18
2.3 Sistema Complemento.....	21
2.3.1 Generalidades.....	21
2.3.2 Citólisis mediada por Complemento	25
2.4 Utilidad terapéutica de las Gammaglobulinas.....	25

PAG.

3.- METODOLOGIA..... 28

3.1 Selección de las muestras..... 28

3.1.1 Tratamiento de las muestras..... 28

3.2 Métodos..... 30

3.2.1 Actividad Bactericida..... 30

3.2.2 Actividad Opsónica (ensayo micro biológico)..... 30

3.2.3 Actividad Opsónica (ensayo morfo lógico)..... 31

3.2.4 Actividad Citotóxica mediada por Complemento..... 32

3.3 Microroganismos utilizados en las dife rentes pruebas..... 33

3.4 Diagrama de flujo..... 35

4.- RESULTADOS..... 36

5.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES..... 43

6.- BIBLIOGRAFIA..... 46

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

En el sistema inmunológico del huésped humano, existen dos tipos de respuesta inmune; la específica y la -- inespecífica. Los anticuerpos juegan un papel muy espe-- cial en la respuesta inmune específica; son producidos - cuando una sustancia extraña estimula al aparato inmuno- lógico y tienen características bioquímicas que los ha-- cen específicos sobre esa sustancia.

Una función biológica importante de los anticuerpos es la de Opsonización de Microorganismos, los cuales son requeridos para su reconocimiento por los receptores Fc- y C3b en la membrana de la célula y así, optimizar la ingestión de los microorganismos por los fagocitos (Sistema Opsónico Termoestable). También el complemento (Sistema Opsónico Termolábil) en combinación con los anticuerpos fomentan una mejor opzonización y en algunos casos,- a un mecanismo de citotoxicidad.

Los pacientes que sufren una enfermedad que cursa - con sistema inmune deprimido, como Hipogammaglobulinemia o Agammaglobulinemia, o a un defecto humoral en el cual- la capacidad opsónica del suero esté disminuida, ya sea- congénita o adquirida, sufren frecuentemente de infecció

nes por microorganismos patógenos y oportunistas.

Para reducir la incidencia de estas infecciones, o- simplemente para reforzar el sistema inmunológico del -- cuerpo, se utilizan como terapia preparados de Inmunoglobulinas conocidas como Gammaglobulinas o Globulina Sérica Inmune, estas durante la elaboración sufren cambios - en su estructura, tal vez por los diferentes métodos de- extracción. El control de calidad de las Gammaglobulinas se basa en exámenes establecidos, según lo concerniente- a biológicos en The Code of Federal Regulations, title - 21, parts 640.100 - 640.104, April 1, 1980, Bureau of -- Biologies, Food and Drug Administration. Estos exámenes, comprenden en general, control de pH, turbidez, termoestabilidad, esterilidad y titulación de anticuerpos. Es-- tos exámenes no reproducen in vitro, las condiciones fisiológicas e inmunológicas que se presentan in vivo, lo- más cercanamente posible. Además, hay que agregar, que - para las casas comerciales queda fuera de su alcance control ar el manejo adecuado que requiere el uso y conservación de este producto.

En el presente estudio, se trata de reproducir las- condiciones in vivo, lo más cercanamente posible in vi-- tro, en cuanto a temperatura, pH, concentración de Inmu-

noglobulinas y CH_{50}; tratando de probar la efectividad - de las preparaciones de Gammaglobulinas como agentes opsonizantes. (1,3,10).

G E N E R A L I D A D E S

2.1 Gammaglobulinas.

2.1.1. Origen.

Las proteínas en el ser humano y en otros mamíferos son de dos tipos: proteínas Hísticas y Hemáticas. Las -- proteínas hemáticas pueden separarse a su vez, en proteínas de eritrocitos, hemoglobina y proteinas del plasma;- estas últimas, al ser fraccionadas por electroforesis se dividen en: Albumina, globulina α_1, globulina α_2, globulina β, Fibrinógeno, γ globulina.

La Gammaglobulina, no es un tipo único de proteína, sino una familia a la que se denomina Inmunoglobulinas, y en- éstas se incluyen todas las globulinas con actividad de- anticuerpo. En el hombre se han identificado hasta el -- presente las IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Las Gammaglobuli-- nas son producidas por células especializadas proceden-- tes de Linfocitos.

Todos los Linfocitos provienen de la médula ósea, - donde se producen por divisiones de las células madres. De allí migran hacia uno de los órganos centrales, Timo- o Tejido equivalente a la Bolsa de Fabricio; allí madu-- ran y adquieren características que los convierten en -- Linfocitos T y B, respectivamente. Ambos al tener contac to con el antígeno o por algún otro estímulo retroceden-

un paso en su evolución convirtiéndose en células blásti
cas que tienen un metabolismo más acelerado, llamadas -- Linfoblastos.

Los Linfoblastos T se dividen produciendo células - productoras de factores que desencadenan reacciones in-- flamatorias y lesivas que finalmente producirán diversos fenómenos debidos a células.
Estos factores se llaman Linfocinas.
Los Linfocitos T, por lo tanto, efectúan funciones de in munidad por células. Los Linfoblastos B, por su parte se dividen hasta producir células plasmáticas o Plasmocitos, que son células de alta producción de proteínas especia- lizadas con actividad de anticuerpo (Inmunoglobulinas). Por lo tanto, las funciones que efectúan los Linfocitos- B son de inmunidad humoral o mediada por anticuerpos.

La globulina sérica inmune (humana), también llama- da "Gammaglobulina", es un producto que proviene de la - sangre, plasma o suero de donadores humanos, y contiene- la mayor parte de los anticuerpos de la sangre completa. Los preparados de Gammaglobulinas contienen casi 25 ve-- ces más anticuerpos que la sangre.
La preparación de las Gammaglobulinas o globulina sérica inmune, según lo referido en "the U.S.P. XX, 1980" y en-

"The Code of Federal Regulations, title 21, parts 640. 100-640.104, April, 19 80, Bureau of Biologies, Food and Drug Administration; debe seguir los siguientes linea- - mientos:

- Solución estéril, libre de pirógenos de globulinas, la cual contiene anticuerpos normalmente presentes en la -- sangre humana de adultos.
- Es preparada de un fondo común, de cantidades iguales- aproximadamente de plasma, suero, o de placenta; de no - menos de 1000 donadores.
- Debe de contener, no menos de 15 grs. y no más de 18-- grs. por 100 ml, no menos del 90% debe ser Gammaglobuli- na. (normal - 165 mg/ml).
- Debe de contener 0.3M de glicina como agente estabili- zante y contener un preservativo apropiado.
- Debe satisfacer los requerimientos para la prueba de - termoestabilidad y de pH. (no debe de haber gelación; pH 6.8± 0.4)
- Debe de preservarse a temperatura de 2-8°C.
- La fecha de caducidad no debe de exceder más de 3 años después de la fecha de elaboración del producto. Almace- naje en frío (5°C, 3 años).

Estos preparados contienen fundamentalmente Inmuno- globulinas IgG con cantidades menores de IgM e IgA.

En relación con el suero completo, los preparados de - - Gammaglobulina tienen las siguientes ventajas:

- No contienen virus de la hepatitis sérica; están con-- centrados, lo que permite aplicar gran cantidad de anti- cuerpos en un volumen pequeño, y son estables, para un - almacenamiento prolongado.

Las desventajas de estos preparados son: tienden a for-- mar grandes agregados (biopolímeros 11S); el uso prolon- gado de este producto puede provocar isoinmunización; -- también, pueden provocar reacciones anafilácticas. (13,- 14, 17,20,23).

2.1.2 Actividad.

En conjunto, la actividad de las Inmunoglobulinas,- es la de anticuerpo. Los anticuerpos reaccionan específi camente con los antígenos que les han dado origen; in vi tro, esto se puede presentar como un fenómeno visible -- que puede ser precipitación, aglutinación, bacteriolosis citólisis, etc, y por consecuencia de esa reacción se -- produce la neutralización de los antígenos. Esta diversi ficación de formas para reaccionar ante un antígeno la - puede dar un anticuerpo, pero no necesariamente todas. (13,20).

2.1.2.1 Estructura de Inmunoglobulinas.

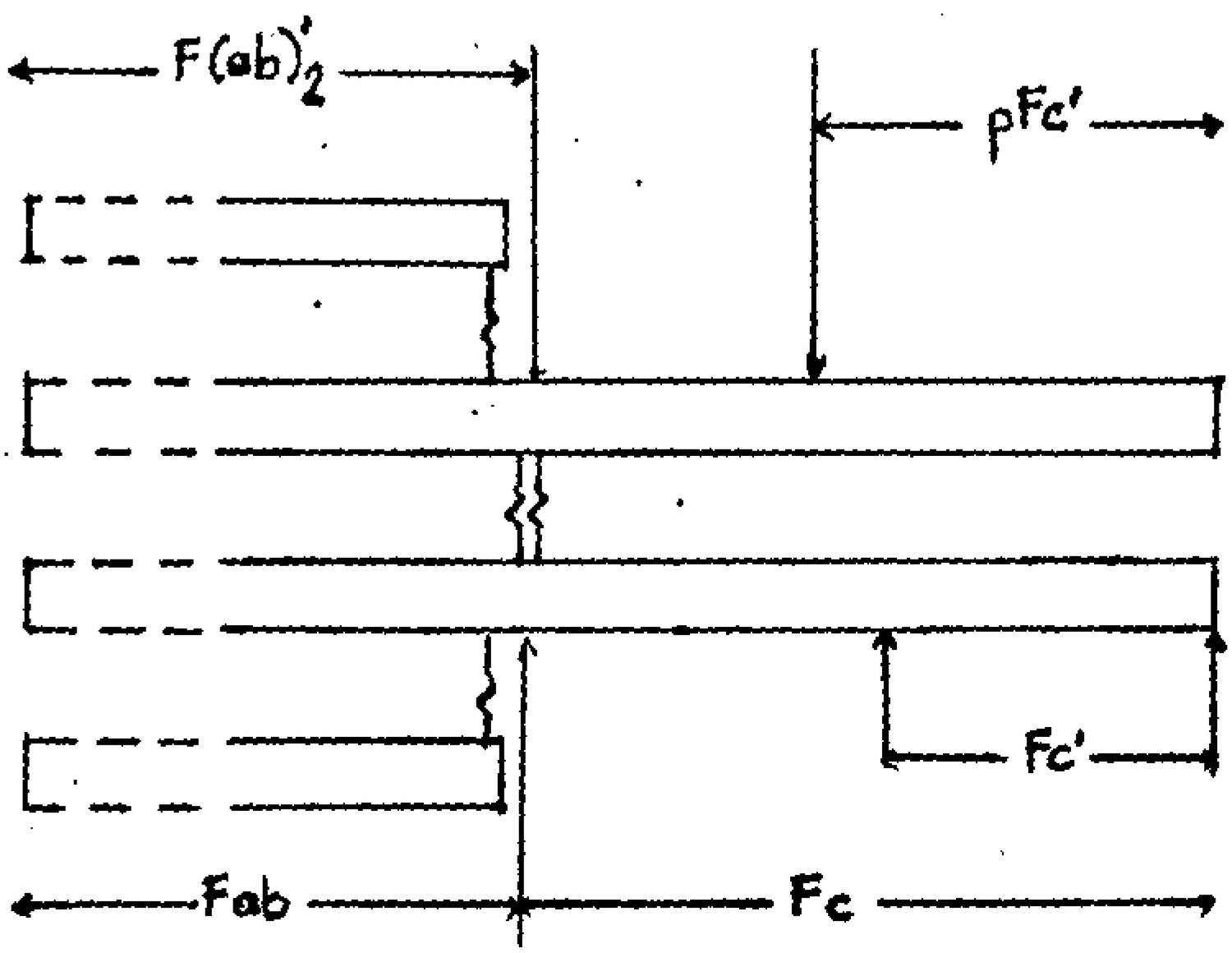
La Inmunoglobulina más estudiada es la IgG; en ella se han basado los estudios para discernir las estructu-- ras de las demás Inmunoglobulinas.

En general la estructura química de una molécula de Inmunoglobulina está formada por cuatro cadenas polipetídicas unidas por enlaces disulfuro. Dos de estas cadenas se llaman cadenas ligeras (p.m. = 22000). Las otras dos, constituyen las cadenas pesadas (p.m. 55000). Cada molécula de Inmunoglobulina posee dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. En cada una de las- clases de Inmunoglobulinas, se encuentra una cadena pesada de un tipo químico especial; esta es responsable de - las diferencias antigénicas que hay de una clase a otra; y de las diferencias biológicas que separan a las distintas clases; se designan por letras griegas equivalentes- al nombre de la clase de Inmunoglobulina. En todas las-- clases de Inmunoglobulinas se encuentran dos tipos diferentes de cadenas ligeras llamadas kappa (κ) y Lambda -- (λ). En cada una de las cinco clases de Inmunoglobuli-- nas puede encontrarse ambos tipos de cadenas ligeras.

Al ser tratada la Inmunoglobulina con una ezima llamada papaína (papaína cristalizada, activada con cistei-

na y posteriormente cromatografiada en columna de resi-- nas celulósicas de intercambio iónico) se obtienen dos - fragmentos, uno de movilidad electroforética lenta llamado Fab; en este se encuentra localizada la actividad de- anticuerpo, factores genéticos y determinantes antigéni- cos comunes a otras Inmunoglobulinas; en tanto que el -- otro fragmento, llamado Fc de movilidad electroforética- rápida, posee determinantes antigénicos propios de la molécula, contiene la mayor proporción de carbohidratos, - es el que determina la fijación del complemento, el que- determina la capacidad para atravesar la placenta.

Por medio de otras enzimas, o variando los tiempos- de contacto con éstas, se obtienen algunos fragmentos diferentes llamados $F(ab)_2$, pFc' y fc'. (13,14,20)



2.1.2.2 Monografía de Inmunoglobulinas.

IgG= 7S γ-globulina, γ_2-globulina.

vida media= 21 días, P.M.= 140,000 y 160,000 daltons.

Es la Inmunoglobulina de menor contenido en carbohidra-- tos (2.6%) Es la más abundante de todas las Inmunoglobulinas, su concentración es alta, tanto intra como extravascular. Frente al antígeno específico se comporta como anticuerpo bivalente y tiene capacidad para fijar el complemento, cuando forma parte del complejo antígeno-anticuerpo, de fijarse a piel heteróloga, de atravesar la -- placenta y de ser opsónica por sí sola, o junto con el - componente C3b del complemento. Sólo moléculas intactas- de IgG puede servir como opsoninas, no así los fragmen-- tos de éstas.

Se fija a la proteína A de Staphylococcus aureus, - se fija también a Polimorfonucleares (PMN's). Esta clase de Inmunoglobulinas se encarga de la inmunidad contra muchos agentes infecciosos que se diseminan por vía hematógena, entre ellos bacterias, virus, parásitos y ciertos- hongos. Además, desempeñan funciones de anticuerpos en-- los tejidos.

Existen receptores para la IgG en Monocitos y Linfocitos.

Esta Inmunoglobulina es monomérica. Tiene cuatro - Subtipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. (13,20)

IgM= 19S γ -globulina, γ_1M -globulina, γ_2 M globulina, macroglobulina. vida media = cinco días, P.M. = 970,000. Es la Inmunoglobulina más pesada (o de mayor tamaño) de- las demás Inmunoglobulinas. Su contenido en carbohidra-- tos es alrededor del 12%. Su concentración en suero normal es escasa.

Fija el complemento y promueve la opsonización, solo por medio del componente C3b del complemento.
La capacidad de combinación de esta macroglobulina es mayor con antígenos particulados como bacterias y glóbulos rojos provocando aglutinación, que con antígenos solu- - bles. No atraviesa la placenta y recientemente se ha demostrado que fija la proteina A del S. aureus.

Esta Inmunoglobulina es pentamérica (cinco unidades) en conjunto, y es por tanto pentavalente; pero sola es bivalente. Tiene dos subtipos: IgM1, IgM2, (13,14,20)

IgA= 7-13S γ globulina, β2 A globulina, γ1 A globulina.
vida media = seis dias.
El contenido en carbohidratos es aproximadamente 7-11%.

Es la segunda en abundancia. Su concentración en suero - es baja y relativamente alta en otros fluidos tales como saliva, lágrimas, secreción intestinal, fluido prostático y calostro. A esta Inmunoglobulina se le conoce como- IgA secretoria e IgA sérica.

IgA sérica 7S; P.M.= 160,000. Fija el complemento - por vía alterna. Fija la proteína A del S. aureus. Tiene dos subtipos: IgA1, IgA2.

IgA secretoria 11S; P.M.= 385,000. Es sintetizada - por las células plasmáticas ubicadas en el subepitelio,- solo una pequeña parte pasa a circulación general, y el- resto, durante el transporte a través del epitelio glandular o de la superficie intersticial. Esta inmunoglobulina, se asocia a un fragmento protéico llamado "compo-- nente secretor", que protege a la molécula de las enzi-- mas proteolíticas que están presentes en las diferentes- secreciones en las funciones inmunitarias del individuo.

Su papel fundamental en las funciones Inmunitarias- del individuo corresponden al sistema secretor externo. (inmunidad local de mucosas contra bacterias y virus).

Ambas Inmunoglobulinas (sérica y secretoria), atra- viesan la placenta y se fijan a PMN. Se puede presentar-

como monómero, dímero y trímero.

IgD= 7S; P.M.= 184,000; vida media = tres dias.
Constituye el 1% de las inmunoglobulinas totales. No posee determinantes específicos de las IgG, IgM, IgA, e -- IgE, pero en cambio posee determinantes específicos propios. Es poco lo que se sabe en cuanto a su importancia- fisiológica. Se le ha encontrado como anticuerpos anti-- penicilina, antiinsulina y antitoxina diftérica.
No fija el complemento, no fija la proteína A de S.au- - reus. No se fija a PMN. Su contenido en carbohidratos es aproximadamente 9-14%. (13,14,20).

IgE= 8S; P.M.= 188,000; vida media = dos días.
Su contenido en carbohidratos es aproximadamente 12%.
Esta inmunoglobulina es muy escasa en suero. Es responsable de la alergia atópica. Se fija a piel homóloga, pero no a piel heteróloga. Es el responsable de la anafilaxia activa y pasiva homóloga en el hombre. No fija el complemento, no fija la proteína A de S. aureus y no se fija-- a los PMN. (13,14,20).

2.1.2.3 Sitios activos de las moléculas de Inmunoglobulinas.

Existe cierta homología entre los fragmentos que --

constituyen las cadenas L y H por la formación de puentes disulfuro que originan bucles de aproximadamente 60-residuos (o aminoácidos) cada uno. Se ha propuesto la división de la molécula de Inmunoglobulina en dominios, -- identificados como V_L y V_H (zonas variables) y C_L,C_H1,-- C_H2,C_H3 (zonas constantes). Existe una zona llamada de - la Bisagra, próxima a los puentes disulfuro intercadenas H-H, que no muestra homología con ninguna otra parte de- la cadena peptídica H. Esta zona forma una cierta configuración estérica que condiciona la flexibilidad de los- fragmentos Fab.

Se considera que cada dominio tiene una estructura- tridimensional similar y que origina un sitio activo relacionado con diferentes funciones de la molécula. El dominio variable participa en la formación del sitio de -- combinación del anticuerpo relacionado con la especificidad, mientras que los dominios ubicados en las zonas - - constantes son efectores de funciones, algunas de las -- cuales sólo se expresan después de la interacción antígeno-anticuerpo. En las IgM e IgE existe un dominio C_H4 como consecuencia del tamaño de las cadenas H de las Inmunoglobulinas). (14,20).

2.1.2.4 Sitio de combinación de las Inmunoglobulinas.

Los fragmentos Fab en las Inmunoglobulinas, son los portadores de la actividad de anticuerpo. El fragmento - Fc es el responsable de las otras propiedades biológicas concernientes a la molécula entera.

De acuerdo a los resultados de algunos experimentos se resumen aquí algunos conceptos relacionados con la actividad de anticuerpo.

1.- La ruptura de los puentes S-S de la molécula de Inmunoglobulina, por reducción y alquilación, no modifican - su actividad de anticuerpo.

2.- La especificidad de un anticuerpo está relacionada - con su estructura secuencial; ésta determina qué fuerzas termodinámicas participarán en la molécula para adquirir una configuración energéticamente estable, lo que le permitirá cumplir con su función específica.

3.- La especificidad está localizada en una determinada- secuencia de las cadenas H, la que es complementada por- las cadenas L, dándole así estabilidad al sitio de combinación.

4.- Existen dudas sobre la uniespecificidad del sitio de combinación del anticuerpo; algunos estudios demuestran- que en la molécula en el sitio de combinación, existen -

subsitios para más de un ligando. (13,14,20).

2.1.2.5 Otros sitios efectores de las Inmunoglobulinas.

Además de los dominios V_H y V_L que forman el sitio-de combinación de la molécula de anticuerpo, existen en-los fragmentos constantes de las cadenas H, otros domi-nios, que son efectores de funciones, algunas de las cuales se efectúan de forma directa como, el control del ciclo catabólico de la molécula de la que forma parte, de-atravesar membranas biológicamente activas, de fijarse a la proteína A de Staphylococcus aureus, etc. Otras solo-se efectúan después de la unión antígeno-anticuerpo, como por ejemplo, la activación del sistema de complemento a través de la vía clásica o de la vía alterna. Algunas-más, como la fijación a macrófagos, a linfocitos B, a -- mastocitos, etc., por ambas formas.

La mayoría de las funciones están localizadas en el fragmento Fc, en los dominios C_H2, C_H3 para IgG e IgA, - y en los dominios C_H2, C_H3 y C_H4 para la IgM y IgE. A diferencia del sitio de combinación de los anticuerpos de-las fracciones variables, los puentes S-S intercatena- - rios localizados en la región de la bisagra y que forman parte del fragmento Fc, tienen importancia en cuanto al-

mantenimiento de la actividad de este fragmento; y a que su ruptura disminuye notablemente la actividad del Fc.

Dos Inmunoglobulinas diferentes pueden tener propiedades biológicas similares, esto no significa que los sitios implicados sean los mismos. Se fijan a un mismo receptor pero con distinta afinidad porque no son iguales- sus estructuras. (14,20).

2.1.2.6 Receptores en las diferentes células.

Existen en la superficie de la membrana de las células con actividad de Fagocitosis (fagocitos mononucleares, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, y en menor grado los eosinófilos), receptores para la fracción- Fc de las Inmunoglobulinas y receptores para el componente C_3b del complemento. Estas fracciones se unen a los - receptores, solo cuando la Inmunoglobulina está formando un complejo con el antígeno. En el caso del componente - C_3b, éste debe estar unido a un anticuerpo IgG o IgM ó,- unido a un complejo antígeno-anticuerpo. Este tipo de -- uniones a los receptores favorece y amplifica el mecanismo de Fagocitosis.

También existen receptores para Fc y para C, los --

cuales se encuentran en la superficie de la membrana de- Linfocitos. En los Linfocitos B se encuentran receptores para complejos Ag-Ac-C (antígeno-anticuerpo-complemento).

Para detectar este tipo de receptores, se usan pruebas llamadas "de formación de rosetas".

Otro tipo de receptores como Ig-sup, antígeno Thy-1 Lyt, se les llaman marcadores porque sirven para diferenciar por pruebas inmunohistoquímicas, el tipo de Linfocito, ya sea B ó T. (12,13,14,20).

2.2 Mecanismo de la fagocitosis.

Cuando una bacteria penetra al organismo, es fagocitada rápidamente por los macrocitos (entre los cuales se encuentran los histiocitos f. y m. y los monocitos) y -- por los microcitos (PMN, y algunos eosinófilos). Este mecanismo de limpieza es muy frecuente, cuando se trata de partículas inertes o de bacterias no patógenas y es poco frecuente en el caso de bacterias patógenas. En este último caso, la fagocitosis se ve potenciada, cuando sobre el microorganismo se han fijado sus anticuerpos específicos (inmunopsoninas o bacteriotropinas termoestables) o- sustancias termolábiles (opsoninas) presentes en los sueros normales.

La fagocitosis se ejerce no solo cuando el microorganismo llega al tejido celular subcutáneo, sino también cuando hay una invasión del torrente circulatorio. En este proceso intervienen, además de los PMN sanguíneos, -- las células histoides libres y aún las fijas localizadas en el hígado, bazo, sinusoides venosos, ganglios linfáticos, etc.

Los microorganismos fagocitados son en gran parte - destruidos por acción enzimática y metabolizados como material extraño.

El mecanismo de fagocitosis comprende varias etapas

1.- Fijacion de los fagocitos al endotelio de los capilares del area lesionada, los cuales atraviesan por diapodisis las paredes del vaso y se acumulan en la zona de inflamación. Esto ocurre con los fagocitos mononucleados y con los polimorfonucleares neutrófilos. Ciertas sustancias químicas presentes en la zona ejercen una acción -- quimiotáctica sobre los neutrófilos; entre ellas están - algunos péptidos activos derivados de componentes del -- sistema complemento como C3a y C5a o complejos provenientes de su activación (C567).

2.- Al estar en contacto el microorganismo o agente invasor, con los diferentes sistemas inmunocompetentes (Linfocitos T y B, células helper, células efectoras, etc.).

se efectúa la producción de Inmunoglobulinas específicas las cuales se fijarán por su porción Fab al antígeno de- superficie celular, del microorganismo; dejando libre su porción Fc, formando así, complejos antígeno-anticuerpo- o antígeno-anticuerpo-complemento.

3.- Fijación de los complejos antígeno-anticuerpo o antígeno-anticuerpo-complemento (este último, en caso de la- intervención del sistema complemento), a los receptores- para Fc o para el componente C3b del sistema complemento, que se encuentra en la superficie de las membranas de -- las diferentes células fagocíticas.

4.- El pasaje de las partículas al citoplasma de los fagocitos (ingestión), se inicia cuando el fagocito forma- una invaginación de la membrana citoplasmática, que en-- golfa la partícula en su fase inicial y la rodea final-- mente, originando un fagosoma. Luego, los gránulos lisosomales que se encuentran en la célula, se unen al fagosoma y forman un fagolisosoma; durante este proceso, las enzimas de los gránulos lisosómicos pasan al interior -- del fagolisosoma y se inician los procesos de digestión- del material fagocitado. Se presentan aquí, cambios en - el metabolismo celular caracterizados por mayor consumo- de oxígeno y glucosa, e hiperproducción de agua oxigenada.

La muerte de los microorganismos, en especial bacterias, parece deberse a un mecanismo de halogenación, el- que requiere agua oxigenada y una enzima, llamada mieloperoxidasa.

Dentro del mecanismo de fagocitosis, se incluye el- de Opsoninofagocitosis, ya que este último equivale; a- la fagocitosis de los microorganismos con ayuda de opsoninas; sustancias que hacen que el microorganismo sea-- más apto para la fagocitosis, por ejemplo: anticuerpos,- componentes del complemento, etc. (2,4,5,6,7,8,11,13,14, 16,18,20,21,22,24).

2.3 Sistema Complemento.

2.3.1 Generalidades.

Se define como complejo protéico polimolecular, con acciones mutuas, constituído por varias sustancias, algunas precedidas de precursores, que se encuentran en el - plasma sanguíneo de los vertebrados y que participa en - distintos tipos de reacciones inmunológicas. La mayoría- de las definiciones del complemento son hechas en base a su actividad citolítica y una de las más claras es la -- propuesta por Mayer, quien lo define como "Un sistema --

reaccional citocida que es activado por complejos antíge no-anticuerpo o agregados de gammaglobulinas o algunos - otros materiales".

Además de las reacciones citolíticas en que partici pa, cabe nombrar los fenómenos de inmunoadherencia, neutralización de virus, faqocitosis y reacciones de hipersensibilidad, etc.

Es un sistema de activación en cascada y está constituído por no menos de nueve componentes y algunos precursores e inhibidores. Los componentes clásicos, que -- son las proteínas plasmáticas responsables de la lísis - de las células que tienen anticuerpo dirigido a los antígenos de superficie celular, están simbolizados con un C mayúscula y un número que designa el componente, por - - ejemplo, C1, C4, C2, C3 y C5 hasta C9. Los factores de - la vía alterna, que llevan a una secuencia terminal líti ca sin demanda de anticuerpo, se designan con una letra- mayúscula, por ejemplo, B, D y P en reconocimiento de su naturaleza diferente y de su descubrimiento posterior al de los componentes clásicos. Una barra sobre una letra o número, indica la forma enzimáticamente activa de la proteína y los productos de fragmentación llevan letras minúsculas como sufijos, por ejemplo, C3a y C3b, siendo el

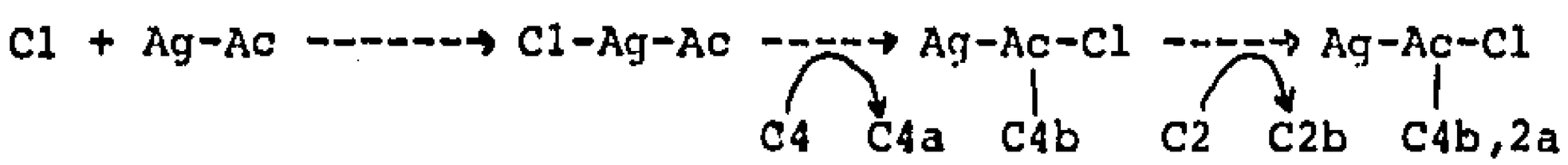
sufijo "b" generalmente empleado para denotar el más - - grande de los dos fragmentos.

Los componentes de la vía clásica del sistema complemento son:

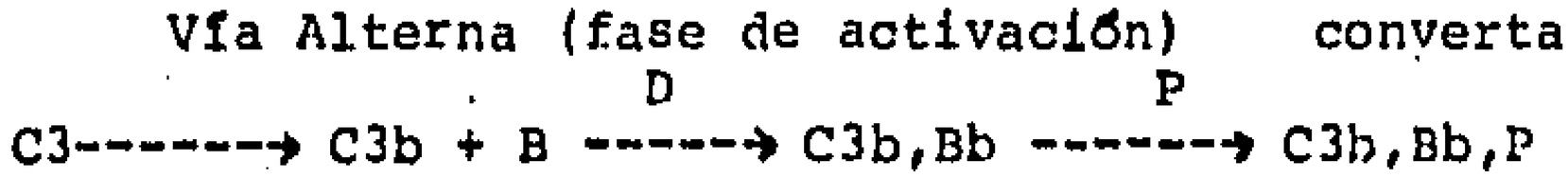
C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9. Los componentes de la vía alterna son: P (properdina), B, D, C3 - activador, C3, C3b.

Las proteínas que regulan el sistema complemento, son: C1INH, I (C3INA). H (beta-1-H_, S-proteína, C4bp. Por lo complejo y extenso de sus mecanismos de activación, tanto por la vía clásica como por la vía alterna; sólo se - esquematizará en forma breve:

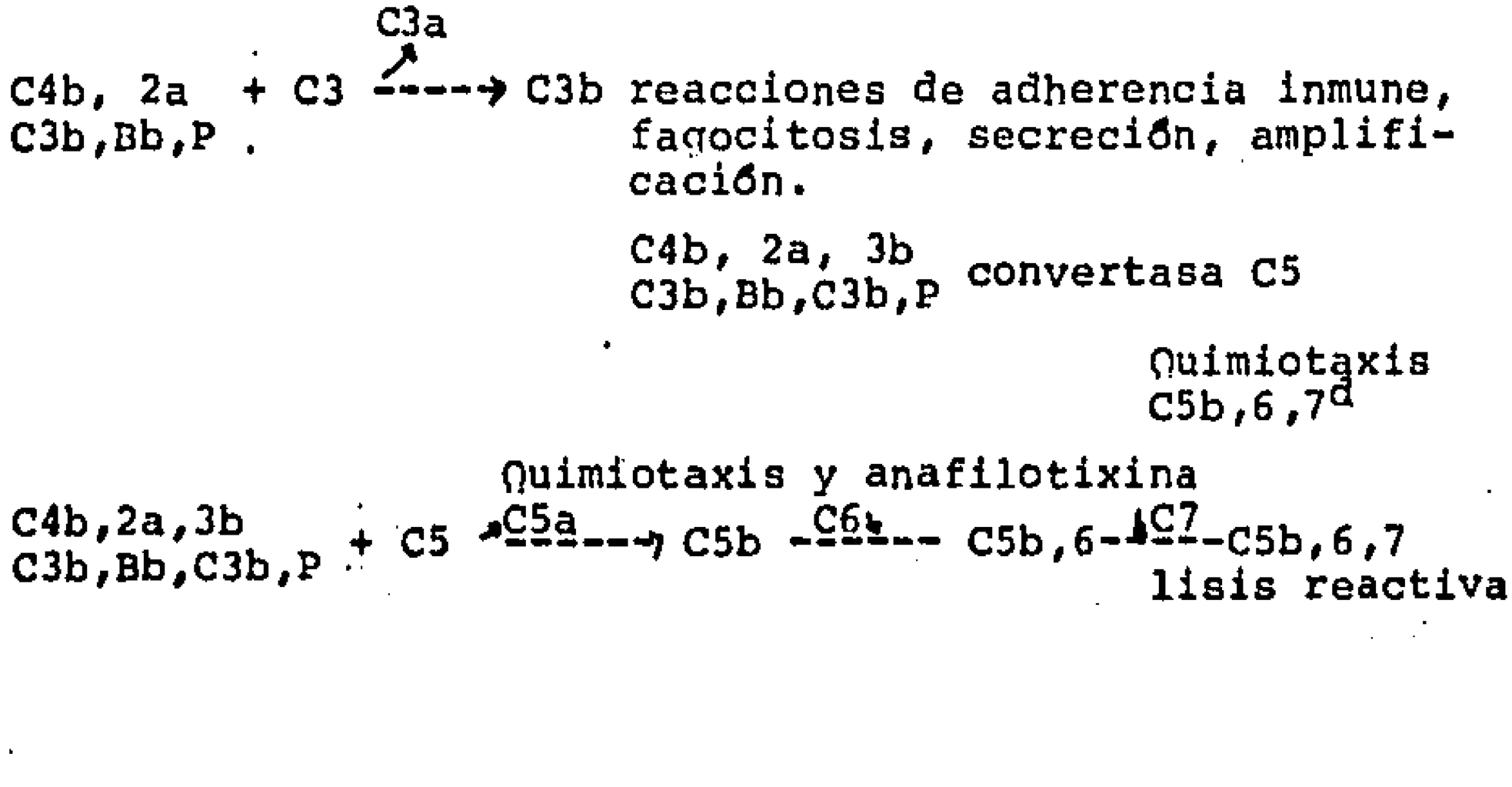
Vía Clásica (fase de activación)



Vía Alterna (fase de activación) convertasa C3



Fase común efectora quimiotaxis y anafilotoxina



C5b,6,7 --C8--→C5b-8 --C9--→C5b-9 Lesión total de la membrana.

Lesión parcial de la membrana

Los fragmentos y los complejos biológicamente activos se generan al clivar las diferentes convertasas a sus sustratos, y poseen diversas funciones biológicas como quimiotaxis, anafilotoxina, lisis, reacciones de adherencia inmune, alteraciones de la permeabilidad vascular.

Existen diversas analogías en ambas vías, las cuales son:

- Una fase de activación (en la vía clásica, depende de la interacción antígeno-anticuerpo; en la vía alterna, depende del contacto con un receptor de superficie del antígeno para la producción aumentada de C3b para la activación de la convertasa C3.).
- Una convertasa C3 y C5
- Varios poseen reguladores e inhibidores que controlan su acción.
- Necesitan Mg^{+2} y Ca^{+2} para sus diversas fases.
- Ambas vías, convergen en una misma fase efectora del Sistema Complemento.

Como se indicó anteriormente, existen en las células fagocíticas, receptores para C3b, los cuales ayudan-

para la combinación con la partícula antigénica, mas no-
la fagocitosis de las partículas que estén unidas a C3b.
Para algunas células fagocíticas puede resultar perjudi-
cial, el hecho de poseer, sin estar ligadas a una partí-
cula antigénica, IgG y C3b en su superficie, lo cual de-
sencadenaría la liberación de enzimas lisosomales. (13,-
14,20,24).

2.3.2 Citólisis mediada por complemento:

El mecanismo fue descrito anteriormente; en el cual, por la interacción de C5b-9 y del anticuerpo en la superficie de la membrana celular, se produce la lisis de la-misma, provocando la pérdida de la integridad funcional-de la célula y su contenido (sales, H_2O,proteínas) produciendo daño irreversible. Este mecanismo se lleva a cabo en células, bacterias y virus. (13,14,20).

2.4 Utilidad terapéutica de las Gammaglobulinas.

Se le utiliza con fines terapéuticos, con el objeto de conferir inmunidad pasiva contra numerosos agentes infecciosos, ya sean bacterias o virus.

En las enfermedades en que más se utilizan las Gam-

maglobulinas, están aquellas en las cuales el sistema inmune humoral está deprimido, ya sean adquiridas o congénitas. Estas son:

La Hipogammaglobulinemia congénita ligada al cromosoma X ó de Bruton y, la Hipogammaglobulinemia variable común o adquirida del adulto. La actividad que desempeñan las -- Gammaglobulinas es la de terapéutica de sustitución de - la Hipogammaglobulinemia.

En este tipo de enfermedades, los agentes infecciosos son:

Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, entre las bacterias. Entre los protozoarios están:

Giardia lamblia, Pneumocystis carinii. Entre los virus,- los más importantes son los virus ECHO.

En otras enfermedades, la actividad que desempeñan- las Gammaglobulinas, son las de prevención; Estas enfermedades son: Rubeola, y Hepatitis A. Aunque todavía no - se ha demostrado, las Gammaglobulinas podrían ser útiles para prevenir otras enfermedades como la rubeola en el - primer trimestre de embarazo; la varicela en pacientes - expuestos sometidos a terapéutica inmunosupresora, y en- la hepatitits transfusional.

Cualquier aplicación de Gammaglobulina, aparte de - las mencionadas, constituye un abuso o un mal uso de estos preparados. (9,13,20).

3.- M E T O D O L O G I A

3.1 Selección de las muestras.

Las muestras, fueron preparados de globulina sérica inmune o Gammaglobulina. La obtención de las muestras, - fueron al azar, en el comercio, a partir de las diferentes casas comerciales (industrias trasnacionales), y siguiendo las especificaciones para su conservación, indicadas en el envase. Todas, según indican sus envases, -- cumplen con los requisitos de concentración y utiliza- - ción de conservadores adecuados, según lo estipulado - - "The Code Of Federal Regulations, Title 21, Parts 600- - 799, April 1, 1980, Bureau of Biologies, Food and Drug - Administration.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Dr. Angel Leaño.

3.1.1 Tratamiento de las muestras.

Las muestras se sometieron, primero a una prueba para medir la actividad bactericida que posean los preparados de Gammaglobulinas, según R. van Furth y Cols.; ya - sea por conservadores utilizados o por residuos de diferentes sustancias utilizadas para la separación de las - mismas, las cuales pudieran invalidar los resultados defagocitosis. Luego fueron sometidas a una prueba para me

dir la actividad opsónica que posean las preparaciones - de Gammaglobulinas por dos ensayos, uno, microbiológico- y otro morfológico; el segundo ensayo sirve para comprobar que se haya efectuado el primero, según R. van Furth y cols. En esta prueba, por ambos ensayos, trata de mostrar la efectividad de las preparaciones de Gammaglobulinas para actuar como opsoninas ante los microorganismos. Por último, se sometieron a una prueba para medir la actividad citotóxica mediada por complemento de las preparaciones de Gammaglobulinas, la cual trata de mostrar la-- efectividad de estas preparaciones, para participar como anticuerpos dentro del mecanismo de citotoxicidad mediada por complemento, según algunas observaciones hechas - por R. van Furth y cols. y algunos conceptos teóricos.

En todas las pruebas a las que se les sometió a las muestras se conservó las condiciones de pH, temperatura- e isotonicidad que rigen in vivo; y utilizando medidas - de esterilidad, según se indica en los diferentes métodos. (1,3,13,20,24).

A las diferentes muestras, se les asignó un número para- no tener que referir el nombre comercial y laboratorio - que la produce.

Así teneomos que la Gammaglobulina:

1= método de extracción de Industria Trasnacional, Lab. EE.UU.

2= método de extracción de Industria Trasnacional, Lab. R.F.A.

3= método de extracción de Industria Trasnacional, Lab. EE.UU.

4= método de extracción de Industria Trasnacional, Lab EE.UU.

3.2.1 Actividad Bactericida.

La actividad de varias preparaciones de Gammaglobulinas se mide por:

- Incubación de $5X10^6$ microorganismos/ml con un mg. de gammaglobulina/ml en HBSS por 60 minutos a 37°C.
- Luego, hacer diluciones 1:10 en PBS, y el número viable de microorganismos es determinado por el método de vaciado de placa. (5,10).

3.2.2 Actividad Opsónica (ensayo microbiológico).

La actividad opsónica de las preparaciones de Gammaglobulinas se mide por determinación de su actividad promotora de fagocitosis para varios microorganismos. La fagocitosis fue ensayada por:

- Incubación de $5X10^6$ granulocitos/ml con $5X10^6$ microorganismos/ml en presencia de un mg. de gammaglobulina/ml (10% del suero) por 60 minutos a 37°C bajo rotación (4 - rpm).

Al comienzo de este ensayo y después de 60 minutos de incubación, los microorganismos no ingeridos, son separados de los granulocitos por centrifugación diferencial (110g x 4 minutos) y el número de microorganismos viables en el sobrenadante es determinado microbiológicamente. La disminución en el número de microorganismos extracelulares no ingeridos, son una medida de fagocitosis. (5,6,10,11,21,24).

3.2.3 Actividad Opsónica (ensayo morfológico)

La fagocitosis de Staphylococcus aureus Cowan I se mide morfológicamente.

- Incubar $5X10^6$ granulocitos/ml y $5X10^6$ S. aureus/ml con un mg. de gammaglobulina/ml por 60 minutos a 37°C.
- Después se remueven las bacterias no ingeridas por centrifugación diferencial.
- Los granulocitos son incubados con una unidad de Lysostaphin/ml por 5 minutos a 37°C para lisar todos los S. aureus que quedan adheridos extracelularmente a los gra-

nulocitos y luego son lavados una vez con HBSS antes de- que fueran hechas las preparaciones citocentrifugadas. Este procedimiento determina cuáles S. aureus son ingeridos; ya que las bacterias intracelulares quedan intactas. Después se fijan y se tiñen con Giemsa, el número de granulocitos conteniendo bacterias ingeridas y el número de bacterias ingeridas por granulocito es determinado por - Microscopio Optico en Inmersión (x 100).

La fagocitosis es expresada como un índice fagocítico por multiplicación del porcentaje de células positi-- vas por el número promedio de bacterias por granulocito. (5,10, 21,24).

3.2.4. Actividad Citotóxica mediada por Complemento.

La actividad citotóxica mediada por complemento que presentan las preparaciones de Gammaglobulinas depende - de la capacidad de éstas, para unirse al antígeno de superficie del microorganismo y activar el sistema Complemento, provocando citólisis del microorganismo. Se mide- por la viabilidad que presenten los microorganismos en - esta prueba. Se procede de la siguiente forma:

- Incubación de $5X10^6$ microorganismos/ml con1mg. de Ga-- mmaglobulina/ml por 30 minutos a 37°C, bajo rotación (4- rpm).

- Lavar y añadir 80-100 u. CH50/ml, incubando por 60 minutos a 37°C bajo rotación (4 rpm).

El número de microorganismos viables es determinado microbiológicamente por el método de vaciado de placa. La diferencia entre el número de microorganismos viables -- antes y después de la prueba, es una medida de actividad citotóxica. (13,17,20,21,24).

3.3 Microorganismos utilizados en las diferentes pruebas.

Se pensaba utilizar un mayor número de microorganismos en este estudio, pero por falta de recursos materiales y humanos, se redujo solo a los microorganismos más representativos de los agentes patógenos oportunistas y que además reunieran ciertas características, necesarias para las pruebas.

Como representante de los microorganismos gram (+), se utilizó Staphylococcus aureus cepa Cowan I (ATCC 12598) Su importancia reside en su pared celular, característica de los gram (+) y en su alto contenido de proteían A- en la misma; en especial de esta cepa.

El papel de la proteína A es el de reaccionar con - la región Fc de la Inmunoglobulina IgG, bloqueando el si

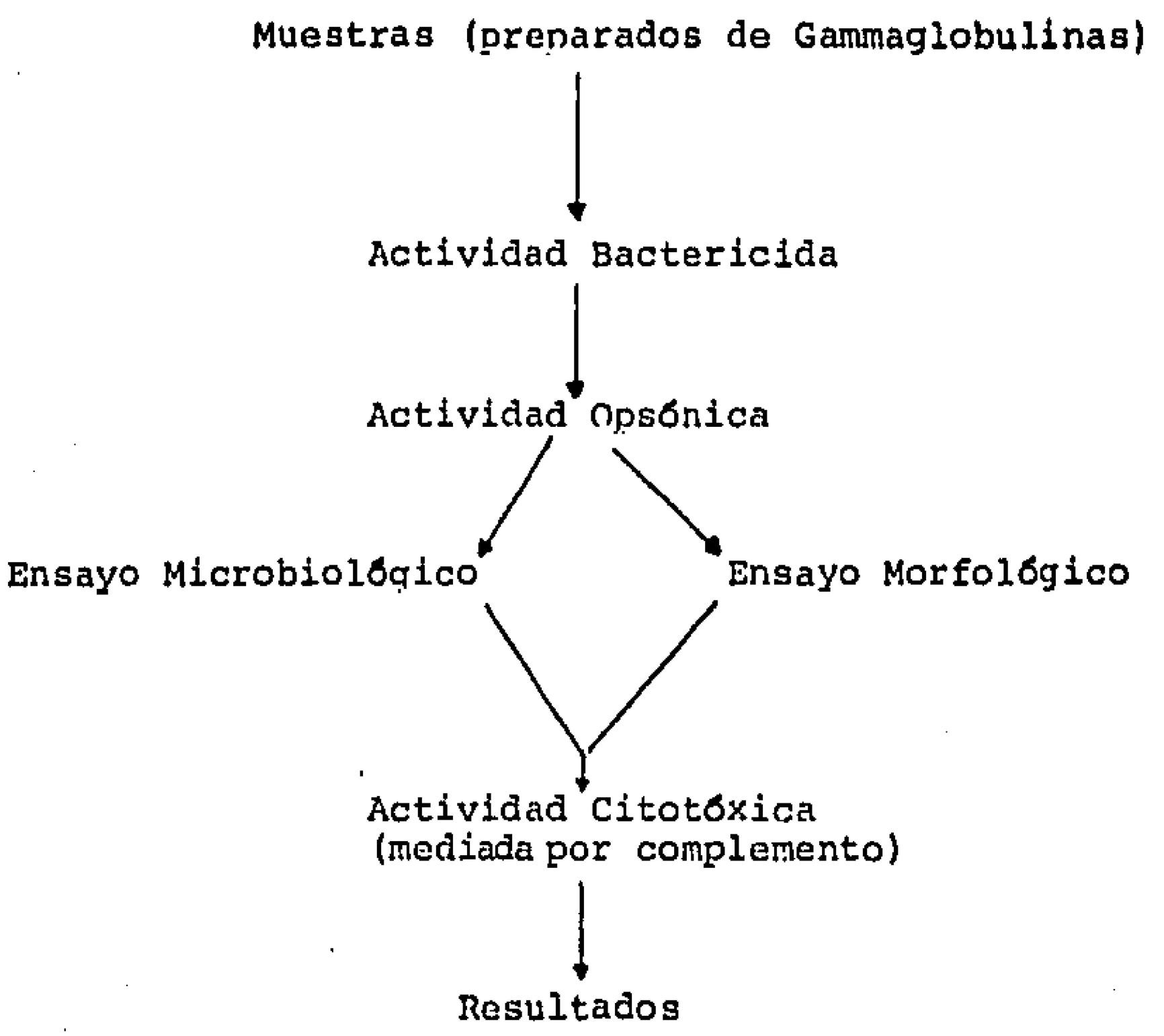
tio de unión con los receptores Fc de las células fagocí ticas y por lo tanto, impidiendo la fagocitosis. Sin embargo, esto promueve otro mecanismo, en el cual Cl es activado por fijación al complejo proteína A-IgG, probablemente el mismo sistema de activación del complemento, -- por el complejo antígeno-anticuerpo y liberando también- factores quimiotácticos, atrayendo polimorfonucleares y- por tanto, efectuándose la fagocitosis. La importancia - de la Inmunoglobulina reside en su poder opsonizante, para unirse por su fracción Fab al antígeno de superficie- del microorganismo y así promover la fagocitosis sin la- intervención del sistema complemento.

Como representantes de los microorganismos gram (-) se utilizó Escherichia coli (ATCC 11775) y Pseudomonas - aeruginosa. La pared celular de los microorganismos gram (-), son destruidas por la acción de Inmunoglobulinas IgM e IgG en presencia del sistema complemento.

Para las pruebas de actividad Opsónica, se utilizaron: S. aureus y E. coli.

Para la prueba de actividad Citotóxica mediada por com-- plemento, se utilizaron E. coli y Pseudomonas aeruginosa. (15,19,24).

3.4 Diagrama de Flujo.



4.- R E S U L T A D O S

Se investigaron 4 muestras de preparados de Gamma-- globulinas. A las muestras se les asignó un número como- se indicó anteriormente y se les sometió a las diversas- pruebas, antes señaladas (diagrama de flujo). En cada -- prueba se utilizaron como controles, el suero normal, -- (el cual contiene Gammaglobulinas y complemento), y el - sucro inactivado (el cual sólo contiene a las Gammaglobu linas).

Ambos sueros sirven como referencia porque reflejan la actividad in vivo de las Gammaglobulinas, ya sea auna das al complemento o sin él.

Los resultados fueron:

Actividad Bactericida: Los resultados demostraron que la actividad bactericida de los preparados de Gammaglobuli- nas fue elevada en comparación con el control de suero - inactivado, y es casi comparable con el control de suero normal. Esto es contrario a lo esperado, según referen-- cias de trabajos de Van Furth y cols. (5,10,24), en el - cual, no debe de existir actividad bactericida por parte de los controles o si la hay, ésta debe de ser mínima. Sin embargo, haciendo la comparación de los preparados - de Gammaglobulinas con los controles y con trabajos ante

riores, en ambos casos la actividad bactericida de éstos es elevada.

La actividad bactericida de las Gammaglobulinas pue- de ser atribuible a los conservadores utilizados, a los- residuos de los diferentes métodos de extracción, etc.

Los resultados de la actividad bactericida no fue-- ron similares para cada tipo de bacteria por cada prepa- rado de Gammaglobulinas; pero en general, por orden des- cendente de actividad, tenemos: Gammaglob. 3, Gammaglob. 2, Gammaglob. 4, Gammaglob. 1. El preparado de Gammaglo- bulinas con menor actividad bactericida, y por lo tanto- el óptimo para evaluación de prueba de fagocitosis, es - la Gammaglob. 1.

Aquí, la actividad bactericida de los preparados de Ga-- mmaglobulinas, fue mayor para Staphylococcus aureus que- para Escherichia coli. Los resultados se exponen en la - tabla 1 y en la gráfica 1.

Actividad Opsónica: La actividad opsónica, como mencionamos anteriormente, se mide por su capacidad de promover- la fagocitosis de los microorganismos y se obtiene de la fórmula $F(t) = \frac{No-Nt}{No} \times 100$ donde:

F(t) = porcentaje de fagocitosis a determinado tiempo.

Nt = número de bacterias viables, extracelulares a determinado tiempo.

No = número de bacterias viables, extracelulares a tiempo cero.

Los resultados se exponen en la tabla 2 y en la gráfica 2.

Los resultados obtenidos aquí, para los controles fueron los esperados según trabajos anteriores (5,10,24). Los resultados de las demás Gammaglobulinas, en general fueron buenos. Se obtuvo una mayor fagocitosis, por parte de los preparados de Gammaglobulinas, para Escherichia coli que para Staphylococcus aureus.

El ensayo morfológico de esta misma prueba, corroboró los resultados obtenidos del ensayo microbiológico. Aquí, la fagocitosis es expresada como un índice fagocítico por multiplicación del porcentaje de células positivas (células que contienen bacterias) por el promedio de bacterias por granulocito. Los resultados se exponen en la tabla 3. Por orden descendente de actividad en ambos ensayos es: Gammaglobulina 2, Gammaglobulina 3, Gammaglob. 4, Gammaglob. 1.

Actividad Citotóxica (mediada por complemento): Esta - - prueba no pudo ser llevada a cabo, por falta de recursos materiales.

UNAM
DE LA BIBLIOTECA
FACULTAD DE MEDICINA

Tabla 1. ACTIVIDAD BACTERICIDA (%)

	Suero Normal	Suero inac.	1	2	3	4
S. aureus	76.2	64.1	77.6	82.1	82.1	84.6
E. coli	89.1	42.4	65.4	64.7	69	60.3

Gráfica 1 ACTIVIDAD BACTERICIDA.

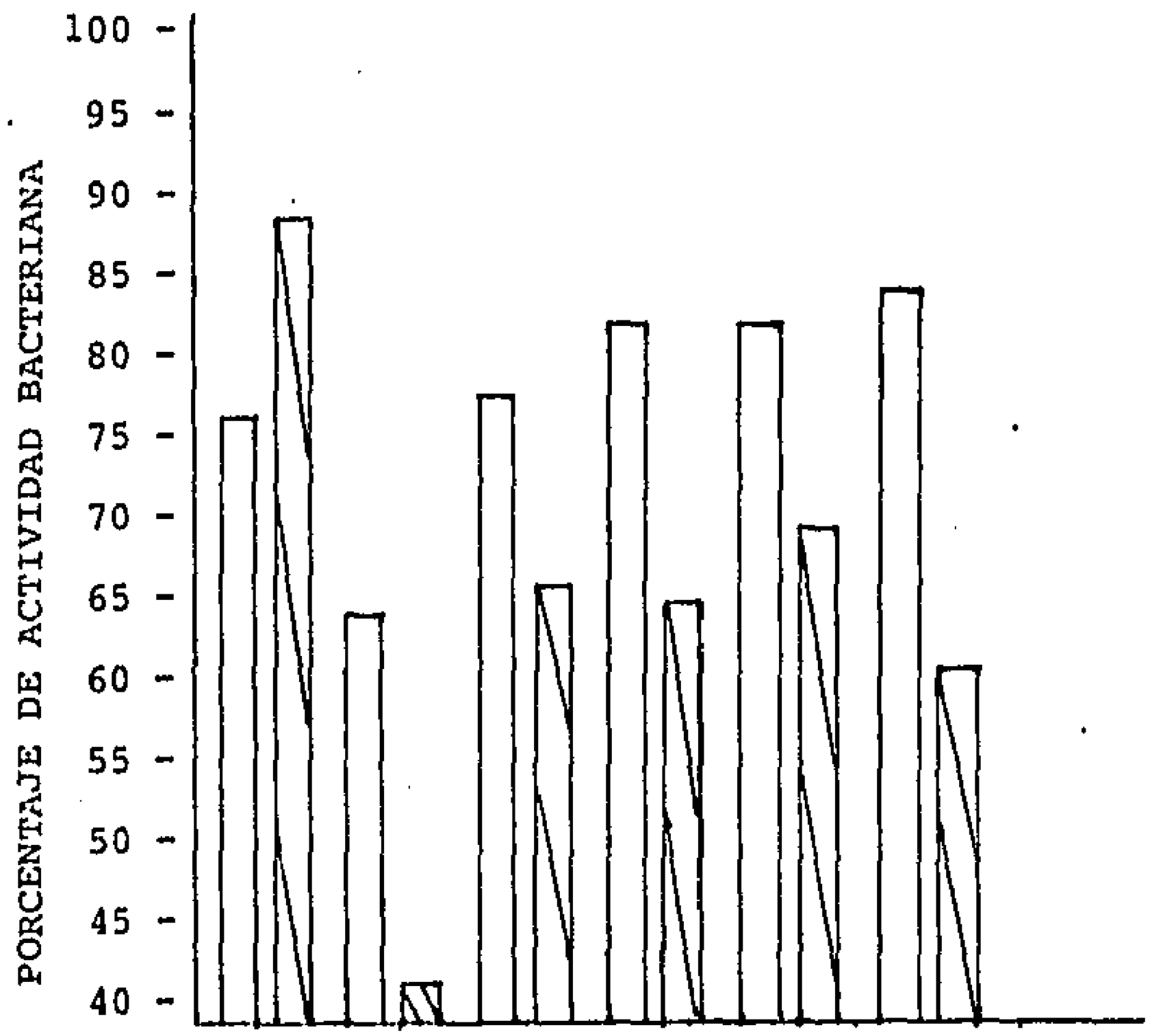


Tabla 2. ACTIVIDAD OPSONICA (ensayo microbiológico) (%)

	Suero Normal	Suero inac.	1	2	3	4
S. aureus	99.3	98.2	89.9	95.9	96.6	94.5
E. Coli	99.9	98.1	98.8	98.5	97.6	97

Gráfica 2. ACTIVIDAD OPSONICA.

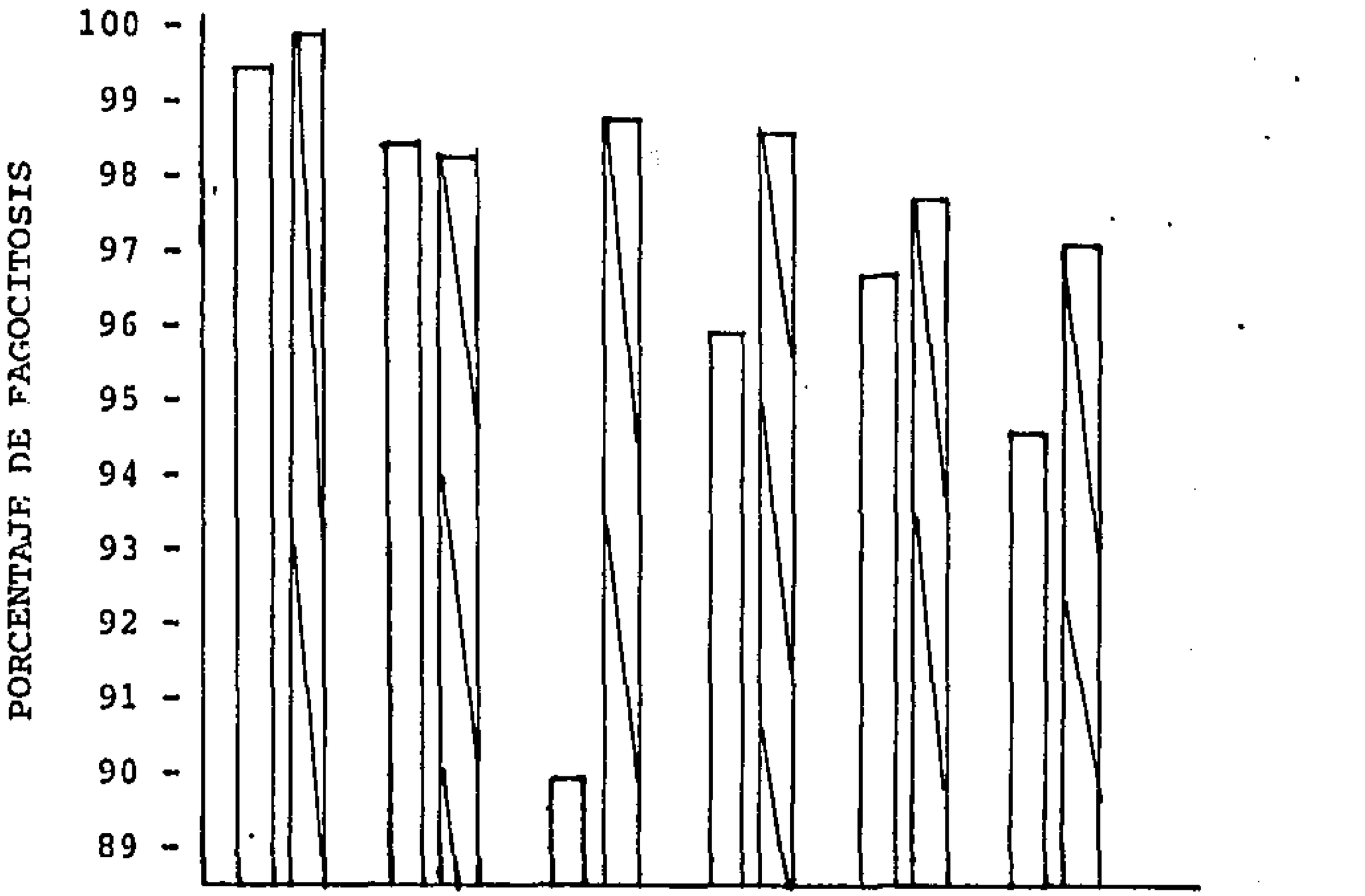


Tabla 3 ACTIVIDAD OPSONICA (ensayo morfológico)

	Porcentaje de células fagocíticas (granulocitos) que contienen S. aureus (A)	Promedio de bacteria por granulocito (B)	Indice Fagocítico (AXB)
Suero normal	17	90	1530
Suero Inac.	12	85	1020
1	6	60	360
2	10	60	600
3	8	75	600
4	6	75	450

5.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

1.- Los resultados obtenidos de la actividad bactericida de los preparados de las Gammaglobulinas, para -- los controles elevados, ya que según Van Furth y cols. - la actividad bactericida para éstos debía haber sido nula, y en algunos casos, aumentar el crecimiento bacteriano.

Esto podría deberse a una mala estandarización en - el número de bacterias al comenzar las pruebas; pero debe hacerse incapié en que la estandarización se comprobó por medio de una curva de calibración por método espec-- trofotométrico, y por el método de vaciado de placa. Sin embargo hay que tener en cuenta, que los resultados se - deben considerar como unidades formadoras de colonias -- (una bacteria puede formar una colonia o un agrupamiento de éstas, también puede formar una colonia) y por ésto - puede verse el número de bacterias viables reducido, o - dicho de otro modo, la actividad bactericida aumentada.

2.- De los resultados de actividad bactericida podemos concluir que los preparados de Gammaglobulinas tiene mayor actividad sobre S. aureus representante de las bacterias gram (+). Esto puede deberse a que las bacterias- gram (-) necesitan componentes del sistema complemento - para ser lisadas sus paredes celulares, y que necesitan,

principalmente IgM para el mismo propósito. Recordemos - que los preparados de Gammaglobulinas, contienen en su - mayoría, IgG y en menor proporción IgM. Además abría que hacer pruebas de actividad bactericida a los diferentes- conservadores y a los diferentes residuos de extracción de las Gammaglobulinas.

3.- Los resultados de la pba. de actividad Opsónica (ensayo microbiológico) demostraron tener mayor activi-- dad fagocítica, por parte de las Gammaglobulinas, para - E. coli que para S. aureus. Esto se puede explicar, por- que no todas las bacterias gram (-), necesitan componen- tes del Complemento, para promover su fagocitosis, como- lo demuestra el control de suero inactivado. En cambio,- en la actividad fagocítica con respecto al S. aureus, pa rece que la proteína A, en realidad constituye un método de defensa del microorganismo para evitar ser fagocitado.

Sin embargo, la actividad fagocítica de los prepara dos de Gammaglobulinas es buena, en comparación con los- sueros controles.

4.- Los mejores preparados de Gammaglobulinas, en - cuanto a las diferentes pruebas que se realizaron con -- ellas, fueron la Gammaglobulina 2 de Lab. R.F.A. y la Ga

mmaglobulina 3 de Lab. EE.UU. Para una mejor evaluación, podría complementarse este estudio con un análisis por - ultracentrifugación, como se indica en referencias anteriores y algunas prucbas in vivo.

La falta de la prueba de actividad citotóxica, po-- dría comprobar si en realidad es necesario, o mejor di-- cho, si aumenta la citólisis por complemento de las bac- terias gram (-) y si ésto es considerable para tomarse - en cuenta en las demás pruebas.

Todo esto debe tomarse en cuenta para estudios pos- teriores.

B I B L I O G R A F I A

1.- Collins M.S., Dorsey J. H. Comparative in vivo Activity between Intravenous Inmune Globulin prepared by reduction and alkylation or by low pH. The Journal - of Infectious Diseases. Vol. 151: No. 6, 1985, p.1171.

2.- Elsbach P. Degradation of Microorganisms by Phagocytic Cells. Reviews of Infectious Diseases. Vol.2: No. 1, 1980, p. 106.

3.- Hill H.R., Augustine N.H., Shigeoka A.O. Comparative Opsonic Activity of Intravenous Gammaglobulin Preparations for Common Bacterial Pathogens. The American Journal of Medicine. Vol. 3: No. 3, 1984, p. 61.

4.- Hostetter M.K., Krueger R.A., Schmeling D.J. The Biochemistry of Opsonization: Central Role of the Reactive Thiolester of the Third Component of Complement. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 150: No. 5, 1984, p. 653.

5.- Leijh P.C.J., Van Den Barselaar M.Th., Van Zwet T.L., et al. Kinetics of Phagocytosis of Staphylococcus -- aureus and Escherichia coli by human granulocytes. Inmunology. Vol.37: 1979, p.453.

6.- Peterson P.K., Verhoef J., Schmeling D., Quie P.G. - Kinetics of Phagocytosis and Bacterial Killing by human Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes. The- Journal of Infectious Diseases. Vol. 136: No. 4, - - 1977, p. 502.

7.- Steigbigel R.T., Lambert L.H., Remington J.S. Phagocytic and Bactericidal properties of normal human Monocytes. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 53: 1974, p.131.

8.- Territo M.C., Cline M.J. Monocyte Function in Man. The Journal of Inmunology. Vol. 118: No. 1, 1977, p. 187.

9.- Van der Meer J.W.M., Van den Broek P.J. Present Status of the Management of patients with defective Phagocyte function. Reviews of Infectious Diseases. Vol. 6: No.1, 1984, p. 107.

10.- Van Furth R., Leijh P.C.J., Klein F. Correlation between Opsonic activity for various microorganisms and Composition of Gammaglobulin preparations for intravenous use. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 1949: No.4, 1984, p. 511.

11.- Verbrugh H.A., Peters R., Peterson P.K., Verhoef J. Phagocytosis and killing of Sthaphylococci by human-polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. Jour-- nal of Clinical Pathology, Vol.31: 1978, p. 539.

12.- Verhoef J., Peterson P.K., Quie P.G. Human polymor- phonuclear leucocyte receptors for staphylococcal -- opsonins. Inmunology. Vol.33: 1977, p. 231.

13.- Bellanti J. A. Inmunología II, segunda edición, Mé- xico. Nueva Editorial Interamericana, 1981.

14.- Benacerraf B., Unanue E.R. Inmunología, segunda edi ción, Argentina. Editorial Médica Panamericana, 1986.

15.- Burrow W. Tratado de Microbiología, cuarta edición, México. Nueva Editorial Interamericana, 1983.

16.- Cásares Sánchez J., Bartual, Belloch, et. al Diccio nario Terminológico de Ciencias Médicas. Undécima -- eidición. México. Salvat Editores, 1983.

17.- Gradwohls. Clinical Laboratory Methods and Diagno-- sis. Seventh edition. USA. The C.V. Mosby Company, - 1970.

18.- Karnovsky L.M., Bolis L. Phagocytosis-Past and Future. USA. Academic Press Inc., 1982.

19.- Lennette E.H., Balows A. Hausler W.J., Shadomy J.H. Manual of Clinical Microbiology. Fourth edition. USA American Society for Microbiology, 1985.

20.- Margni R.A. Inmunología e Inmuno-química, tercera - edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana,- 1982.

21.- Rose J., Friedman T. Manual of Clinical Inmunology- USA. American Society for Microbiology, 1976.

22.- Sans J. Sabrafen. Hematología Clínica. España. Ediciones Doyma., 1982.

23.- Todd-Sanford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio Sexta edición, España. Salvat editores, 1983.

24.- Van Furth R., Van Zwet Th.L., Leijh P.C.J. Handbook of Experimental Inmunology. Third edition. England. Blackwell Scientific Publications, 1978.

INSTANTESIS

TESIS • INFORMES • MEMORIAS
COPIAS • REDUCCIONES • EN-
CUADERNADO • IMPRESIONES •
COPI-OFFSET • TRANSCRIPCIO-
NES IBM EN LINO • DIBUJO DE
GRAFICAS, PLANOS Y ORGANI-
GRAMAS • HELIOGRAFICAS •
REVELADO KODAK.

ENRIQUE G. MARTINEZ No. 30
(ANTES PARROQUIA)
TEL. 13 - 99 - 23 GUADALAJARA