

L2
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLÁN"**

**Activación Policlonal y Antígeno Específica de
Linfocitos B humanos in vitro.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :
NORMA EDITH DÍAZ ALARCON**



V. N. A. M.

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Introducción	1
Materiales y Métodos	9
Resultados	16
Discusión	78
Conclusiones	82
Resumen	83
Bibliografía	84

Objetivo,- Establecer la metodología necesaria para medir respuestas policlonales y respuestas antígeno específicas de linfocitos B humanos in vitro.

INTRODUCCION

En la respuesta inmune participa una compleja serie de interacciones humorales y celulares, tendientes a mantener la integridad de los individuos a través del reconocimiento de lo "propio" y lo "no propio". (1)

Una de las células fundamentales que constituyen al sistema inmune es el linfocito. Existen varias poblaciones de linfocitos, cada una con diversas funciones. Entre ellas se pueden distinguir dos poblaciones principales los linfocitos T y los linfocitos B. (2)

Los linfocitos B provienen de células germinales hematopoyéticas, las cuales a su vez dan origen a los distintos tipos de células sanguíneas, teniendo las células hematopoyéticas la capacidad de proliferar extensamente, asegurando la producción de células más diferenciadas y renovándose estas constantemente. (3)

Se sabe que en las aves el sitio de generación y diferenciación de estas células se efectúa en la bolsa de Fabricio. Al no existir tal órgano en los mamíferos se han propuesto otros órganos que cumplan con dicha función y aparentemente las células B son generadas principalmente en los órganos de hematopoyesis como son el hígado fetal durante la embriogénesis y la médula ósea en la vida adulta. (4,5,6)

Las células pluripotenciales se diferencian a células preB aunque aún no se sabe si existe un tipo de célula intermediaria la cual no sintetiza inmunoglobulina (Ig). (3,6,7) Las células pre-B se caracterizan por su gran variedad en tamaños, donde solo las más grandes se están dividiendo, pero la característica más importante es que sintetizan cadenas pesadas que se encuentran fundamentalmente en el citoplasma. (4,6,8)

En este estadio existe poca o nada de inmunoglobulina de superficie (Igs); en éste último punto existen discrepancias experimentales, por lo que se dice que la disminución de Igs se -

debiera tal vez a que estas desaparecen mas rápidamente que en las células maduras. (6)

Las células pre-B se han detectado en médula osea y bazo fetal. En el adulto estas células se localizan en médula osea pero no se han detectado en ganglio linfático, bazo o timo. (9, 10)

La célula pre-B posteriormente pasa a una fase de célula B inmadura. Este es el primer linfocito que tiene Igs, a diferencia de las células B adultas, éstas solo expresan una clase de inmunoglobulina que es la IgM mientras que las adultas tienen más de una clase de inmunoglobulina. (6)

Médula Osea

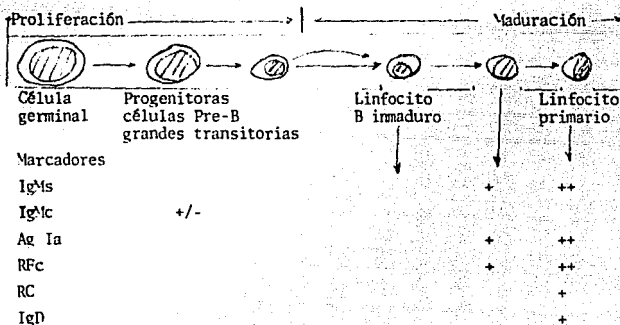


Figura 1.- Esquematiza un diagrama de maduración de linfocitos B propuesto por Osmond. (ref. 11)

Los linfocitos B inmaduros dejan la médula osea para migrar al bazo y otros órganos linfoides secundarios y comienzan a expresar moléculas marcadoras, como el receptor para el fragmento Fc de la Ig G y receptores para complemento y otras mole-

culas como los antígenos Ia; se incrementa la densidad de IgM además de aparecer en densidad baja o mediana la IgD. Estos estados tardíos de maduración parecen ser independientes de las influencias ambientales del bazo o la médula ósea, porque pueden suceder in vitro.

Los linfocitos B inmaduros tienen una gran cantidad de Igs, presentan receptor para el fragmento Fc (RFc) pero carecen de receptor para complemento (RC); en cambio los linfocitos B inmaduros son células con menor cantidad de Igs, presentan RFc, RC y antígeno Ia. (4)

Esta población celular ya madura no es tan homogénea como se pensaba anteriormente.

Varios estudios hechos en ratón han permitido observar que existe variación en las características de la superficie celular, en el tamaño, en los marcadores antigénicos, en la IgG y en la especialización funcional de las células B, sugiriendo todo ello la existencia de subpoblaciones de células B. (3)

Otros marcadores empleados para clasificar y estudiar la Ontogenia de los linfocitos B son los antígenos Lyb y los antígenos Ia. Respecto a los antígenos Lyb existe un antígeno Lyb 2 que es una cadena polipeptídica expresada solo en linfocitos B, a parece en muchas células pre-B, en todos los estadios de desarrollo de B, pero no en células plasmáticas. Existen otros antígenos como los Lyb 3.5 y 7 que parecen distinguir subpoblaciones de B (12). Estos marcadores se encuentran en baja concentración en ratones CBA/N, que son ratones con un defecto inmune ligado al cromosoma X que parece asociarse a la carencia de linfocitos B maduros. (12,13). El antígeno Lyb-3 se encuentra en células de bazo pero no en células de médula ósea y a parece tardíamente en la Ontogenia. El antígeno Lyb-5 parece marcar una subpoblación de células B maduras con RC (+) e inmunoglobulina(+). El Lyb-7 es un componente de Lyb-5 y esta presente en células B maduras. (12)

El antígeno Ia que esta presente en todas las células del sistema inmune aparecen en baja concentración en las células B fetales aumentando el nivel en pocas semanas. Sin embargo, no aparece en las células pre-B. (12)

Así como los marcadores de superficie, proporcionan un medio para caracterizar subpoblaciones de células B; también se han empleado criterios funcionales para tales fines estudiando la respuesta de células B hacia diversos antígenos. (3)

Los antígenos se clasifican en los que necesitan cooperación de linfocitos T a los cuales llamamos antígenos timodependientes (TD) y los que no necesitan de este tipo de cooperación celular para la síntesis de anticuerpos a los cuales llamamos antígenos timoindpendientes (TI); ejemplo de estos últimos son la flagelina polimerizada (PVP), polisacáridos capsulares de neumococo, DNP-Lys-Ficol1. (12,13,14, 15,16,17)

Se ha establecido que los antígenos TD inducen la síntesis de todas las clases de inmunoglobulinas mientras que los antígenos TI solo estimulan la síntesis de IgM con poca producción de IgG. (13,16) Esto parece deberse a que la cooperación necesaria de los antígenos TD promueven el rearrreglo de los genes de inmunoglobulina, fenómeno que no se da en la respuesta a los antígenos TI. (13)

Un antígeno TI tiende a ser una molécula grande, polimérica, con alta densidad de epitopes idénticos y con las características señaladas en la tabla 1. (13)

- Alto peso molecular, múltiples determinantes antígenicos repetidos.
 - Muchos son carbohidratos, componentes de la pared celular o capsula bacteriana.
 - Lentamente metabolizados.
 - Inducen tolerancia en dosis grandes o en forma soluble.
 - Algunos son mitogénicos o activadores policlonales de células B
 - Algunos activan la vía alterna del complemento.
 - Generan IgM y poca IgG.
 - Generan poca o ninguna célula B de memoria.
 - Generan anticuerpos homogéneos con secuencias V_H iguales.
- Tabla 1.- Propiedades de los antígenos Timoindpendientes.

Los antígenos TI se dividen en dos clases de acuerdo a su habilidad para estimular la respuesta inmune en ratones CBA/N. Aquellos antígenos TI que pueden inducir una respuesta en ratones CBA/N son los antígenos TI clase 1 (TI-1), los cuales también activan las células B neonatales, mientras que los que son incapaces de estimular las células B de los ratones CBA/N son los antígenos TI clase 2 (TI-2) y que por lo tanto solo activan células maduras. (12,13)

Los antígenos TD se clasifican de la misma forma. (12)

Por otro lado los antígenos TI y TD han permitido el estudio de la heterogeneidad poblacional en ensayos de inducción de tolerancia, la cual también se relaciona con los estadios de maduración de linfocitos B. Se ha demostrado que cuando se exponen antígenos TD a células de neonatos o de médula ósea estas se hacen más fácilmente tolerantes al antígeno que las células adultas o maduras. Los antígenos TI al parecer generan tolerancia en células B indistintamente de su fase de maduración aunque no todos los antígenos de este grupo muestran la misma capacidad para inducir la tolerancia. (12) Se ha relacionado la tolerancia con la Ig Ds ya que al eliminar este anticuerpo y en células B maduras (carentes naturalmente de IgDs) se facilita la toleragenización, en tanto que las células que mantienen IgD son más resistentes a la inducción de tolerancia. (4,6,7,12)

Otro parámetro que permite ver la heterogeneidad de las células B, es la respuesta a los activadores policlonales, viéndose como algunas células no responden a estos y otros si lo hacen. Existen muchos mitógenos los cuales activan a varias clones de linfocitos B, sin importar la especificidad de sus inmunoglobulinas de superficie, y entre ellas se encuentran el lipopolisacárido (LPS), la lipoproteína de la membrana externa de Escherichia coli (LP), el sulfato de Dextran (DxS), el polisacárido de Nocardia, la lectina de fitolaca americana (Pokeweed) y Corinobacterium parvum. La respuesta policlonal a mitógenos

aparece tempranamente en la Ontogenia de B, excepto contra la lipoproteína que aparece mas tardiamente, aunque en ratones CBA/N se ha visto que no hay respuesta para LPS ni Nocardia. Además se ha observado que estos mitógenos no estimulan al total de las células B de bazo, aunque en esto también existen muchas discrepancias experimentales. (12)

Como puede verse el desarrollo de células B es una serie compleja de diferenciación celular y eventos de maduración, cada estadio de diferenciación tiene características funcionales específicas así como también marcadores de superficie específicos, habiendo subpoblaciones de células B las cuales representan linajes separados de linfocitos B; cada linaje entonces deriva de una serie de maduración.

Para la activación del linfocito B el evento inicial es la unión del antígeno con el receptor específico sobre la superficie celular, el cual es una IgM o IgD. (4,5)

Los linfocitos B una vez estimulados sufren una transformación a células blastoides, llamados así por su apariencia morfológica de células hematopoyéticas inmaduras. Al término de esta los linfocitos pueden continuar diferenciándose hasta llegar a la etapa de célula plasmática la cual tiene un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado entre el cual se localizan mitocondrias. Las células en esta fase se encuentran sintetizando enormes cantidades de inmunoglobulina. (4) Se han encontrado diferentes tipos de inmunoglobulina en el desarrollo de las células B pareciendo haber un orden de aparición: de una célula B inmadura con una especificidad (V_H y V_L) definida se derivan células que expresan la misma especificidad (la misma región variable) pero en asociación con diferentes clases de cadenas pesadas. (18)

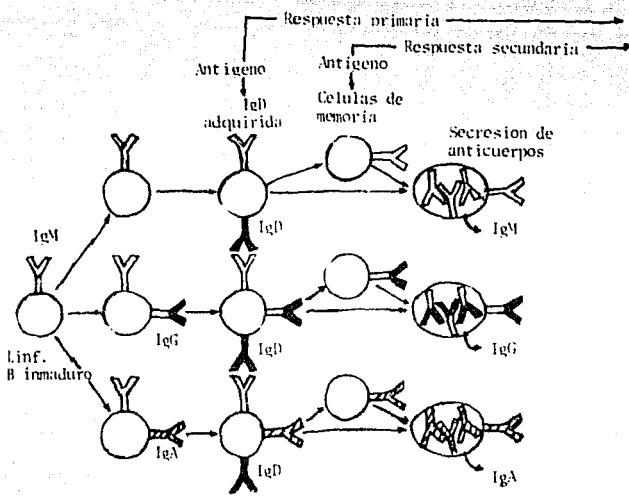


Figura 2.- En esta figura se observa que de la célula B inmadura derivan sublíneas independientes, cada una encargada de la síntesis y secreción de un isotipo definido, el cual se expresa en la membrana además de la IgM. Así las células con IgMs IgGs e IgMs IgAs se diferenciaron a células plasmáticas secretoras de IgG e IgA respectivamente. Existe una etapa intermedia en la cual se adquiere IgD como un receptor de superficie celular para el antígeno. Este mismo proceso ocurre en ratones atímicos mantenidos en un ambiente libre de gérmenes lo que sugiere que es independiente de la influencia del timo y de la estimulación antigénica. Se ha visto que cuando se interacciona con el antígeno hay una pérdida de la IgDs, más tarde la IgMs también se pierde, esto presumiblemente como una función del número de divisiones celulares. (6).

Se sabe que la activación inicial de células B en reposo puede realizarse por el entrecruzamiento de las inmunoglobulinas. (3,4,19,20) seguida por la proliferación en respuesta a factores de diferenciación y crecimiento derivados de células T y células accesorias para después diferenciarse. (5,6,19,20,21) De esta manera, se requieren por lo menos dos señales, - una proporcionada por la unión del antígeno específico, llevando a la proliferación de células B y la otra señal dada por la unión no específica del antígeno (factores de crecimiento, etc). (13,14,22)

Otra hipótesis sugiere que la síntesis de inmunoglobulina es activada por una señal proporcionada por algunas porciones mitogénicas de los antígenos TI y además se dice que la unión de los determinantes antígenicos con la Inmunoglobulina de superficie sirve solamente para concentrar al antígeno o mitógeno. Un tercer concepto sugiere que los antígenos TI tienen estructuras similares y la presentación de sus determinantes antígenicos activa receptores específicos lo cual lleva a una eficiente activación celular. (14)

La existencia de un gran número de estados de maduración que se encuentran presentes o disponibles dentro de la población de linfocitos B, enfatiza la necesidad de entender mediante ensayos funcionales, cual es la fisiología de una población de linfocitos B. Los estudios realizados hasta el momento actual, han sido principalmente en el sistema murino, si bien hay similitudes con los humanos, hay diferencias marcadas en cuanto a requerimientos de linfocinas, respuesta a mitógenos y diferencias en cuanto a la obtención de células B de los distintos sitios anatómicos. (20,22,23, 24, 28,29)

Lo anterior muestra la importancia de establecer condiciones en el sistema humano, de la caracterización fisiológica de los linfocitos B.

MATERIALES Y METODOS

1.- LINFOCITOS TOTALES

Se extrajo sangre periferica de individuos sanos, a la cual se le adicionó heparina (1000u/ml, Sigma Chem, Co. St. Louis - Mo.). Esta sangre se centrifugó sobre Ficoll-Hypaque (F-H con una densidad de 1.077 ± 0.001 g/ml) a 230 g por 30 minutos a temperatura ambiente, despues de este tiempo las células de la interfase, entre el plasma y el F-H, se lavaron con solución de Alsever por centrifugación a 130 g durante 7 minutos, este procedimiento se repitio hasta obtener el sobrenadante claro, esto se hace con la finalidad de eliminar las plaquetas.

Se realizo por ultimo un lavado con solución salina amortiguada (SSA) a 230 g durante 10 minutos y se procedió a contar con Azul tripiano (la viabilidad celular fue del 95%) y a ajustar la concentración de células a 1×10^7 celulas/ml en medio RPMI 1640 (Gibco, Laboratories, Grand Island N. Y. y Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.) suplementado con aminoacidos esenciales y 10% de suero fetal de ternera (In Vitro, Mexico) y adicionado con 100u/ml de penicilina y 100 microgramos/ml de estreptomocina finalmente se ajustó el pH a 7 con 1.5 mg/ml de Bicarbonato de sodio.

Las células se sembraron en cajas de microcultivo de 96 pozos de fondo concavo (Nuncion Co. Dinamarca)). Se tomaron 50 μ g (microlitros) de la suspensión celular conteniendo 5×10^5 en cada pozo, a las cuales se les agregó el antígeno o mitógeno y el volumen total se ajusto a 200 μ l por pozo con medio de cultivo. Cada prueba se realizó por triplicado.

Los reactivos usados para activar las celulas fueron:

Antígenos o Mitógenos	Concentración (μ g/pozo)
1) Pokeweed(PWM), lectina de fitolaca americana (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.)	0.0005, 0.0025, 0.005, 0.015, 0.025, 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 12.5

Antígenos o Mitógenos	Concentración (.4g/pozo)
1) Pokeweed. (Continuación)	2.5, 12.5
2) Concanavalina A (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.)	2
3) Salmonella typhi (Lipopolisacárido). Departamento de Inmunología. E.N.C.B. I.P.N.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 30, 60, 100
4) DNP-Lys_Ficoll. 56 moles de DNP por 1 de Ficoll. Departamento de Inmunología. E.N.C.B. I.P.N.	0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.02, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0
5) PPD (derivado proteico - purificado). Serum Institute Copenage, Dinamarca. 50 000U/ml = 1mg/ml	0.2, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0
6) Sulfato de Dextran (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0
7) Nocardia (Lipopolisacárido). Departamento de Inmunología. E.N.C.B. I.P.N.	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0
8) Sulfato de protamina (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0
9) Brucella abortus I.S.E.T. , S.S.	0.25, 1.0, 1.25, 2.5, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0

Antígenos o Mitógenos	Concentración (Mg/pozo)
10) Escherichia coli (Lipopolisacárido) E.N.C.B., I.P.N.	2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0 20.0, 30.0, 40.0

Posteriormente se colocaron las placas de microcultivo en una estufa a 37°C saturada con 90% de humedad y 5% de CO₂.

2.- PREPARACION DE ERITROCITOS DE CARNERO (GRC) PARA ROSETAS AET.

Se lavaron GRC tres veces con Alsever a 230 G durante 10 minutos, eliminando la capa de células blancas. El paquete de GRC lavados se mezcló en una proporción de un volumen de GRC con cuatro volúmenes de una solución de AET (2-aminoetil-isotiu_uronio, Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.) 0.143 M (0.5 g en 12.5 ml de agua bidestilada) ajustada a un pH de 9.0 con NaOH 10 M y filtrada en membrana milipore de 0.22 μ . Esta solución se preparó al momento de usarse.

La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente los eritrocitos se lavaron exhaustivamente hasta tener un sobrenadante claro y se ajustaron al 1% en SSA.

3.- ROSETAS AET.

Las células mononucleares obtenidas como se describió anteriormente se ajustaron a 4×10^6 células/ml, y se mezclaron volumen a volumen con la suspensión de GRC tratados con AET. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos después de lo cual se centrifugó a 50 g durante 5 minutos y finalmente se dejó en reposo a 4°C por una hora.

Para contar las células formadoras de rosetas se resuspendió el botón agitando muy suavemente. Se colocó una gota de la suspensión entre porta y cubreobjetos, fijando la preparación con parafina, la cual se coloca en los bordes del cubreobjetos.

Se cuentan cuando menos 200 linfocitos de los cuales se calcula el porcentaje de rosetas.

Aquellas células con morfología típica de linfocitos y que presentan 3 o más eritrocitos pegados a su superficie, se consideran rosetas; células con las mismas características pero sin eritrocitos adheridos se consideran linfocitos libres.

4.- LINFOCITOS B.

Una vez que se contaron las rosetas se procedió a centrifugar sobre F-H a 230 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esto hace que las rosetas T_{AET} se vayan al fondo junto con los eritrocitos y los linfocitos no formadores de rosetas quedan en la interfase.

Posteriormente se procedió a aspirar la capa de células que no formaron rosetas y se lavaron 3 veces con SSA a 230 g durante 10 minutos. Las células lavadas se ajustaron a 1×10^7 células/ml. Se contó con cristal violeta y se observó la viabilidad con Azul tripano.

Estas células se sembraron en placas de fondo concavo, tomando 50 μ l de la suspensión celular, tomando la sustancia que me va a activar en el volumen que deseamos y ajustando a 200 microlitros el volumen total. Inmediatamente se colocó la placa en la estufa de CO_2 con las condiciones anteriormente mencionadas.

5.- COSECHA DE LAS CELULAS.

Las placas con los cultivos celulares se pulsaron con timidina tritiada a las 72 horas. La timidina se dejó durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se aspiró el sobrenadante con una pipeta pasteur teniendo cuidado de no arrastrar las células. Cada pozo se lavó 3 veces con solución salina 0.95%.

Inmediatamente despues las células se resuspendieron en la solución salina y se colocaron en papel filtro Whatman número 3, dejandolos secar. Los papeles se trataron con ácido tricloroacético al 10% (Merck Co.) frio para precipitar los ácidos nucleicos, posteriormente se pasaron por PBS pH 7.2, para lavar el exceso de ácido tricloroacético y se pasan por metanol absoluto para fijar los ácidos nucleicos, por ultimo se tratan con cloroformo para secar los papeles y proceder a la cuenta de marca radioactiva.

Se preparó el liquido de centelleo de la siguiente manera: 1.14 g de POPOP (1,4 bis (2-4 metil-5 feniloxazilo) benzeno , Amersham y Searle) mas 15.1 g de PPO (2-5 difeniloxazol, Amersham y Searle) disueltos en 3.78 litros de tolueno, se mezclaron bien y se filtró.

El papel filtro se coloco con la cara que recibio las células, hacia arriba en viales de 10 ml y se les agregaron 5 ml de liquido de centelleo. Despues se introdujeron en un contador de centelleo Beckman LS 3801.

Para calcular el indice mitogenico (I.M.) se usó la siguiente formula

$$I.M. = \frac{\bar{x} \text{ dpm de las células mas la sustancia activadora}}{\bar{x} \text{ dpm de las células testigo}}$$

6.- ELISA

Algunas placas de microcultivo se dejaron de 5 a 6 días en la estufa de CO₂ para despues tomar los sobrenadantes de cada pozo, y determinar los anticuerpos por el inmunoensayo enzimatico (ELISA). (7, 25)

Inicialmente se tituló el conjugado peroxidasa-anti-inmoglobulina--humana obtenidas en cabra (Sigma Chem. Co. St. Louis Mo.). Para esto los pozos de las placas de ELISA (inmunolon - II Dinotech Lab.) fueron cubiertas con gama globulina de borrego anti-inmoglobulinas-humanas (Instituto de Higiene S.S.) a

una concentración de 20 mg de proteína/ml diluidos en amortiguador de boratos pH 9.0 para tener una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ en un volumen de 100 μl , otra serie de pozos se forraron con gama globulina humana (E.N.C.B., I.P.N., Departamento de Inmunología) 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ en un volumen de 100 μl , una tercer serie se forró con medio diluido 1:2 en boratos y la ultima serie se dejo solo con el amortiguador de boratos. Esto se realizo por duplicado.

Despues se incubaron las placas toda la noche a 4°C, despues estas fueron lavadas 3 veces con PBS conteniendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T), y se bloquearon con una solución de leche Sveltes al 2% por una hora a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se les agregó 100 μl del conjugado en las siguientes diluciones 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 y 1:16 000 poniendo despues a incubar 1 hora a 37°C. Luego de este tiempo se volvió a lavar 3 veces y se le agregó 100 μl del sustrato (ácido citrico 0.1M, 24.3ml, fosfato de sodio dibasico anhidro 0.2 M, 25.7 ml, 50 ml de agua bidestilada, 40 mg de ortofenilendiamino y 40 μl de agua oxigenada al 30 %). Se dejo la placa en la oscuridad durante 30 minutos, y despues se paro la reacción añadiendo una gota de ácido sulfurico 8 M a cada pozo. Se procedió a leer el color de los pozos en un lector de ELISA Minireader II, Dinotech Lab, con un filtro de 490 nm.

Una vez determinado el titulo del conjugado se estudiaron los sobrenadantes de los cultivos celulares para determinar la presencia de inmunoglobulinas humanas.

Para ello, los pozos se recubrieron con 20 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ (100 μl) de suero anti-inmunoglobulinas en amortiguador de boratos pH 9.0. Otros pozos se recubrieron con 20 μg por pozo de DNP-BSA o de acido sulfanilico-BSA. Como testigos se utilizaron pozos incubados solo con regulador de boratos y otros pozos recubiertos con anti-inmunoglobulina a los que no se les agregó el sobrenadante (testigo del sobrenadante).

Despues de bloquear los pozos se les agregó a cada uno 100

microlitros del sobrenadante correspondiente, excepto a los testigos de anticuerpo, y se incubo 1 hora a 37°C. Luego se les agregó a todos los pozos el conjugado y el sustrato como ya se indico anteriormente.

A las lecturas obtenidas se les resta la lectura obtenida del testigo del sobrenadante correspondiente.

Densidad Optica_{problema} — Densidad Optica_{testigo} = D. O. corregida

Tambien se realizo en ELISA una curva de calibración con gama-globulina-humana. (las diluciones de la gama-globulina-humana se hicieron en medio de cultivo).

Con esta grafica se interpolan los valores medios de las lecturas de cada sobrenadante para conocer su concentración de gama-globulina correspondiente.

RESULTADOS

Se puede observar en la tabla 1 y grafica 1 que no hay cambios ni del indice mitogenico como tampoco en las desintegraciones por minuto (dpm), y puede decirse que se mantienen casi constantes los valores, lo cual indica que las variaciones en concentraciones no eran lo suficientemente grandes para manifestarse en el nivel de activación.

Es decir, que cualquier concentración que se use entre 0.5 μg y 2.0 μg de Pokeweed (PWM) por pozo se va a promover la misma estimulación celular.

En el segundo grupo de individuos se probaron concentraciones mas bajas encontrandose que a concentraciones de 0.0005 microgramos por pozo hay una gran proliferación y esta va aumentando hasta llegar a la concentración en que ya no hay cambios para que al final a una concentración de 12.5 μg por pozo declina la proliferación, viendose que el rango adecuado para tener una buena proliferación se encuentra entre 0.005 μg a 0.25 μg por pozo.

En la tabla y grafica 2 se observa que si hay proliferación de las células con sulfato de dextran aunque esta es menor que la que se observa con PWM viendose una maxima activación con 1.5 μg por pozo. En los individuos numero 11, 12 y 15 casi no hay incorporación de timidina, viendo tambien que estos mismos individuos no responden con Concanavalina A siendo que este mitogeno ya habia sido probado induciendo una buena respuesta con cualquier individuo sano; esto podria deberse a la muerte celular y por ello no respondieron las células.

Los datos obtenidos con PPD son muy variables y se puede observar que hay una estimulación, aunque baja en el rango de 0.2 y 1.0 μg (Tabla y grafica 3).

En la tabla y grafica 4 se observa tambien que el indice mitogenico al incubar con lipopolisacarido de Nocardia es bajo excepto en el caso de los individuos numero 14 y 16 que parecen tener una buena proliferación celular, pero no se observa una

concentración optima a la cual se pueden activar las células . Es probable que aun pudiera aumentar el nivel de activación aumentando la concentración de antígeno.

En la grafica y tabla 5 con sulfato de protamina tampoco hay una buena proliferación, excepto con los individuos número 14 y 16, y tanto la incorporación como el indice mitogenico se mantienen sin variaciones importantes a cualquier concentración usada de sulfato de protamina.

En la grafica y tabla 6 se observa que con lipopolisacárido de Escherichia coli (E.coli) otra vez los individuos 11, 12 y 13 como en todos los casos anteriores no responden adecuadamente. Tambien se observa que la proliferación es muy baja excepto en los individuos número 14 y 16.

Tampoco Brucella abortus indujo una buena incorporación de timidina, y por tanto, tampoco una proliferación, excepto en el individuo número 14 que tiene una buena proliferación pero la curva de dosis-respuesta aparece como una curva bifasica (tabla y gráfica 7), pero como esto solo sucede en un individuo no se puede saber si realmente ese es el comportamiento que se sigue al activar linfocitos humanos con Brucella.

En la gráfica y tabla 8 se observa que en la mayoría de los individuos la proliferación inducida por lipopolisacárido de Salmonella, es baja excepto en el individuo número 14 y en el individuo 16. A pesar que la incorporación es baja asi como la proliferación, puede observarse que varios individuos tienen el mismo comportamiento al estar frente a diferentes concentraciones de Salmonella viendo que se obtiene una maxima respuesta entre $1 \mu g$ y $5 \mu g$ por pozo; a mayores concentraciones hay una disminución muy pronunciada de la respuesta.

En la tabla y grafica 9 no se observa variación ni en el indice mitogenico ni en la incorporación de timidina; podria decirse que se mantienen constantes, aunque con los individuos 6 13 y 16 si hay una incorporación de timidina aunque muy pobre.

En la grafica y tabla número 10 se observan las dpm de las células activadas con Concanavalina A. Estos cultivos se utilizaron como testigos en cada ocasión.

En la tabla y gráfica A se observa como la proliferación e incorporación es muy baja, resultado esperado ya que esta población es de linfocitos B, aunque si la población fuera totalmente pura no habría nada de activación o igual al testigo, puesto que la concanavalina A es un activador de células T.

En la tabla y gráfica B solo se tienen dos resultados con PWM activando a células B y en los cuales no hay variación en la incorporación de timidina ni en la proliferación con respecto al testigo. Este resultado corresponde a lo esperado ya que aunque es un activador de linfocitos B también activa a los linfocitos T.

En la tabla y gráfica C se observa que tampoco hay variación con respecto al testigo, por lo que probablemente no se utilizó la concentración adecuada de PPD para inducir la estimulación.

Los resultados de la tabla y gráfica D muestran que con sulfato de dextran no hay variación ni en la incorporación de timidina ni en la proliferación, excepto en el individuo E que al parecer conforme aumenta la concentración aumenta la proliferación aunque esta es muy discreta.

Con DNP-Lys-Ficoll tampoco hay diferencias y la incorporación de radioactividad en presencia del antígeno es igual casi que la del testigo (tabla y gráfica E), como sucedió en el caso anterior al incubar con sulfato de dextran.

En la tabla y gráfica F se observa que con Salmonella no existe ningún cambio en la incorporación de radioactividad, la cual fue muy baja a cualquier concentración de antígeno.

Con lipopolisacárido de E. coli solo se tienen dos resultados, los cuales son contradictorios entre si (tabla y gráfica G). En el individuo C conforme aumenta la concentración de lipopolisacárido disminuye la incorporación y el índice mi-

togenico; en el individuo A sucede lo contrario aunque en este ultimo solo se tienen dos datos pero como solo se estudiaron las células de dos individuos la interpretación es difícil.

La detección de anticuerpos en varios trabajos se realiza por la técnica de ELISA (7, 24, 30, 31, 23), ya que es una técnica muy sensible que mide cantidades muy pequeñas de anticuerpos; por esto se decidió utilizarla considerando que en los sobrenadantes de células estimuladas con PWM existirían anticuerpos en muy baja concentración.

Con respecto a B. abortus y sulfato de dextran se vio que si se produjeron anticuerpos aunque solo se conto con un dato

Salmonella, DNP-Lys-Ficoll y PPD, tambien provocaron la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas humanas totales), aunque en este ultimo la cantidad de anticuerpos es mas baja.

La concanavalina A, aparentemente indujo en algunos casos la producción de gama globulina, aunque en muy bajas concentraciones.

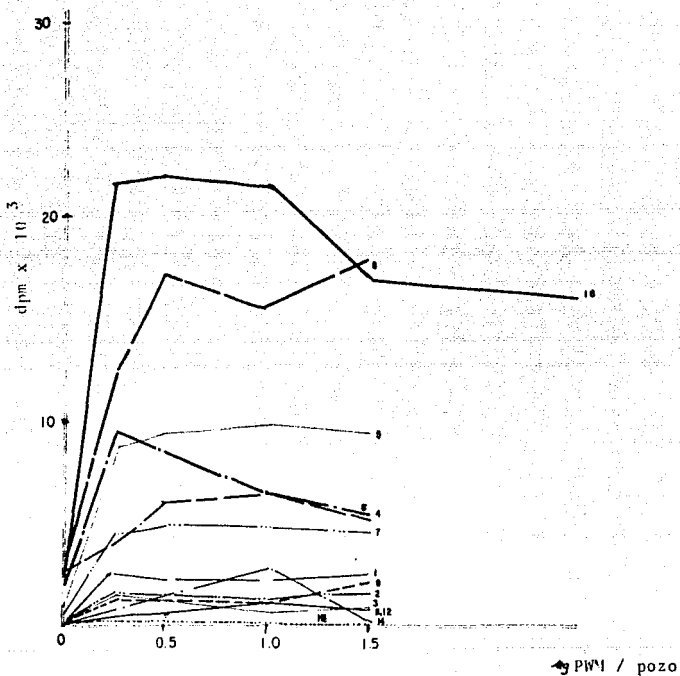
Una observación importante fue el hecho de que los anticuerpos especificos anti-DNP y anti-ac. sulfanilico se encontraron en concentraciones mucho menores que los anticuerpos totales, lo que sugiere una muy pobre activación antigénica específica.

Tabla 1.- Estimulación de linfocitos totales inducida por fitolacn americana (PWM).

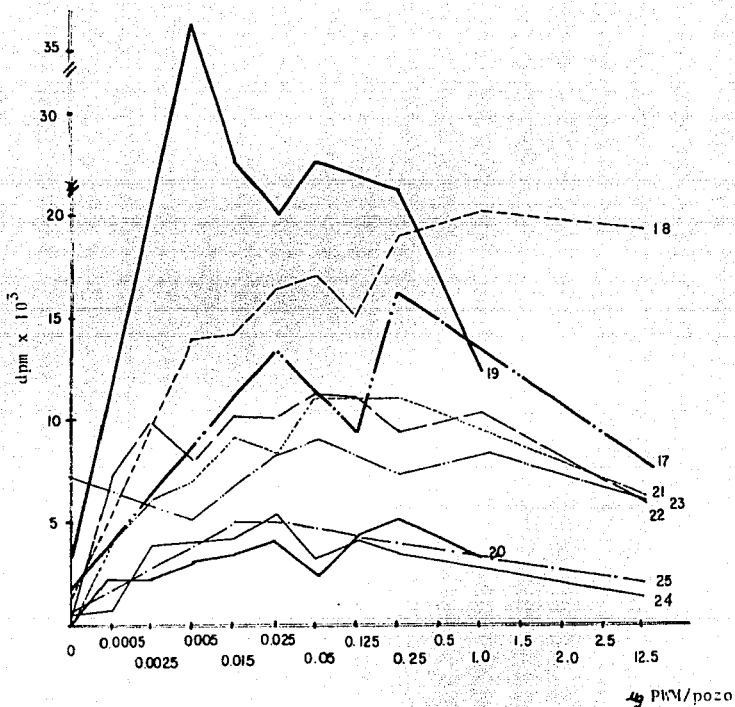
Concentración microgramos por pozo	dpm ¹⁷ I.M.	dpm ¹⁸ I.M.	dpm ¹⁹ I.M.	dpm ²⁰ I.M.	dpm ²¹ I.M.	dpm ²² I.M.	dpm ²³ I.M.							
Testigo	1808	1555	2773	179	213	437	7359							
0.0005				2390	13.0	4035	18.9	7497	17.0					
0.0025				2591	14.0	6513	30.0	9975	22.0					
0.005		13907	8.9	36399	13.0	3060	17.0	7262	34.0	8026	18.0	5310	0.7	
0.015		14543	9.3	25639	9.2	3751	20.0	9261	43.0	10587	24.0			
0.025	13667	7.5	16739	10.0	20031	7.2	4288	23.0	8867	41.0	10258	23.0	8275	1.1
0.05		16153	10.0	24729	8.9	2581	14.0	11097	52.0	11673	26.0	9058	1.2	
0.125	9677	5.3	15242	9.8		4616	25.0	11097	52.0	11272	25.0			
0.25	16107	8.9	18988	12.0	22440	8.0	5021	27.0	11224	52.0	9750	22.0	7434	1.0
0.5														
1.0	14116	7.8	2020	12.0	14762	5.3	3748	20.0	11975	56.0	10670	24.0	8521	1.2
1.5														
2.0														
2.5	9460	5.2												
12.5	7993	4.4	19845	12.0				6438	30.0	5935	13.0	6142	0.8	

Tabla 1.- Estimulación de linfocitos totales inducida por lectina de fitolaca americana (PWM)

Concentración microgramos por pozo	dpm ²⁴	I.M.	dpm ²⁵	I.M.	n	\bar{x} _{I.M.}	D.E. _{I.M.}
Testigo	557		557				
0.0005	971	1.7	1963	3.5	5	10.9	7.0
0.0025	3795	6.8			4	18.6	8.8
0.005	4278	7.6			7	14.2	9.7
0.015	4590	8.2	5182	9.2	7	17.7	12.0
0.025	5803	10.4			8	15.7	12.2
0.05	3761	6.7			7	17.1	15.9
0.125	4071	7.3			6	20.9	16.1
0.25	3824	6.8	5090	9.1	19	10.8	11.7
0.5					10	5.7	2.7
1.0					21	9.5	11.9
1.5					14	4.5	2.7
2.0					1		
2.5					1		
12.5	1587	2.0	2092	3.7	7	9.7	9.5



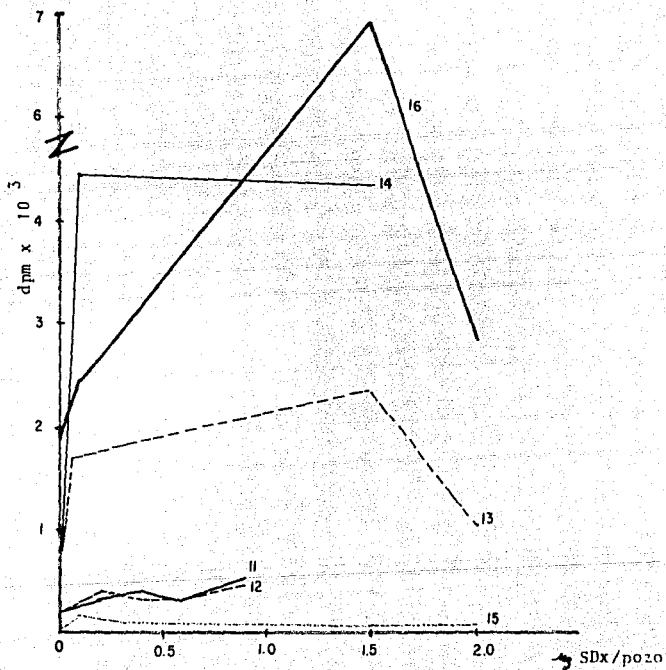
Grafical.- Estimulación de linfocitos totales inducida por lecitina de fitolaca americana (PWM). Donadores 1 al 16.



Grafica 1.- Estimulación de linfocitos totales inducida por lec tina de fitolaca americana (PWM). Donadores 17 al 25.

Tabla 2.- Estimulación de linfocitos totales inducida por Sulfato de Dextran.

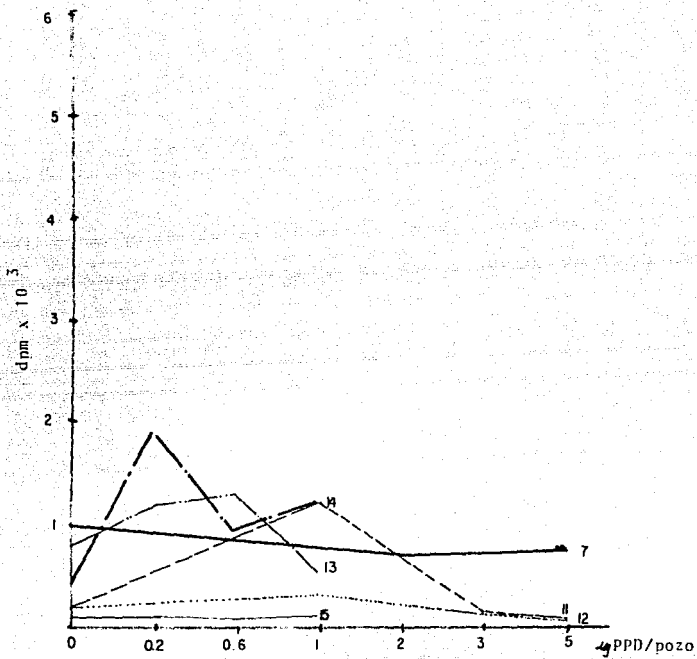
Concentración microgramos por pozo Testigo	11		12		13		14		15		16		n	\bar{x} I.M.	D.E. I.M.
	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.			
0.1	205		259		829	2.1	397	11.1	140	1.3	2450	1.3	4	3.9	4.1
0.2	323	1.5	405	1.5									2	1.5	0.0
0.3									96	0.9			1		
0.4	397	1.5	316	1.5									2	1.5	0.0
0.6	327	1.5	300	1.1									2	1.3	0.2
0.8	478	2.3	470	1.8									2	2.0	0.2
1.5					2362	2.8	4366	10.9	58	0.5	6893	3.7	4	4.4	3.8
2.0					1069	1.2			65	0.6	2839	1.5	3	1.1	0.3



Grafica 2.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Sul-
fato de Dextran. (SDx)

Tabla 3.- Estimulación de linfocitos totales inducida con PPD (derivado proteico purificado) de M. Tuberculosis).

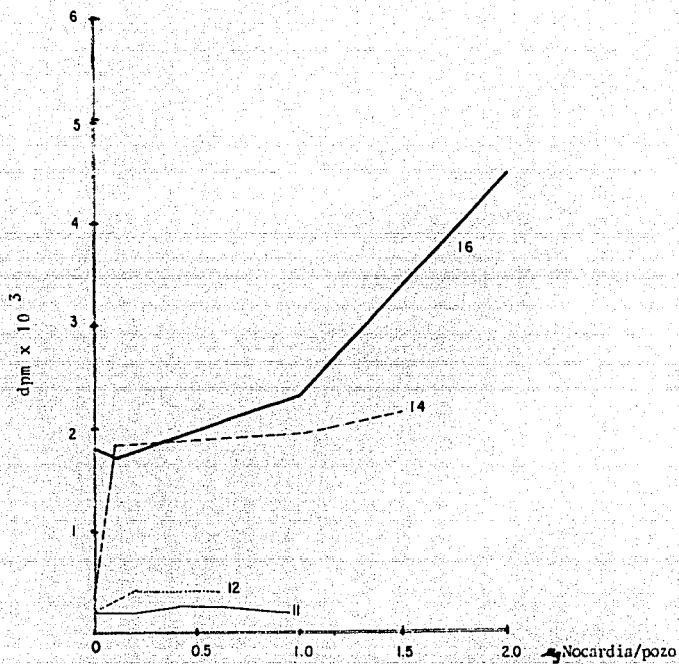
Concentración	7 dpm	11 dpm	12 dpm	13 dpm	14 dpm	15 dpm	n	\bar{x}	D.E.					
microgramos por pozo	I.M.	I.M.	I.M.	I.M.	I.M.	I.M.		I.M.	I.M.					
Testigo	1040	205	259	829	397	102								
0.2				1257	1.8	1903	6.6	115	1.1	5	2.4	1.9		
0.6				1293	1.5	988	2.4	85	0.8	3	1.5	0.6		
1.0		1230	6.0	348	1.3	544	0.6	1197	3.0	127	1.2	3	3.2	2.4
2.0	689	0.6								1				
3.0		158	0.7	129	0.5					2	0.6	0.3		
5.0	748	0.7	134	0.6	57	0.2				3	0.5	0.2		



Grafica 3.- Estimulación de linfocitos totales inducidas con PPD (derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*).

Tabla4.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Lipopolisacarido de Nocardia.

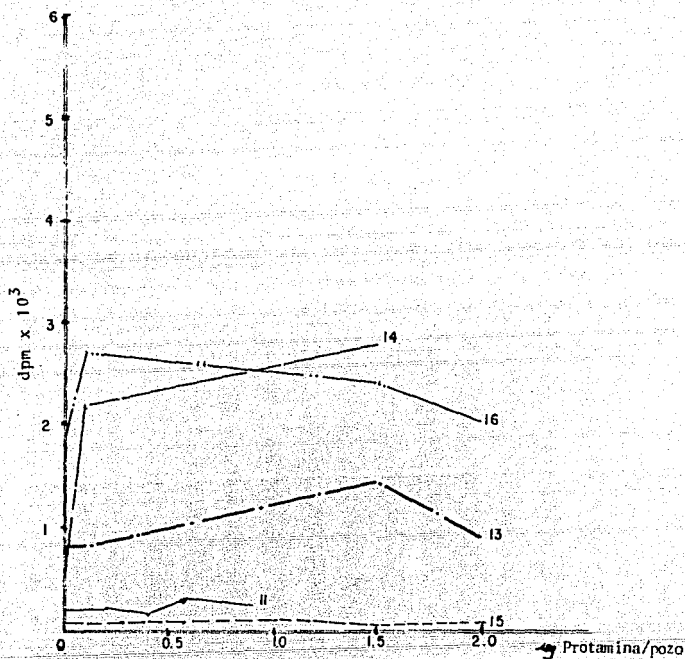
Concentración microgramos por pozo	11		12		14		16		n	\bar{x} I.M.	D.E. I.M.
	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.			
Testigo	205		259		397		1844				
0.1					1838	4.6	1693	0.9	2	2.7	1.8
0.2	212	1.0	402	1.5					2	1.2	0.2
0.4	252	1.2	419	1.6					2	1.4	0.2
0.6	255	1.2	398	1.5					2	1.3	0.1
0.8	224	1.0							1		
1.0					1940	4.8	2295	1.2	2	3.0	1.8
1.5					2172	5.4			1		
2.0							4440	2.4	1		



Grafica 4.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Lipopolisacarido de Nocardia.

Tabla 5.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Sulfato de Protamina,

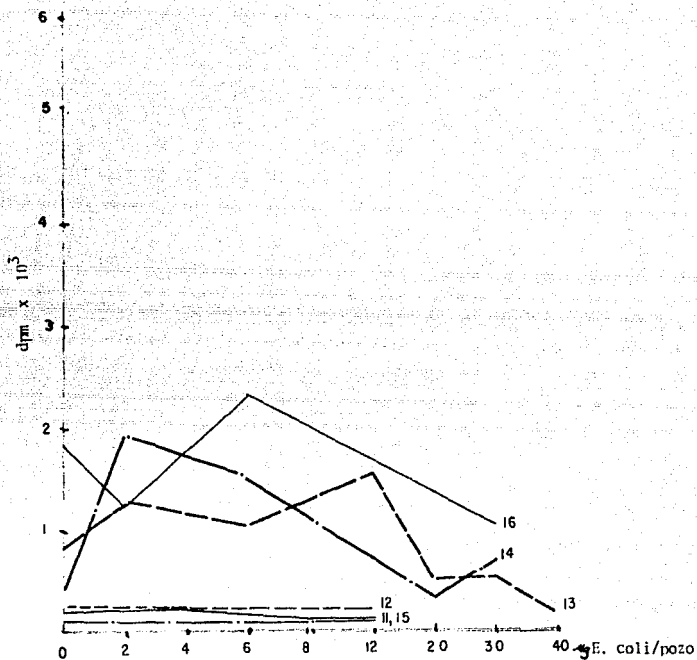
Concentración microgramos por pozo Testigo	11		13		14		15		16		n	\bar{x} _{I.M.}	D.E. _{I.M.}
	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.			
	205		829		397		102		1844				
0.1			829	1.0	2199	5.5			2717	1.4	3	2.6	2.0
0.2	224	1.0									1		
0.4	194	0.9									1		
0.6	302	1.4									1		
0.8	263	1.2									1		
1.0							128	1.2			1		
1.5			1455	1.7	2780	7.0	48	0.4	2409	1.3	4	2.6	2.5
2.0			933	1.1			103	0.6	2085	1.1	3	0.9	0.2



Grafica 5.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Sulfato de Protamina.

Tabla 6.- Estimulación de linfocitos totales inducida con lipopolisacarido de Escherichia coli (E. Coli)

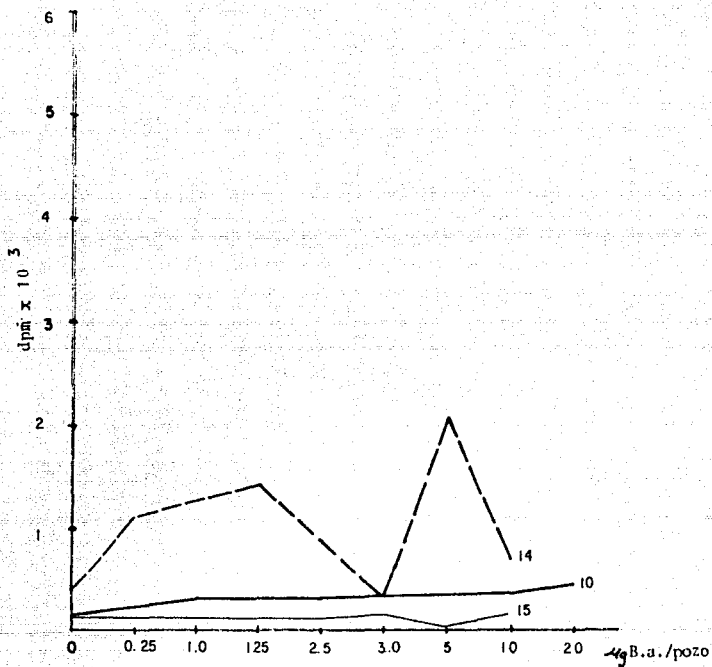
Concentración	11		12		13		14		15		16		n	$\bar{x}_{I.M.}$	D.E.-I.M.
microgramos por pozo	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.			
Testigo	205		259		829		397		102		1844				
2.0					1245	1.5	1976	4.9	73	0.7	1258	0.6	4	1.9	1.7
4.0	196	0.9	206	0.7					98	0.9			3	0.85	0.1
6.0					1064	1.2	1471	3.7			2371	1.2	3	2.0	1.1
8.0	152	0.7	220	0.8					130	1.2			3	0.9	0.2
12.0	98	0.4	216	0.8	1478	1.7			89	0.8			4	0.9	0.4
20.0					498	0.6	323	0.8					2	0.7	0.1
30.0					498	0.6	688	1.7			1069	0.5	3	0.9	0.5
40.0					196	0.2							1		



Gráfica b.- Estimulación de linfocitos totales inducida con lipopolisacárido de *Escherichia coli*. (*E. coli*).

Tabla 7.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Brucella abortus.

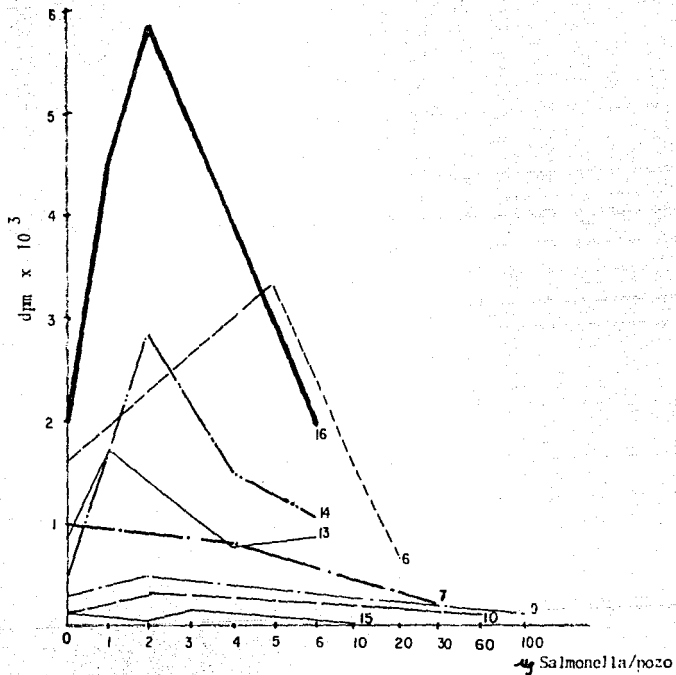
Concentración microgramos por pozo Testigo	10		14		15		n	\bar{x} I.M.	D.E. I.M.
	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.			
	182		397		102				
0.25			1171	2.9	92	0.9	2	1.9	1.0
1.0	310	1.7					1		
1.25			1462	3.6	99	0.9	2	2.3	1.3
2.5	317	1.7	860	2.1	98	0.9	3	1.5	0.4
3.0			302	0.7	120	1.1	2	0.9	0.2
5.0			2068	5.2	58	0.9	2	3.0	2.1
10.0	364	2.0	699	1.7	155	1.5	3	1.7	0.2
20.0	466	2.5					1		



Grafica 7.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Brucella abortus. (B.a.)

Tabla 8.- Estimulación de linfocitos totales inducida con lipopolisacárido de Salmonella.

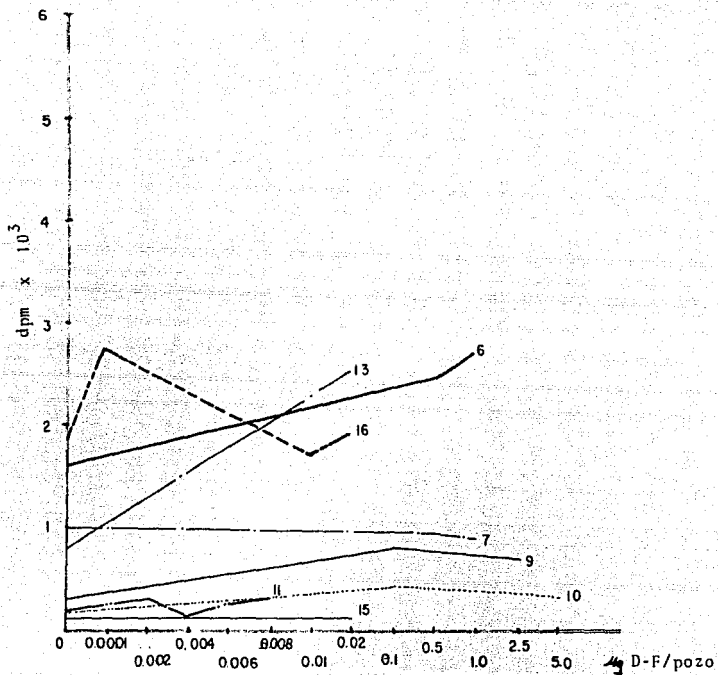
Concentración microgramos por pozo Testigo	6		7		9		10		13		14		15		16		n	\bar{x}	D.E.	I.M.
	cpm	I.M.	cpm	I.M.	cpm	I.M.	cpm	I.M.	cpm	I.M.	cpm	I.M.	cpm	I.M.	cpm	I.M.				
	1605		1040		328		182		829		397		102		1844					
1.0														4463	2.4	1				
2.0					529	1.6	351	1.9	1671	2.0	2829	7.1	70	0.6	5835	3.1	6	2.7	2.0	
3.0													88	0.8			1			
4.0			811	0.7					790	0.9	1539	3.8			3837	2.0	4	1.8	1.2	
5.0	3305	2.0															1			
6.0									864	1.0	1070	2.6			1970	1.0	3	1.5	0.7	
10.0													53	0.5			1			
20.0	658	0.4	348	0.3													2	0.3	0.0	
30.0			221	0.2													1			
60.0					189	0.5	121	0.4									2	0.4	0.05	
100.0					116	0.3											1			



Grafica 8.- Estimulación de linfocitos totales inducida con el polisacárido de Salmonella.

Tabla 9.- Estimulación de linfocitos totales inducida con DNP-Lys-Ficoll.

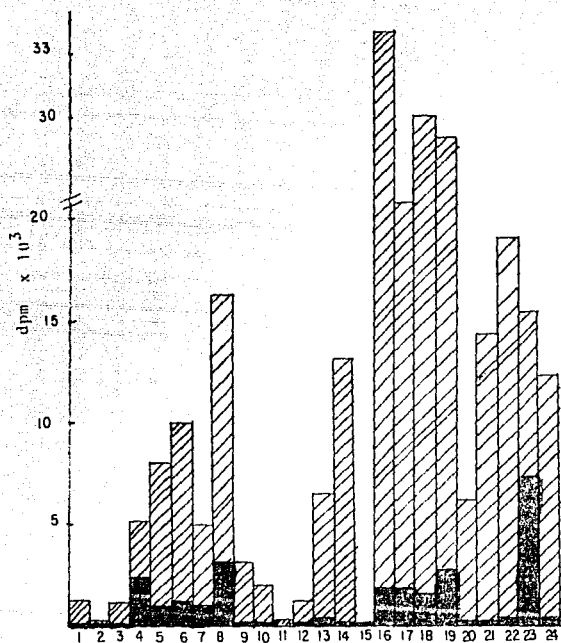
Concentración	6		7		9		10		11		13		15		16		n	\bar{x}	M.	D.E.	I.M.
microgramos por pozo Testigo	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.	dpm	I.M.					
0.001	1605		1040		328		182		205		829		102		1844		1				
0.002									341	1.6							1				
0.004									176	0.8							1				
0.006									265	1.2							1				
0.008									299	1.4							1				
0.01															1786	0.9	1				
0.02											2527	3.0	130	1.2	1931	1.0	3	1.7	0.8		
0.1					803	2.4	431	2.3									2	2.3	0.05		
0.5	2459	1.5	934	0.8													2	1.1	0.3		
1.0	2673	1.6	899	0.8													2	1.2	0.4		
2.5					704	2.1	371	2.0									2	2.0	0.07		
							330	1.8									1				



Grafica 9.- Estimulación de linfocitos totales inducida con DNP-Lys-Ficoll. (D-F).

Tabla 10.- Estimulación de linfocitos totales inducida con concanavalina A (2 μ g por pozo).

No. de individuos	dpm	I.M.	T _d dpm
1	1698	5.0	343
2	609	1.4	415
3	1407	4.4	316
4	5474	1.9	2882
5	8264	8.5	968
6	10260	6.8	1605
7	5261	5.0	1040
8	16506	5.0	3315
9	3285	10	328
10	1961	10	182
11	458	2.2	205
12	1346	5.1	259
13	6806	8.2	829
14	13036	22	397
15	152	1.4	102
16	33963	18	1844
17	21541	12	1808
18	29707	19	1555
19	27817	10	2773
20	6126	34	179
21	14216	66	213
22	18842	43	437
23	15315	2.1	7359
24	12083	21	557
n= 24	\bar{x} I.M.=13.48		D.E.I.M.= 15.0



Donador numero.

Grafica 10.- Estimulación de linfocitos totales inducida con Concanavalina A (2 µg por pozo).



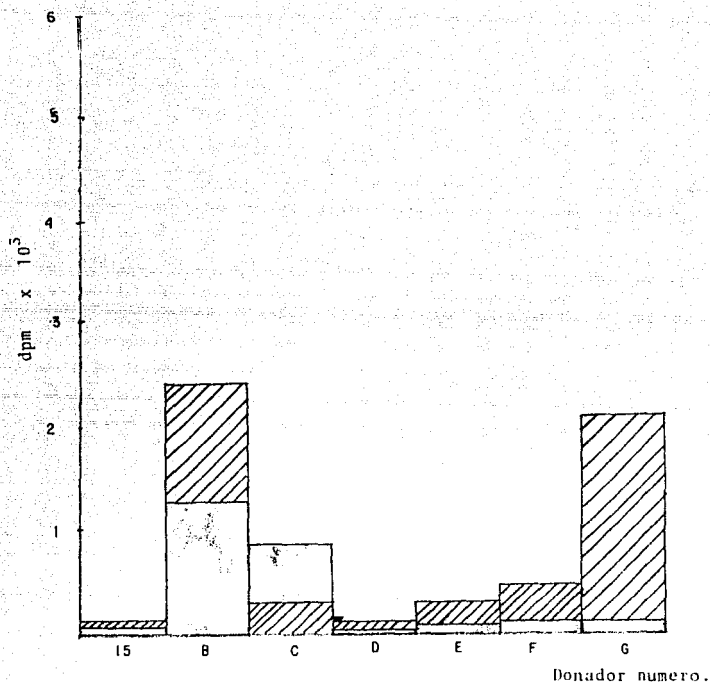
 Testigo
 Activación

Tabla A. - Estimulación de linfocitos B inducida con Concanavalina A (2 μ g por pozo)

No. de individuos	dpm	I.M.	T _{dpm}	% rosetas
S	178	1.4	121	50
B	2458	1.8	1310	60
C	379	0.4	875	60
D	107	2.6	40	64
E	327	3.4	94	64
F	474	2.7	174	64
G	2142	14	153	64
n= 7	\bar{x}	I.M.= 3.77		D.E. I.M. = 4.2



Grafica A.- Estimulación de linfocitos B inducida con Concana valina A (2 μ g por pozo).



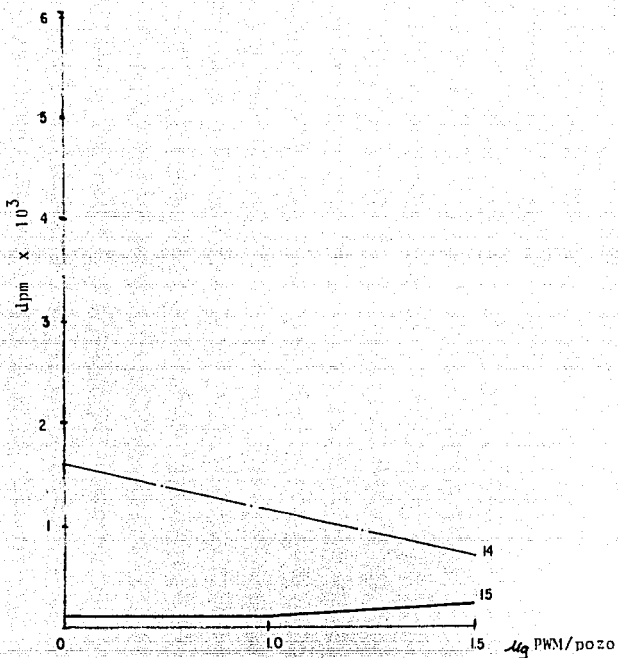
 Testigo
 Activación

Tabla B.- Estimulación de linfocitos B inducida con fitolaca americana (PWM).

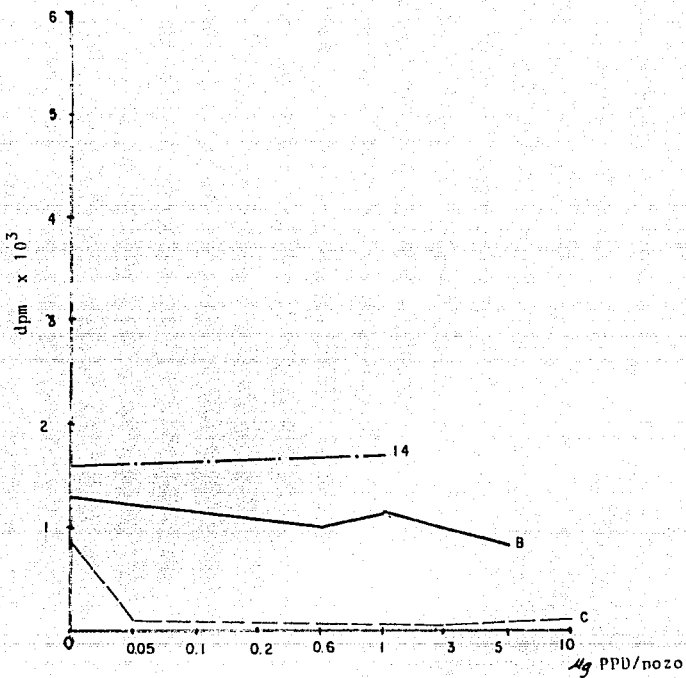
Concentración microgramos por pozo	14			15			n	$\bar{x}_{I.M.}$	D.E. I.M.
	dpm	I.M.	%rosetas	dpm	I.M.	%rosetas			
Testigo	1656		60	121		50			
1.0				102	0.8		1		
1.5	729	0.4		209	2.4		2	1.4	1.0



Grafica B.- Estimulación de linfocitos B inducida con fitolectina americana (PWM).

Tabla C.- Estimulación de linfocitos B inducida con PPD (derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*)

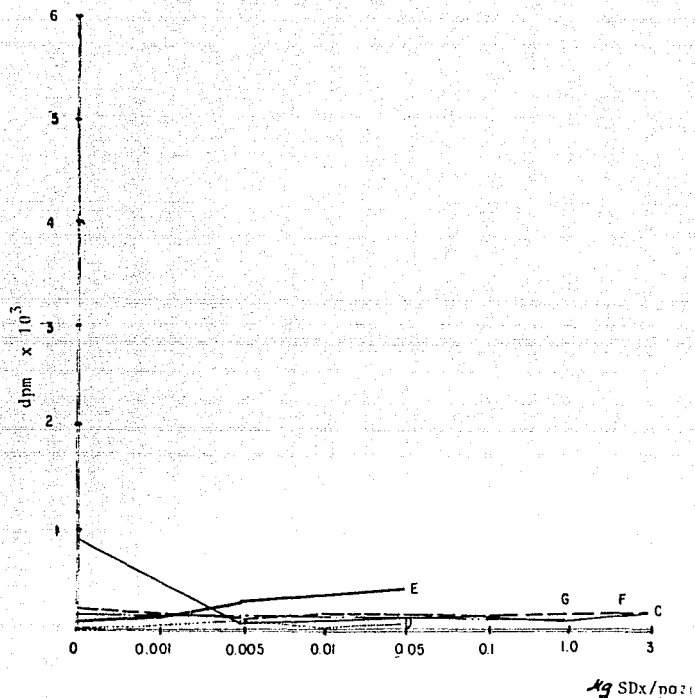
Concentración microgramos por pozo	14			B			C			n	$\bar{x}_{I.M.}$	D.E.-I.M.
	dpm	I.M.	%rosetas	dpm	I.M.	%rosetas	dpm	I.M.	%rosetas			
Testigo	1656		60	1313		64	87		60			
0.05							90	0.1		1		
0.1							85	0.0		1		
0.2				1117	0.8					1		
0.6				957	0.7					1		
1.0	1752	1.0		1157	0.8					2	0.9	0.1
3.0				1065	0.8		55	0.0		2	0.4	0.4
5.0				866	0.6		88	0.1		2	0.3	0.2
10.0							99	0.1		1		



Grafica C.- Estimulación de linfocitos B inducida con PPD (derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*).

Tabla D.- Estimulación de linfocitos B inducida con Sulfato de Dextran.

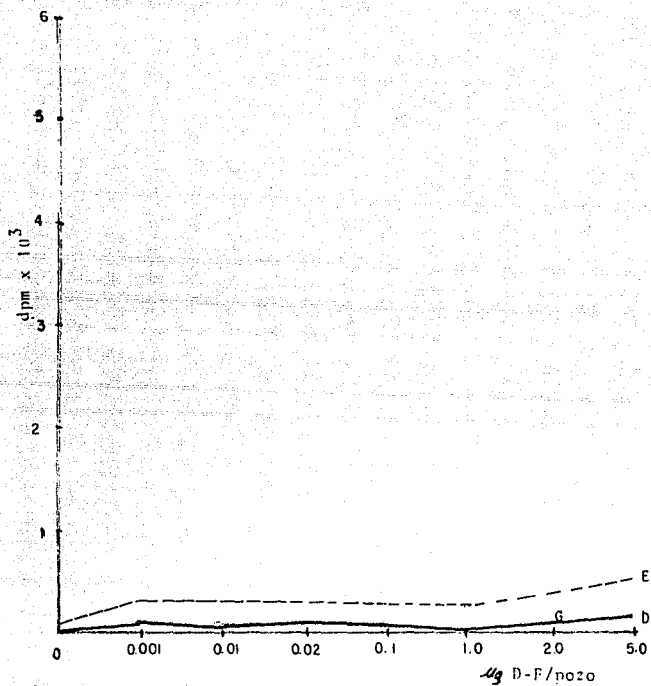
Concentración microgramos por pozo	C			D			E			F			G			n	\bar{x} I.M.	D.E. I.M.
	dpm	I.M.	%ros.	dpm	I.M.	%ros.	dpm	I.M.	%ros.	dpm	I.M.	%ros.	dpm	I.M.	%ros.			
Testigo	875		60	40		64	94		64	174		64	153		64			
0.001				43	1.0		162	1.7					154	1.0		3	1.2	0.3
0.005		57	0.0				276	3.0		122	0.7					4	1.4	1.1
0.01				32	0.8					163	0.9		126	0.8		3	0.8	0.04
0.05				46	1.1		397	4.0								2	2.5	1.4
0.1		119	0.1							132	0.7		89	0.5		3	0.4	0.2
1.0		90	0.1							164	0.9		99	0.6		3	0.5	0.3
3.0		173	0.1							184	1.0					2	0.5	0.4



Grafica D.- Estimulación de linfocitos B inducida con Sulfato de Dextran. (SDx)

Tabla E.- Estimulación de linfocitos B inducida con DNP-Lys-Picoll.

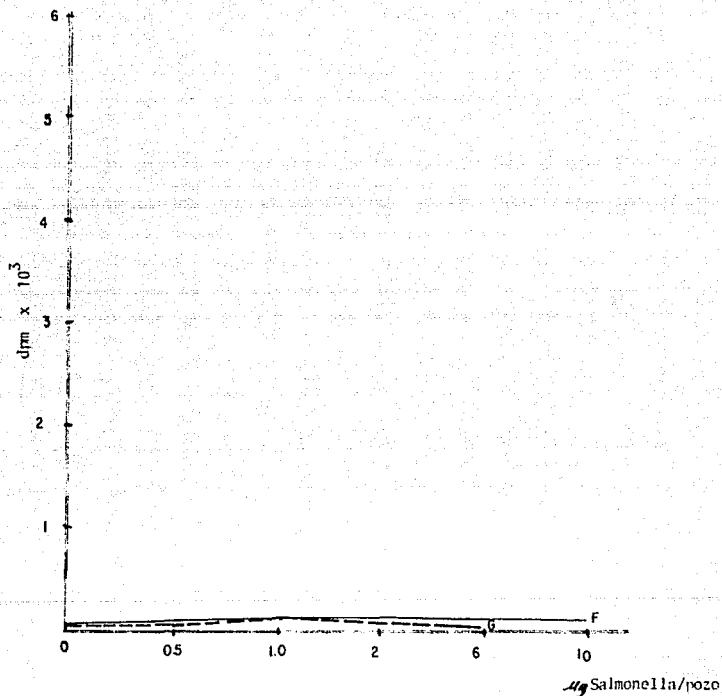
Concentración	dpm	I.M.	^D %rosetas	dpm	I.M.	^E %rosetas	dpm	I.M.	^G %rosetas	n	\bar{x} _{I.M.}	D.E. _{I.M.}
microgramos por pozo												
Testigo	40		64	94		64	153		64			
0.001	132	3.3		335	3.5		91	0.5		3	2.4	1.3
0.01	50	1.2		323	3.4		96	0.6		3	1.7	1.2
0.02	98	2.4								1		
0.1	77	1.9		260	2.7					2	2.3	0.4
1.6	32	0.8		246	2.6					2	1.7	0.9
2.0							71	0.4		1		
5.0	131	3.2		478	5.0					2	4.1	0.9



Grafica-E.- Estimulación de linfocitos B inducida con DNP-Lys_Ficol1. (D-F)

Tabla F.- Estimulación de linfocitos B inducida con lipopolisacarido de Salmonella.

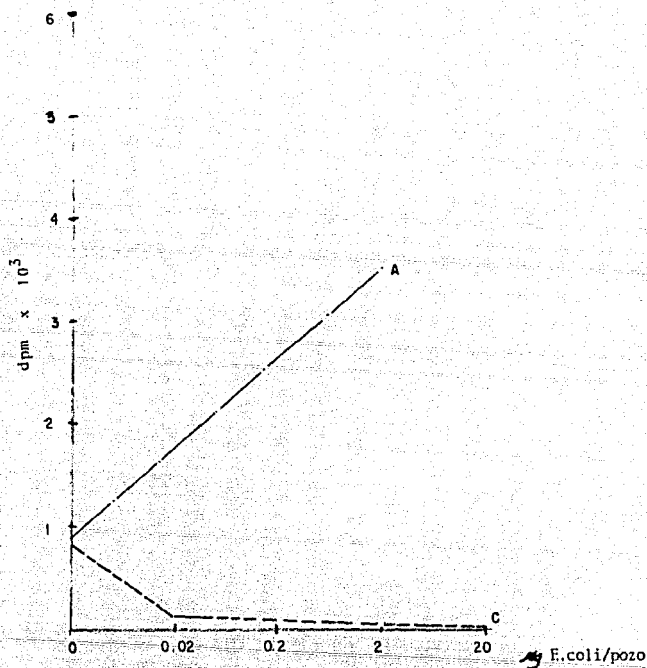
Concentración	dpm	I.M. ^F	%rosetas	dpm	I.M. ^G	%rosetas	n	$\bar{x}_{I.M.}$	D.E.I.M
microgramos por pozo	174		64	153		64			
Testigo	174		64	153		64			
0.5				78	0.5		1		
1.0				106	0.6		1		
2.0	169	0.9					1		
6.0	159	0.9		78	0.5		2	0.7	0.2
10.0	130	0.7					1		



Grafica F.- Estimulación de linfocitos B inducida con Lipopolisacarido de Salmonella.

Tabla G.- Estimulación de linfocitos B inducida con lipopolisacarido de Escherichia coli (E. coli).

Concentración	dpm	I.M.	A %rosetas	dpm	I.M.	C %rosetas	n	\bar{x} I.M.	D.E. I.M.
microgramos por pozo									
Testigo	956		60	875		60			
0.02				99	0.1		1		
0.2				89	0.1		1		
2.0	3532	3.6		77	0.0		2	1.8	1.8
20				56	0.0		1		



Grafica G.- Estimulación de linfocitos B inducida con lipopolisacarido de Escherichia coli(E. coli).

Tabla I.- Titulación del conjugado anti-inmunoglobulina humana-peroxidasa.

Dilución del conjugado pozo	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
A	2.11	2.11	2.09	2.02	1.7
B	0.36	0.14	0.10	0.09	0.07
C	0.61	0.12	0.09	0.07	0.06
D	0.54	0.28	0.19	0.10	0.04

A = forrado con Gama-globulina-humana.

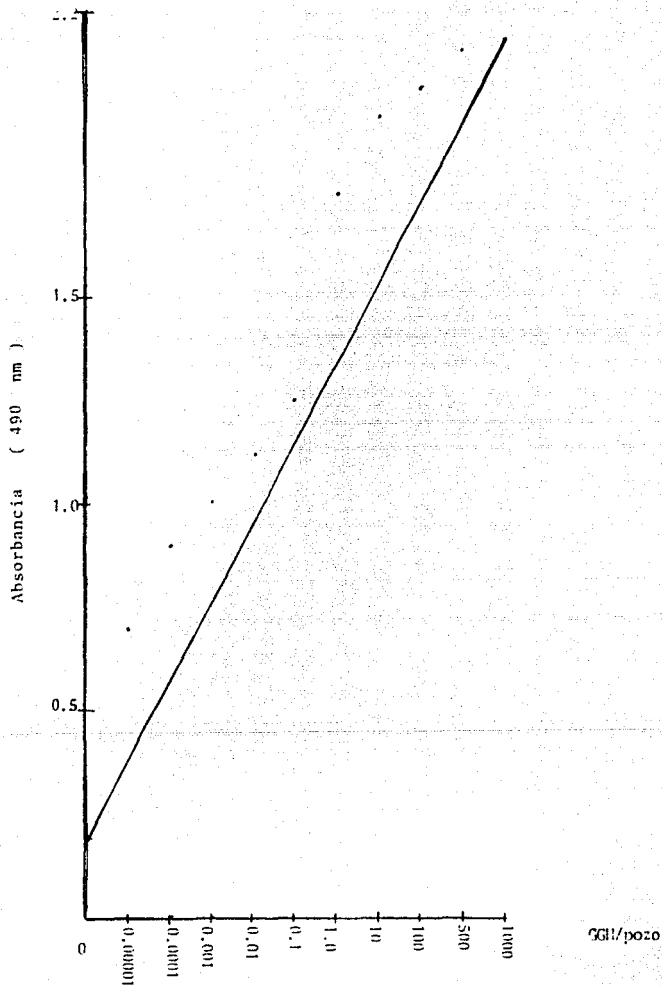
B = forrado con anti-gama-globulina-humana obtenida en borrego

C = forrado con medio de cultivo.

D = forrado con amortiguador de boratos.

Tabla II.- Curva de calibración de Gama Globulina Humana (GGH) en ELISA.

Concentración µg GGH /pozo	Densidad Óptica
0	0.18
0.00001	0.70
0.0001	0.9
0.001	1.01
0.01	1.12
0.1	1.25
1.0	1.75
10	1.94
100	2.02
500	2.10
1000	2.11



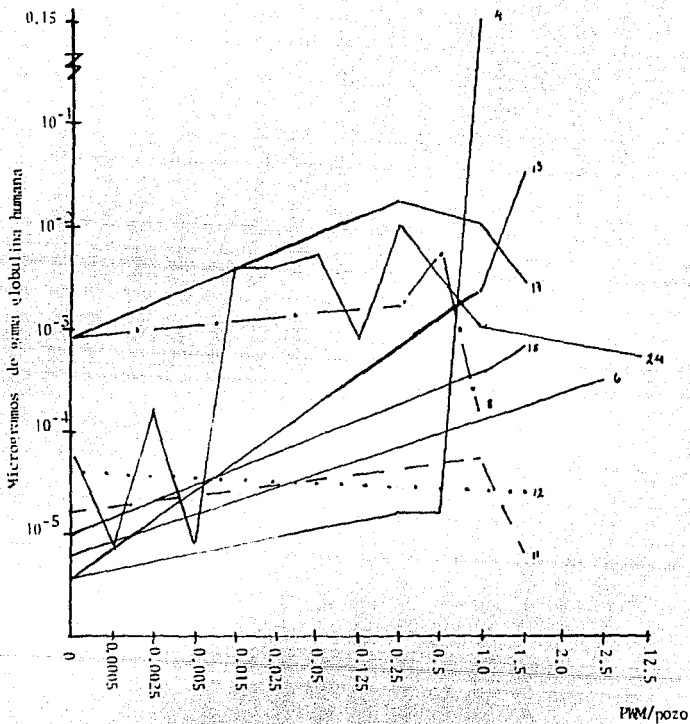
Grafica 11.-Curva de calibración de Gama Globulina Humana (GGH) en ELISA.

Tabla III.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con fitolaca americana (PWM).

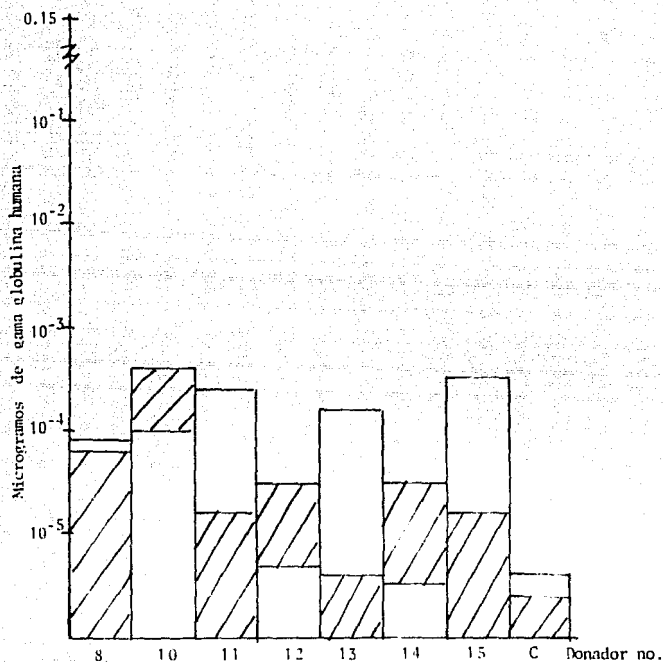
Concentración microgramos por pozo	4 μg GGH	6 μg GGH	8 μg GGH	11 μg GGH	12 μg GGH	13 μg GGH
Testigo	6×10^{-6}	8×10^{-6}	9×10^{-4}	2×10^{-5}	6×10^{-5}	6×10^{-6}
0.0005						
0.0025						
0.005						
0.015						
0.025						
0.05						
0.125						
0.25	2×10^{-5}		2×10^{-3}			
0.5	2×10^{-5}		7×10^{-3}			
1.0	1×10^{-1}		2×10^{-4}	7×10^{-5}		4×10^{-2}
1.5				8×10^{-6}	4×10^{-5}	5×10^{-2}
2.5		5×10^{-4}				
12.5						

Tabla III.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con fitolaca americana (PWM).

Concentración microgramos por pozo	15 µg GGII	17 µg GGII	24 µg GGII	n	\bar{x}	D.E.
Testigo	1×10^{-5}	9×10^{-4}	8×10^{-5}	9	2.2×10^{-4}	3.6×10^{-4}
0.0005			9×10^{-6}	1		
0.0025			2×10^{-4}	1		
0.005			9×10^{-6}	1		
0.015			6×10^{-3}	1		
0.025			6×10^{-3}	1		
0.05			7×10^{-3}	1		
0.125			9×10^{-4}	1		
0.25		2×10^{-2}	1×10^{-2}	4	1.8×10^{-3}	7.8×10^{-3}
0.5				2	3.5×10^{-3}	3.4×10^{-3}
1.0	6×10^{-4}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	7	2.0×10^{-2}	5.0×10^{-2}
1.5	8×10^{-4}	4×10^{-3}		5	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-2}
2.5				1		
12.5			7×10^{-4}	1		



Grafica III.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con fitolaca americana (PWM).



Grafica V.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con Con canavalina A (2 μ g por pozo)

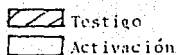


Tabla IV.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con *Brucella abortus*.

Concentración microgramos por pozo	10 GGH
Testigo	6×10^{-4}
1.0	9×10^{-4}
2.5	2×10^{-3}
5.0	5×10^{-4}
10	9×10^{-4}
20	3×10^{-3}

Tabla V. - Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con Concanavalina A (2 μ g por pozo).

No. de Individuos	Concentración μ g GGII	T concentración μ gGGH
8	9×10^{-4}	8×10^{-4}
10	1×10^{-4}	6×10^{-4}
11	4×10^{-4}	2×10^{-5}
12	7×10^{-6}	5×10^{-5}
13	2×10^{-4}	6×10^{-6}
14	5×10^{-6}	5×10^{-5}
15	5×10^{-4}	2×10^{-5}
C	6×10^{-6}	4×10^{-6}
$n_T = 9$	$\bar{X}_T = 3 \times 10^{-2}$	D.E. _T = 9×10^{-2}
$n = 9$	$\bar{X} = 6 \times 10^{-2}$	D.E. = 1.8×10^{-2}

Tabla VI.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con DNP-Lys- Ficoll.

Concentración microgramos por pozo	6 μg GGH	10 μg GGH	11 μg GGH	C μg GGH	n	\bar{x}	D.E.
Testigo	5×10^{-6}	5×10^{-5}	1×10^{-5}	4×10^{-4}	4	1.1×10^{-4}	1.6×10^{-4}
0.002			1×10^{-4}		1		
0.004			4×10^{-4}		1		
0.006			3×10^{-4}		1		
0.008			1×10^{-1}		1		
0.1		2×10^{-6}		9×10^{-5}	2	4.0×10^{-5}	4.4×10^{-5}
2.0	5×10^{-5}				1		
2.5		6×10^{-5}			1		
5.0		2×10^{-5}		3×10^{-5}	2	2.5×10^{-5}	5.0×10^{-6}

Tabla VII.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con lipopolisacrido de Salmonella.

Concentración microgramos por pozo	⁶ μg GGII	⁹ μg GGII	¹⁰ μg GGII	n	\bar{x}	D.E.
Testigo	5×10^{-6}	6×10^{-1}	5×10^{-4}	3	2×10^{-1}	2×10^{-1}
2.0		1×10^{-1}	9×10^{-4}	2	7×10^{-2}	7×10^{-2}
20	7×10^{-5}			1		
60		9×10^{-2}	1×10^{-3}	2	4×10^{-2}	4×10^{-2}
100	8×10^{-5}	6×10^{-1}	5×10^{-4}	3	2×10^{-1}	2×10^{-1}

Tabla VIII.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con PPD (derivado proteico purificado de M. Tuberculosis).

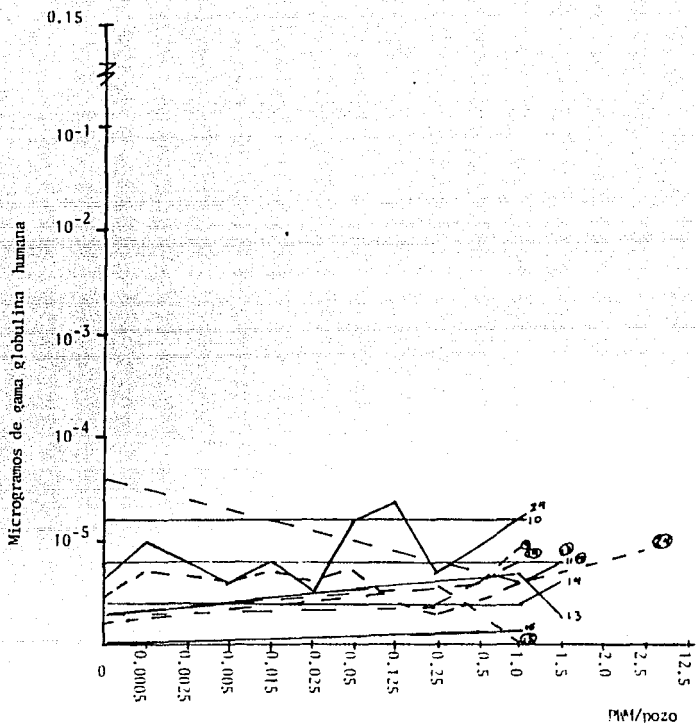
Concentración microgramos por pozo	⁶ µg GGH	¹³ µg GGH	¹⁴ µg GGH	n	\bar{x}	D.E.
Testigo	5×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-6}	3	$3,7 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-6}$
0.6			6×10^{-6}	1		
1.0		6×10^{-6}		1		
5.0	9×10^{-5}			1		
10	8×10^{-4}			1		

Tabla IX.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con Sulfato de Dextran.

Concentración microgramos por por pozo	11 y GGH
Testigo	1×10^{-5}
0.2	2×10^{-2}
0.4	8×10^{-6}
0.6	3×10^{-2}

Tabla XI.- Determinación de anticuerpos específicos anti-DMP por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con fitolaca americana (PWL).

Concentración microgramos por pozo	9 μg Ac.	10 μg Ac.	13 μg Ac.	14 μg Ac.	15 μg Ac.	24 μg Ac.	n	\bar{x}	D.E.
Testigo	2×10^{-6}	8×10^{-6}	6×10^{-6}	3×10^{-6}	3×10^{-6}	4×10^{-6}	6	4.3×10^{-6}	2.1×10^{-6}
0,0005						7×10^{-6}	1		
0,0025									
0,005						6×10^{-6}	1		
0,015						7×10^{-6}	1		
0,025						6×10^{-6}	1		
0,05						7×10^{-6}	1		
0,125						4×10^{-6}	1		
0,25				4×10^{-6}	6×10^{-6}	3×10^{-6}	3	4.3×10^{-6}	1.2×10^{-6}
0.5	6×10^{-6}						1		
1.0	9×10^{-6}	8×10^{-6}	6×10^{-6}	8×10^{-6}	0	6×10^{-6}	6	6.2×10^{-6}	3.0×10^{-6}
1.5			8×10^{-6}				1		
2.5									
12.5						9×10^{-6}	1		



Gráfica X y XI.- Determinación de anticuerpos específicos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con fitolaca americana (PWM).

— anti- ac. sulfanilico
 - - - - anti-DNP

Tabla XII.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con lipopolisacárido de Salmonella, DNP-Lys-Ficol1, PPD (derivado proteico purificado de M. tuberculosis) y Brucella abortus.

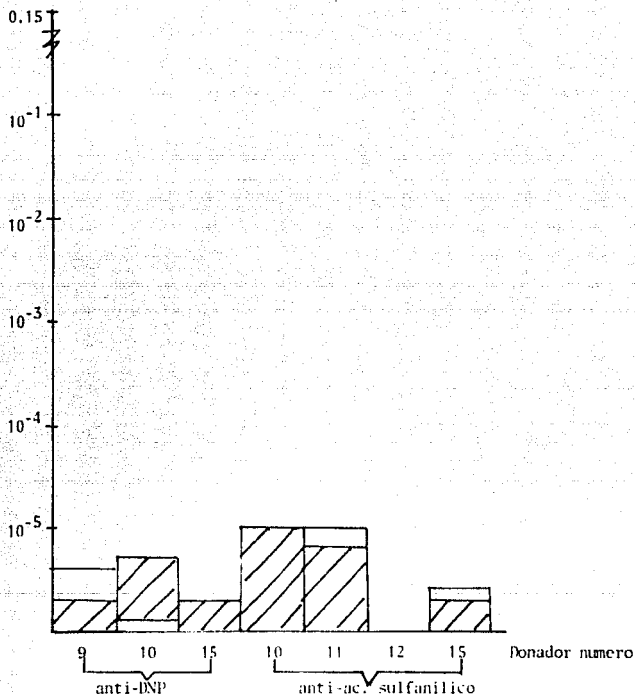
Antígeno	Concentración microgramos por pozo	anti-ac. sulf. µg Ac.	anti-DNP µg Ac.		n	\bar{x}_{DNP}	D.E. DNP
DNP-Ficol1	Testigo	10	9	10	2	5.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
		2×10^{-5}	3×10^{-6}	7×10^{-6}			
		3×10^{-5}	2×10^{-6}	5×10^{-6}			
		5×10^{-6}	9×10^{-6}	5×10^{-6}			
Salmonella	Testigo	10	10		1	7.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
		2×10^{-5}	8×10^{-6}				
		2.0	8×10^{-6}				
		60.	6×10^{-6}				
PPD	Testigo	13	13		1	7.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
		3×10^{-6}	6×10^{-6}				
B. abortus	Testigo				1	7.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
		1.0	4×10^{-6}	6×10^{-6}			
				8×10^{-6}			
		1.0		4×10^{-6}			
		2.5		9×10^{-6}			
			7×10^{-6}				
			6×10^{-6}				

Tabla XIII.- Determinación de anticuerpos específicos anti-DNP por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con Concanavalina A (2 μ g por pozo).



No. de individuos	Concentración μ g Ac.	T concentración μ g Ac.
9	6×10^{-6}	3×10^{-6}
10	1×10^{-5}	7×10^{-6}
15	3×10^{-6}	3×10^{-6}
$n = 3$	$x = 6.3 \times 10^{-6}$	D.E. = 2.9×10^{-6}
$n_T = 3$	$x_T = 4.3 \times 10^{-6}$	D.E. _T = 1.8×10^{-6}

Tabla XIV. - Determinación de anticuerpos específicos anti-ac. su
fanílico por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos
totales estimulados con Concanavalina A (2 μ g por pozo).

No. de individuos	Concentración μ g Ac.	T concentración μ g Ac.
10	1×10^{-5}	1×10^{-5}
11	1×10^{-5}	8×10^{-6}
12	0	0
13	4×10^{-6}	3×10^{-6}
$n = 4$	$x = 6 \times 10^{-6}$	D.E. = 4.2×10^{-6}
$n_T = 4$	$x_T = 5.3 \times 10^{-6}$	D.E. _T = 4×10^{-6}



Grafica XIII y XIV.- Determinación de anticuerpos por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos totales estimulados con Concanavalina A (2 μ g por pozo).

 Festigo
 Activación

DISCUSION

Los experimentos aparentemente muestran que es necesario, para la respuesta a todos los antígenos o mitógenos que se probaron, la cooperación celular ya que sin alguna de las células la proliferación no existe, llegando en algunos casos a un índice mitogénico muy bajo.

A pesar de que los antígenos o mitógenos son timoindpendientes (TI), no requiriendo por tanto de células T, no hubo proliferación. Sin embargo, en algunos casos con células T y B tampoco la proliferación es buena pero al menos se ve que si hay una baja incorporación de timidina. Aunque en este último caso la no activación pudiera deberse a una mala presentación del antígeno. (13, 22)

Como se ha reportado por otros autores (24,25,21) la respuesta con PWM fue dependiente de células T.

Otro antígeno TI como el PPD también se ha probado en humanos y en ratón y se ha demostrado su capacidad de estimular la proliferación con una concentración de 2 microgramos por pozo. (32). En el presente trabajo no fue posible comprobar esto ni con la población celular completa como se ha reportado ni con células B puras. Esto pudiera deberse a que las personas no son tuberculina (+) y no tienen las suficientes clonas para que se pueda observar una respuesta.

Con respecto al antígeno TI DNP-Lys-Ficol1, también se tienen reportes, aunque solo en ratón, en los que si hay respuesta y esta no depende de los linfocitos T, aunque la respuesta es pobre (14, 15). Al tratar de reproducir estos resultados en humanos y con las concentraciones usadas en ratón no se lo gran activar a las células B.

El sulfato de dextran se ha usado para activar linfocitos B tanto en humanos como en ratón sin tener ninguna respuesta. (16, 17, 28) Sin embargo en este trabajo si se tuvo respues

ta, aunque esta se logró solo con la población completa. Esto tal vez podría indicar que en humanos es un activador de células B dependiente de la participación de otra población celular probablemente linfocitos T.

Con lipopolisacarido de Salmonella, E. coli y Nocardia se ha encontrado que si estimulan la proliferación de linfocitos B humanos en la ausencia de células T, aunque la producción de inmunoglobulina sin células T es baja. (20) En este trabajo no se encontró proliferación sin la cooperación celular.

Es importante notar que existe una gran variabilidad en la incorporación de timidina entre los diferentes individuos y en su respuesta al antígeno, aunque se usan las mismas concentraciones del antígeno o mitogeno, cada individuo responde de manera diferente.

En algunas gráficas o tablas se observa que solo hay un dato o dos la cual no es suficiente información para obtener algunas conclusiones, esto se debe a que en algunas ocasiones se perdían pozos de toda una placa por contaminación o muerte celular y por lo tanto se perdían datos para tener una curva dosis-respuesta completa.

Otra razón por la que no obtuvimos activación con los antígenos TI pudiera ser debido a que en la sangre periférica humana solo existen formas inmaduras por lo cual solo responderían a antígenos TI-1 y no a antígenos TI-2, aunque ni con los TI-1 ni con los TI-2 hubo activación en linfocitos B. (32)

Como mencionamos con el lipopolisacarido de E. coli no hubo respuesta, ni con el de Nocardia, a pesar de que se consideraban excelentes activadores de B en ratón, pero también se ha reportado que no activan adecuadamente a células B humanas por el efecto toxico del lipopolisacarido o por los componentes en que se disuelve. (32)

También se ha reportado que cuando hay una gran cantidad de células supresoras no se obtiene activación, lo cual tal vez

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

hubiera sucedido en algunos de los casos aquí presentados en los que se tuviera una proporción mayor de células supresoras que células B. (32)

En el caso en que teníamos a los linfocitos B puros y que no hubo activación tal vez pudiera deberse a que no existían los factores de crecimiento derivados de linfocitos T o macrófagos (23,13) o a que las células B sufrieron algun daño durante el proceso de proliferación-

A pesar de no haber logrado una estimulación adecuada en algunos casos, sea por la fuente celular o por el tipo de activador empleado, se lograron establecer las condiciones requeridas para el manejo y cultivo de distintas poblaciones celulares derivadas de sangre periférica humana. Es necesario, sin embargo, investigar aun si la proliferación puede inducirse en otros rangos de concentración del activador, modificando la calidad del mismo, o bien, estableciendo condiciones de manejo de células que causen un menor daño a su viabilidad o funcionalidad.

De esta manera, una vez establecido un modelo adecuado de activación, este sera muy útil para posteriormente estudiar los mecanismos tan complejos que envuelve la respuesta de activación de linfocitos B humanos tanto en respuestas inmunes normales como en enfermedades inmunológicas. (29)

Para detectar la formación de inmunoglobulinas se probaron varios métodos como la técnica de Cunningham, pero se vieron algunas desventajas como la variación en la susceptibilidad de los eritrocitos a la lisis y la poca reproducibilidad al sensibilizar los eritrocitos, por lo tanto se decidió usar la técnica de ELISA, ya que además es un método muy sensible, sin muchos problemas técnicos y el cual se ha probado en ratones, (24, 30) y en humanos (7,23,31).

La producción de anticuerpos es un evento posterior a la incorporación de timidina y que no podemos comparar entre si ya que en la incorporación de timidina hay un mayor número de células viables y en la técnica de ELISA como se deja de 5 a

6 días hay mas muerte celular y por tanto menor número de células que produzcan anticuerpos.

Existen en la literatura reportes donde se encuentra activación sin producción de anticuerpos; esto es perfectamente explicable puesto que para la proliferación se requieren de algunas señales de activación mientras que la producción de anticuerpos requiere fundamentalmente de señales de diferenciación las cuales llevan a un linfocito B que ya ha proliferado a un proceso de diferenciación que culmina en la aparición de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Así existen antígenos que sostienen bien la proliferación pero que no son capaces de estimular la diferenciación mientras que otros antígenos promueven ambos procesos. En ratón se ha reportado que la anti-mu activa proliferación sin diferenciación mientras que el lipopolisacárido puede activar ambos procesos. Estas cuestiones han sido pobremente estudiadas en los linfocitos B humanos - con todos los problemas técnicos y de interpretación mencionados anteriormente. (32)

CONCLUSIONES

- 1.- Con las poblaciones completas se obtuvo respuesta hacia pokeweed, Salmonella y sulfato de dextran, con los demas antígenos o mitógenos se obtuvieron respuestas pobres o negativas con las concentraciones usadas.
- 2.- Con las poblaciones enriquecidas de linfocitos B se obtuvieron respuestas muy pobres con todos los antígenos o mitógenos.
- 3.- Los activadores utilizados indujeron la producción de anticuerpos policlonalmente.
- 4.- No se encontraron anticuerpos específicos anti-DNP o anti-ácido sulfanílico .

RESUMEN

Una función primordial del Sistema Inmune es el mantenimiento de la integridad de los individuos. Para entender su funcionamiento se requiere del estudio particular de cada uno de los elementos que constituyen a dicho sistema.

Entre estos constituyentes, el linfocito B es de los que mas recientemente se han comenzado a estudiar, denotando cierta heterogeneidad.

Con el fin de establecer un sistema de trabajo de linfocitos B se estudio el comportamiento de células mononucleares de sangre periferica y de poblaciones enriquecidas de células B al enfrentarlos a diferentes antígenos y mitógenos. Para ello se midió la proliferación inducida por cada antígeno o mitógeno y la producción de anticuerpos.

Las células mononucleares respondieron en algunos casos hacia los activadores utilizados. Sin embargo, la respuesta obtenida con la población enriquecida de linfocitos B fue muy pobre o negativa.

Se obtuvo la producción de anticuerpos al estimular con todos los antígenos o mitógenos, aunque esta estimulación fue policlonal y no se pudo demostrar una respuesta antígeno-especifica.

VOCABULARIO

E.N.C.B.	=	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
I.S.E.T.	=	Instituto de Salubridad de Enfermedades Tropicales
I.P.N.	=	Instituto Politecnico Nacional
S . S.	=	Secretaría de Salud
U. T.	=	Unidades de tuberculina
u. I.	=	Unidades internacionales
μ l	=	microlitros
μ g	=	microgramos
μ	=	micras

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Manual de practicas de Inmunologia. 1983. Elaborado por personal del IPN
- 2.- Bach, 1984. Inmunologia. Ed. Limusa. México. 1a. edicion. pp 14, 65-66, 76-79.
- 3.- Nossal G.J.V. (1985). Perspectives on the regulatory biology of the B lymphocyte. *Folia Microb.* 30; 191-195.
- 4.- Hernandez G.B. Biologia del linfocito B. Revision bibliografica para obtener el titulo de Q.B.P. Mexico 1985. E.N.C. B. I.P.N.
- 5.- Eisen N.H. Inmunologia. en Tratado de Microbiologia de Davis. Dulbecco y otros. México 1980, 2a edicion. Ed. Salvat. pp 351-355.
- 6.- Parkhouse R.M.E. (1980). Differentiation of the B lymphocyte en Molecule, cells and parasites in Immunology, Ed. Academic Press N.Y., pp 43-52
- 7.- Tlaskalova, Bartova y Hanikgrova. (1985). Stimulation of human blood lymphocyte by different polyclonal B cell activators of bacterial and plant origin: production of IgM, IgG and IgA estimated by the ELISA method. *Folia Microb.* 30; 258-266
- 8- Raff M.C., Megson M., Owen J.J. y Cooper M.D. (1976). Early production of intracellular IgM by B lymphocyte precursors in mouse. *Nature* 259; 224- 226.
- 9.- Sher J. (1981). B lymphocyte ontogeny. *Crit. Rev. Immun.* 1; 283- 320.
- 10.- Teale J.M. (1982). The relationship between pre-B and primary B cells. *Immun. Today* 3; 62-63.
- 11.- Osmond D.G. (1979). Generation of B lymphocytes in the bone marrow en B lymphocytes in the immune response. M.Cooper,

- Mosier I. and Vitetta. E. Elsevier North Holland. pp 63-70.
- 12.- Baum M. and Davie J.M. (1980). B cell subsets: functional and structural characteristics. *Crit. Rev. Immun.* 5; 349-370.
 - 13.- Mosier D.E. and Subbarao. (1982). Thymus independent antigen; complexity of B lymphocyte activation revealed. *Immun. Today* 3; 217-222.
 - 14.- Mosier D.E., Johnson B.M. and McMaster P.R. (1974). Cellular requirement for the primary in vitro antibody response to DNP-Ficoll. *J. Exp. Med.* 139; 1354-1359.
 - 15.- Sharon R., McMaster P.R. and William P. (1975). DNP-Lys-Ficoll: a T-independent antigen which elicits both IgM and IgG anti-DNP antibody secreting cells. *J. Immun.* 114 ; 1585-1589
 - 16.- Fernandez C. and Moller G. (1977). Immunological unresponsiveness to thymus-independent antigens: two fundamentally different genetic mechanisms of B- cell unresponsiveness to Dextran. *J. Exp. Med.* 146; 1663-1677.
 - 17.- Murray P.D. and Kagnoff M.F. (1987). Regulation of the anti α (1,3) Dextran response: two populations of Dextran-reactive B cells that differ in their T cell requirements for induction to antibody synthesis. *J. Immun.* 138; 2439-2444.
 - 18.- Yancopoulos G.D. and Frederick W.A. (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Ann.Rev. Immun.* 4; 339-368
 - 19.- Honda M. and Steinberg D.A. (1985). Production and characterization of a unique monoclonal antibody against human B cells. *Cell. Immun.* 93; 105 - 123.
 - 20.- Mc Chesney, Froelich M.B. and William Jr. (1985). Salmonella typhimurium mitogen induces proliferation of human B lymphocytes. *Cell. Immun.* 93; 83-90.
 - 21.- Peter M. and Fauci A. (1982). Factor induced antigen-speci

- cific human B cell responses. *Cell Immun.* 54; 678-681.
- 22.- Kashiwa, Wright and Bonavida. (1987). Regulation of B cell maturation and differentiation. *J. Immun.* 138; 1383-1390.
- 23.- Crevonn, Vazquez A. (1987). Antigen-induced and polyclonal B cell responses in human peripheral blood lymphocyte cultures *Cell Immun.* 106; 234-241
- 24.- Lane C.H., Whalen G. and Fauci A.S. (1981). In vitro antigen-induced, antigen-specific antibody production in man. *J. Exp. Med.* 154; 1043-1052.
- 25.- Fauci A.S., Whalen G. and Burch C. (1980). Activation of human B lymphocytes. *Cell Immun.* 54; 230-240.
- 26.- Sultzer B.N. and Nilsson B.S. (1972). PPD tuberculin a B cell mitogen. *Nature New Biol.* 240; 198-200.
- 27.- Moller G. (1970). Induction of DNA synthesis in human lymphocytes: interaction between non-specific mitogens and antigens *Immun.* 19; 583-598.
- 28.- Fauci A.S. and Pratt K. (1976). Activation of human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 144; 674-684.
- 29.- Fauci A.S. and Pratt K. (1976). Polyclonal activation of bone marrow derived lymphocytes from human peripheral blood measured by a direct plaque-forming cell assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73; 3676-3679.
- 30.- Sedgwick J.D. and Holt G.P. (1986). The ELISA-plaque assay for the detection and enumeration of antibody-secreting cells. *J. Immun. Meth.* 87; 37-44.
- 31.- Volkman D.J., Lane H.C. and Fauci A.S. (1981). Antigen - induced in vitro antibody production in humans; a model for B cell activation and immunoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 78; 2528 -2531.
- 32.- Santos Argumedo L. Tesis Predoctoral, 1985. ENCB IPN.