

302827

UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

3

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

2ej



LA TRANSFORMACION LINFOCITARIA EN EL  
DIAGNOSTICO DE LA ALERGIA A MEDICAMENTOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A

**OFELIA GAYOL VIVAR**

MEXICO, D. F.

1992



## **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

Pag.

### CAPITULO (I)

#### INTRODUCCION

1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2	HIPOTESIS	2
1.3	OBJETIVO	2

### CAPITULO (II)

#### INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

2.1	ANTECEDENTES HISTORICOS	3
2.2	RESPUESTA INMUNE	4
2.3	ALERGIA A MEDICAMENTOS DE TIPO I, II, III Y IV	5
2.4	PRUEBAS "IN-VIVO" E "IN-VITRO" PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ALERGIA A MEDICAMENTOS.	12
2.5	TRANSFORMACION LINFOCITARIA	16
2.6	MITOGENOS	21
2.7	RECEPTORES Y SU INTERACCION CON DROGAS EN LA TRANSFORMACION LINFOCITARIA.	26
2.8	RECEPTORES ADRENERGICOS Y DE ACTIVACION	33

## **CAPITULO (III)**

### **PARTE EXPERIMENTAL**

<b>3.1</b>	<b>DIAGRAMA EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO</b>	<b>37</b>
	3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	37
	3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO	38
	3.2.3 REACTIVOS	39
	3.2.4 EQUIPO	40
	3.2.5 PREPARACION DE REACTIVOS	40
<b>3.3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>CALCULOS ESTADISTICOS</b>	<b>51</b>

## **CAPITULO (IV)**

### **RESULTADOS Y DISCUSION**

<b>4.1.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>4.2.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>62</b>

## **CAPITULO (V)**

	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>

## **CAPITULO (I)**

### **INTRODUCCION**

## 1.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los medicamentos y sus metabolitos producen reacciones alérgicas debido a su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria.

Básicamente, dos grupos de factores parecen influir en el desarrollo de la hipersensibilidad medicamentosa 1) factores del medicamento, y 2) factores del huésped.

Actualmente la alergia a medicamentos en la población mexicana, se ha visto incrementada debido al uso desmedido de medicamentos con o sin prescripción médica, contaminación ambiental y factores genéticos. (4).

La alergia a medicamentos es independiente de las propiedades farmacológicas de las drogas, pero altamente dependiente de la facilidad con la cual el medicamento, o sus metabolitos interactúan con los receptores para fijarse a proteínas tisulares y luego funcionar como inmunógeno completo.

Los receptores pueden ser antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y receptores adrenérgicos de células blanco.

Los medicamentos que inician manifestaciones alérgicas suelen ser productos químicos de bajo peso molecular y que, por lo tanto, no son inmunógenos por sí mismos.

Actúan como haptenos y se unen covalentemente con proteínas vía-lisina de los antígenos de clase I (HLA-A, HLA-B15, HLA-B<sub>35</sub>) formándose el complejo - droga - CMH, volviéndose inmunógeno. El ejemplo típico de ello es la penicilina. (6)

El laboratorio de inmunología clínica tiene una serie de metodologías que abarcan pruebas "in-vivo" como la prueba cutánea y pruebas "in-vitro" como: Factor inhibidor de migración de leucocitos (MIF). Desgranulación de basófilos y liberación de histamina e histamina plasmática; ninguna de éstas pruebas por sí solas evidencian el grado de hipersensibilidad a los medicamentos.

Rocklin y Col. han reportado una técnica de transformación linfocitaria a drogas. Su aplicación en el laboratorio clínico inmunológico es importante para el diagnóstico y control del Asma por medicamentos como: Salicilatos, Fenilbutazona y Cloropropamida. (3)

En éstos estudios sobre la transformación linfocitaria se han reportado incrementos en los índices de estimulación (I.E.) de los pacientes alérgicos a medicamentos, de ahí el interés del servicio de alergia del Hospital del Centro Médico La Raza en adaptar y estandarizar la transformación linfocitaria a medicamentos y, contar con una metodología mas en las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la alergia a medicamentos.

## **1.2.- HIPOTESIS**

Los linfocitos sensibilizados a antígenos son capaces de incrementar su proliferación linfocitaria aumentando la síntesis de DNA la cual es medida por incorporación de Timidina Tritiada.

## **1.3.- OBJETIVO**

El propósito de éste trabajo de investigación es el de estandarizar la técnica de transformación linfocitaria, utilizando como antígenos a los medicamentos, para medir la proliferación linfocitaria de los linfocitos estimulados. Obtener los valores de referencia en la transformación linfocitaria de una población normal sin antecedentes alérgicos y compararla con la población alérgica a medicamentos; y finalmente correlacionar otras técnicas inmunológicas utilizadas para el diagnóstico de la alergia a medicamentos.

## **CAPITULO (II)**

### **INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA**



## 2.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS

En 1960 Nowel demostró que el Phaseolos Vulgaris un mitógeno llamado Fitohemaglutinina (PHA-P) era capaz de estimular a los linfocitos, transformándolos en células parecidas a blastos grandes.

En 1963, Permain, Licette y Fitzgerald, utilizaron la transformación linfocitaria como ayuda en el diagnóstico de hipersensibilidad a drogas; demostrando que, no sólo los mitógenos como la Fitohemaglutinina (PHA-P) la Concanavalina (Co-A) y la Fitolaca (P.W.M.) son capaces de estimular a los linfocitos, incrementando la transformación linfocitaria. (9, 24)

Otros investigadores como Hirschorn y Col. reportaron que los linfocitos, de individuos con hipersensibilidad dérmica retardada a la tuberculina (P.P.D.) eran estimulados "in-vitro" mediante exposición al antígeno, mientras que los linfocitos de individuos no sensibilizados no eran estimulados. (4)

Esta estimulación específica mas tarde fué confirmada por Bain y Col. Por lo tanto sugirieron que no sólo los mitógenos son capaces de estimular a los linfocitos: sino también la presencia de otras sustancias antigénicas como :

- a) Alimentos
- b) Medicamentos
- c) Pólenes
- d) Mohos
- e) Picaduras de abeja
- f) Vacunas
- g) Sueros

En 1971, Rocklin sugiere que la estructura química de los medicamentos es capaz en algunos casos de estimular a los linfocitos sensibilizándolos; ya sea para producir linfocinas (LIF), interleucina-1, o bien incrementar la transformación linfocitaria.

Fred A. Gill reporta índices de estimulación (I.E.) de la transformación linfocitaria a medicamentos y transformación espontánea en pacientes alérgicos a la penicilina, además describe la presencia de un factor humoral presente durante la reacción alergia, el cual desaparece en la fase de remisión. (5, 9)

## 2.2.- RESPUESTA INMUNE

El encuentro entre una sustancia extraña y un huésped, va seguido de la inducción de una respuesta inmunitaria, el huésped se encuentra entonces, preparado o alterado. Si ocurre contacto posterior con el mismo antígeno, la respuesta inmunitaria se dará con mayor rapidez e intensidad (respuesta secundaria o anamnésica), liberando sustancias solubles llamadas linfocinas (mediadores de la inmunidad celular); productos solubles de los linfocitos que son responsables de múltiples efectos de inmunidad celular. (Fig.1) (14)

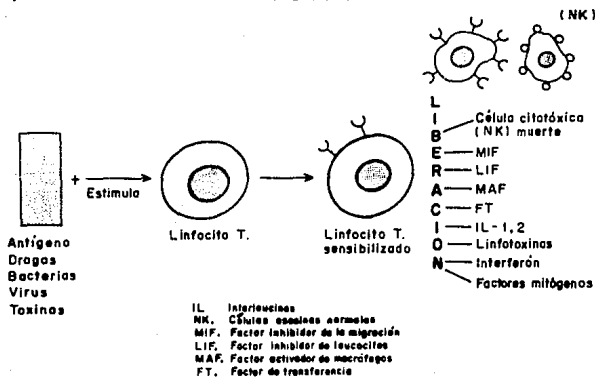


FIG. 1

## **ALERGIA**

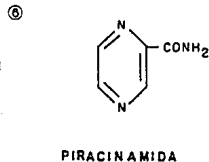
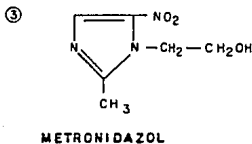
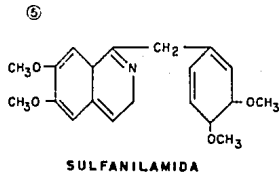
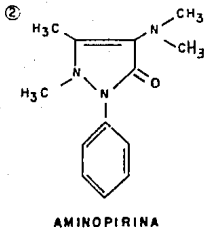
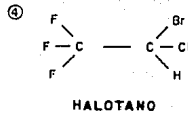
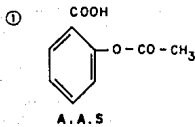
La alergia o hipersensibilidad término dado primeramente por Von Pirquet: se define como la reactividad alterada para un antígeno, susceptible de originar reacciones patológicas cuando un huésped sensibilizado se expone al antígeno particular.

Originalmente los efectos patológicos de procesos inmunitarios se separaron en dos reacciones de hipersensibilidad, la inmediata y la tardía, según el tiempo necesario para que se manifestara la reacción después del contacto con el antígeno.

### **2.3.- ALERGIA A MEDICAMENTOS DE TIPO I, II, III y IV**

La alergia a un medicamento en particular es independiente de sus propiedades farmacológicas, pero altamente dependiente de la facilidad con la cual el medicamento o sus metabolitos se enlazan covalentemente con las proteínas portadoras, debido a que la mayoría de medicamentos funcionan inmunitariamente como haptenos por su bajo P.M. y deben acoplarse "in-vivo" a una proteína del huésped para volverse inmunógenas (4)

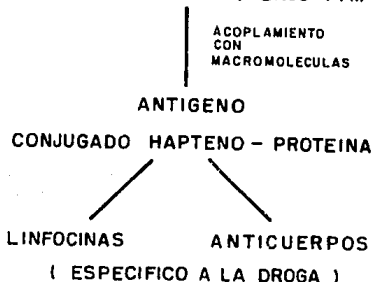
Algunos ejemplos se muestran en las fórmulas 2, 3, 4, 5 y 6.



Existen muchos factores que influyen sobre el potencial alérgico de un medicamento; la administración tópica induce mas sensibilización que la bucal o parenteral, y la inyección intravenosa aumenta el riesgo de la alergia a medicamentos.

## MECANISMO INMUNOQUIMICO EN LA ALERGIA A DROGAS

( AGENTE TERAPEUTICO , BAJO P. M )



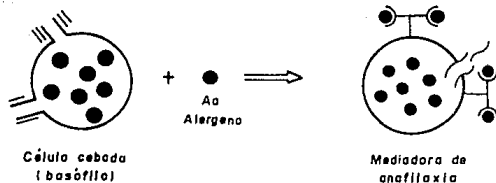
Hay cuatro tipos de hipersensibilidad, algunos autores agregan una quinta, que pueden provocar una reacción alérgica; los diversos mecanismos inmunológicos involucrados en la producción de daño a los tejidos fueron clasificados en 1963 por Gell y Coombs. (4)

**TIPO I ANAFILACTICO.-** Las reacciones alérgicas de éste tipo incluyen la Anafilaxs y Angioedema.

Estas reacciones denominadas de hipersensibilidad inmediata son producidas por sustancias farmacológicamente activas, liberadas por las células de los tejidos, como los basófilos y las células cebadas, después de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo específico. IgE adsorbido a la membrana celular de las células de dicho tejido, desencadenando la liberación de histamina.

Este es el mecanismo responsable de la atopía, y que muchas veces resulta después de la administración del medicamento por inyección o por vía bucal. (9)

## TIPO I HIPERSENSIBILIDAD ANAFILACTICA



**TIPO II CITOTOXICO.**- Son dependientes del complemento y por lo tanto implican a los anticuerpos IgG o IgM.

Dichas reacciones pueden afectar a lo eritrocitos, los leucocitos o las plaquetas.

Existen mecanismos relacionados con la lesión.

(1) El medicamento se fija primero a la membrana celular, seguido por la reacción del anticuerpo con el medicamento antígeno fijado a la célula, dando por resultado el complejo célula-antígeno-anticuerpo.

(2) El complejo anterior activa al sistema del complemento produciendo la lisis de la célula.

La anemia inmuno-hemolítica debido a la penicilina es un ejemplo de este tipo.

En estas reacciones la prueba directa con antiglobulina (prueba directa de coombs) es positiva.

La anemia autoinmunitaria, la leucopenia y trombocitopenia debidas a la quinidina, sulfonamidas y estibofen son ejemplos de este tipo de reacción medicamentosa.

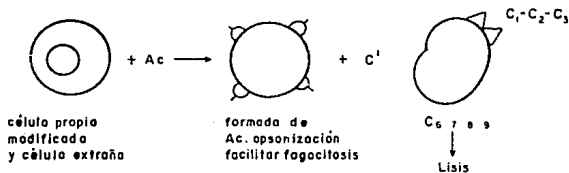
(3) La membrana de los eritrocitos puede ser modificada por los medicamentos adsorbiendo las proteínas en forma inespecifica dando resultados positivos en la prueba con antiglobulina; la enfermedad producida por éste mecanismo es rara.

(4) Hay medicamentos como la metil-dopa causante de anemias hemolíticas por la inducción y formación de autoanticuerpos.

Este medicamento daña a los eritrocitos normales porque presentan autoantígenos-eritrocitos, los cuales inducen una anemia hemolítica que puede persistir después de que el medicamento ha sido retirado.

Es posible que algunos medicamentos puedan producir reacciones del tipo II por cualquiera de éstos mecanismos. (4)

**TIPO II  
HIPERSENSIBILIDAD CITOTOXICA DEPENDIENTE DE ACS.**

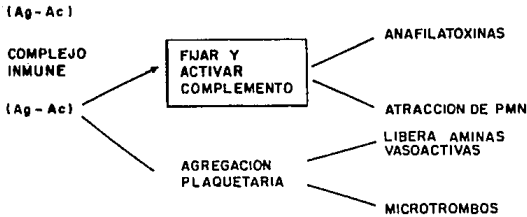


**TIPO III FENOMENO DE ARTHUS Y COMPLEJOS Ag - Ac.-** Están tipificadas por la enfermedad del suero, un término aplicable a la reacción ya sea causada por el suero heterólogo o por algún medicamento hapténico como la penicilina.

La enfermedad es una Vasculitis de varios sistemas dependientes del complejo, en la cual los complejos inmunitarios se depositan a lo largo de las superficies endoteliales de los vasos sanguíneos estimulando la inflamación y el daño de la pared vascular.

### TIPO III

#### HIPERSENSIBILIDAD POR COMPLEJOS INMUNES



Hay un periodo de latencia de varios días después de la administración del medicamento, antes de que suficiente cantidad de anticuerpo sea producido para que genere complejos inmunitarios capaces de activar el sistema del complemento.

Los síntomas clásicos de la enfermedad del suero son fiebre, artralgias, linfadenopatías y una erupción cutánea que a menudo es urticaria. (23)

**TIPO IV HIPERSENSIBILIDAD TARDIA.**- La alergia tipo IV (mediada por células) es el mecanismo de la dermatitis alérgica por contacto proveniente de la aplicación tópica de medicamentos.

Los anticuerpos tópicos, los antihistamínicos, los anestésicos locales incluyendo los parabenos y la lanolina, son algunas de las causas que con frecuencia producen éste tipo de alergia.

La hipersensibilidad tardía se define como una reactividad aumentada para antígenos específicos mediada no por anticuerpos, sino por células T. Este fenómeno fué observado por primera vez por Jenner; y mas tarde desarrollado por Koch y Von Pirquet.



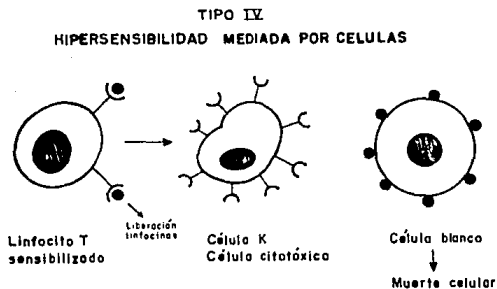
La reacción de anticuerpo con un antígeno puede describirse directa o indirectamente en diversas formas. Hasta hace poco la reacción de un linfocito específicamente sensibilizado con su antígeno, podía comprobarse solamente por reacciones "in-vivo" de tipo tardío, técnica descrita primero por Landsteiner y Chase en 1940.

La prueba de Tuberculina en el hombre, antígeno usado en la cutirreacción, es un derivado protéico purificado (P.P.D) del M. tuberculosis

Es característico el comienzo de la reacción cutánea y puede verse de las 6 a las 12 horas, desarrollando eritema, edema e induración.

La lesión de hipersensibilidad tardía se caracteriza por infiltración de células mononucleares, aunque pueden aparecer algunos neutrófilos en la lesión inicial.

Este tipo de lesiones también se describen en todas las reacciones que incluyen actividad tardía como rechazo de injertos, y muchas de las enfermedades autoinmunitarias (13).



#### **2.4.- PRUEBAS "IN-VIVO" E "IN-VITRO" PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ALERGIA A MEDICAMENTOS**

El diagnóstico de la alergia a medicamentos por el laboratorio resulta como consecuencia experimental después de una cuidadosa historia clínica, buscando al medicamento causante de la reacción alérgica; en el laboratorio se llevan a cabo pruebas "in-vivo" y pruebas "in-vitro".

Las pruebas "in-vivo" consisten: en la administración de una pequeña dosis de prueba, después de que la reacción inicial haya desaparecido, se puede demostrar que la reacción está asociada con el medicamento.

En estas pruebas "in-vivo" se tienen :

##### **1.- LA PRUEBA CUTANEA TIPO ARTHUS O DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA.**

Esta prueba ocasionalmente sirve para establecer un diagnóstico, ya que sólo localiza la hipersensibilidad cutánea a un antígeno o grupo de antígenos.

La clásica reacción de Arthus es producida en los animales de experimentación por la interacción local (Ag-Ac) dando por resultado una inflamación destructiva de los pequeños vasos sanguíneos, después de la inyección intradérmica de antígeno en un animal apropiadamente sensibilizado. La zona, muestra hinchazón local y eritema en una a dos horas aumentando la reacción al máximo de las 3 a las 6 horas después de la inyección y desaparece de las 10 a 12 horas (17).

##### **2.- LAS PRUEBAS DEL PARCHÉ**

Este procedimiento introducido en 1896 por Jadassohn, consiste en aplicar una concentración no irritante (baja) del antígeno sospechoso por contacto a la piel del paciente (habitualmente la espalda) cubriendo con un vendaje oclusivo; el cual es quitado después de 48 horas.

Una reacción exematosa en el sitio de la prueba del parche constituye una respuesta positiva. (14)

### 3.- PRUEBA CUTANEA EN LA ALERGIA A LA PENICILINA

La aplicación de Peniciloil - Polilisina  $6 \times 10^{-5}M$ , da una prueba cutánea positiva en la mayor parte de los enfermos con antecedentes de urticaria tardía y en muchos de aquellos que padecen reacciones eritematosas. Empleando 1000 U, de penicilina G/ml es habitualmente positiva en las personas con anafiláxis documentada.

Las pruebas son practicadas inyectando 0.005 ml por vía intradérmica y valorando la roncha y el eritema a los 20 min.

Los medicamentos protéicos que causan la alergia de tipo I darán una reacción cutánea de roncha y eritema pero debe usarse una dilución apropiada del medicamento para evitar la reacción irritante inespecífica.

Los medicamentos hapténicos, como la penicilina dan una prueba positiva. (4)

Entre las pruebas "in-vitro" se conocen :

#### 1.- FACTOR INHIBITORIO DE MIGRACION (MIF)

Técnica usada para detectar la linfocina liberada de los linfocitos sensibilizados, que causan la inhibición de la migración de macrófagos.

El mecanismo de inhibición de la migración de las células de exudado peritoneal reveló la intervención de dos tipos de células.

Se demostró que el linfocito sensibilizado, portaba información inmunitaria y elaboraba un factor soluble, el MIF, después de la estimulación por antígenos: mas tarde se demostró que los linfocitos humanos producen MIF.

El MIF humano inhibe la migración de los monocitos humanos hacia los macrófagos del cobayo, empleados como células indicadoras.

Los linfocitos de enfermos con síndrome de Di-George, Sarcoidosis, Candidiasis mucocutánea crónica, Síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad de Hodgkin y Artritis Reumatoidea no producen MIF.

No obstante en algunos enfermos, la respuesta proliferativa a los antígenos y mitógenos puede ser normal, aún cuando la producción de MIF esté deprimida.

La reacción cutánea en éstos enfermos puede deberse a la producción de MIF por los linfocitos productores de dicho mediador.

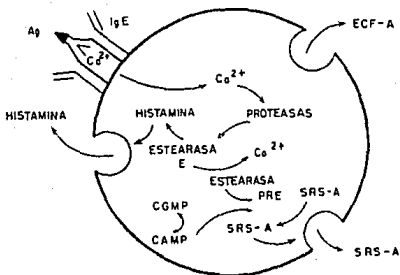
El MIF también es empleado para identificar linfocitos sensibilizados en pacientes con enfermedades cuya patogénesis involucra algún mecanismo inmunitario.  
(17)

## **II.- DESGRANULACION DE BASOFILOS**

Los primeros experimentos sobre las reacciones de hipersensibilidad los desarrollaron Partier y Richet, utilizando extractos de tentáculo de anemona, en perros y observaron que inoculaciones repetidas producen la muerte. La reacción exagerada a los extractos que administrados por primera vez provocaron nula o escasa reacción, se denominó entonces anafilaxia (aná de nuevo y phylaxis protección).

Estas observaciones llevaron a una secuencia de estudios que identificaron a la inmunoglobulina E (IgE) como responsable de activar a las células blanco al contacto con el antígeno y dar una secuencia de reacciones, la desgranulación, liberación de histamina y sustancias de reacción lenta (SRS-A).

### MECANISMO DE DESGRANULACION



ECF - A Factor quimiotáctico eosinófilo de la anafilaxia  
CGMP Guanina monofosfato cíclico  
CAMP Adenosin monofosfato cíclico  
SRS - A Anafilaxia de reacción lenta

La reacción de liberación se inicia al añadir el antígeno al cual el individuo es alérgico; se requiere de  $Ca^{++}$  y la presencia del anticuerpo, (inmunoglobulina E (IgE)) fijado a la membrana de los basófilos.

La histamina es liberada por el leucocito basófilo, que es la única célula de la sangre humana que contiene histamina.

Mecanismos similares se hayan involucrados en la activación de los basófilos humanos ya sea por anti-IgE humana o por antígeno.

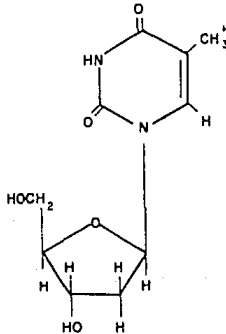
La liberación de histamina de la célula es un proceso secretor modulado por el nivel intracelular de ciclomonofosfato de adenocina (CAMP).

En forma similar, tanto los microtúbulos como los microfilamentos parecen jugar un rol en éste fenómeno; los agentes que estabilizan los microtúbulos y aquellos que provocan la disociación de los microfilamentos, acrecientan la liberación de histamina. (7)

La liberación de histamina de los leucocitos basófilos es un valioso medio para el estudio "in-vitro" de la alergia reagnica, que se presenta en individuos alérgicos a la ambrosía.

## 2.5.- TRANSFORMACION LINFOCITARIA

En presencia de una sustancia blastógena, los pequeños linfocitos se transforman en una gran célula blástica acompañándose de síntesis de RNA y DNA; la medición puede hacerse mediante la incorporación de Timidina Tritiada [ $^3\text{H}$ ]TdR (24).



En el suero humano se encuentran presentes sustancias que modulan en forma humoral la respuesta contra los antígenos o mitógenos, éstos pueden ser :

### PROTEINAS SERICAS

- 1.- Albúmina
- 2.- Anticuerpos Específicos
- 3.- Proteína C. Reactiva
- 4.- Lipoproteínas
- 5.- Complejo Antígeno-Anticuerpo

## HORMONAS

- 1.- Glucocorticosteroides
- 2.- Progesterona
- 3.- Estrógenos

## MEDICAMENTOS

- 1.- Aspirina
- 2.- Marihuana

La transformación linfocitaria puede ser evaluada por un gran número de métodos.

- a) Métodos "in-vivo"
- b) Métodos "in-vitro"

## MÉTODOS "IN-VIVO"

a) Las pruebas cutáneas para reacciones de sensibilidad tardía, están contraindicadas para algunos individuos sensibilizados; las pruebas cutáneas "in-vivo" incluyen la administración de dosis inmunógenas de antígenos que alteran el estado inmunológico del paciente.

La prueba tuberculínica en el hombre es un ejemplo de hipersensibilidad tardía "in-vivo", se inyecta por vía intradérmica una pequeña cantidad de antígeno (con frecuencia menos de 1 g). Al descubrir la sensibilidad para Micobacterium Tuberculosis el antígeno usado en la cutirreacción es tuberculina, un derivado protéico purificado (P.P.D) del microorganismo. El comienzo de la reacción cutánea es lento y nada puede verse hasta transcurridas 6 a 12 horas.

Se desarrolla gradualmente eritema e hinchazón no edematosa indurada que alcanza la máxima intensidad después de 24 a 72 horas y luego desaparece con lentitud. (13)

## **METODOS "IN-VITRO"**

En la década pasada se desarrollaron una gran variedad de ensayos "in-vitro" para valorar inmunidad mediada por células (IMC) sin dañar al individuo.

Nowell en 1960 descubrió que la fitohemaglutinina (PHA-P) lectina extraída del frijol, transforma los linfocitos pequeños en linfoblastos proliferantes, en los cultivos de tejidos.

De éste modo, la transformación linfocitaria inducida por mitógenos, así como también por antígenos se ha convertido en un instrumento experimental ampliamente usado, de gran utilidad en bioquímica, biología celular, genética, inmunología y virología con aplicación en la clínica.

Otros ensayos "in-vitro" para evaluar inmunidad mediada por células (IMC) son las pruebas que evalúan linfoquinas.

La transformación linfocitaria tiene varias aplicaciones clínicas :

1.- En el diagnóstico y control de estados de inmunodeficiencia genética y adquirida e indicador sensible a los efectos de diversas terapias inmunoestimulantes o inmunosupresoras. Ej. una variedad de tratamientos de inmunodeficiencias congénitas, como injertos de médula y timo, tratamiento con factor de transferencia (TF) y hormona tímica han sido supervisados, comprobando sus efectos beneficiosos con la transformación linfocitaria.

El grado de deterioro de la reactividad linfocítica en pacientes con Cáncer, y el mejoramiento de las reacciones linfocitarias "in-vitro" siguiente a las reacciones inmunoestimulantes o quimioterapia, se pueden utilizar como indicadores de pronóstico. (16).



2.- Comparando las reacciones linfoproliferativas "in-vitro" de células cultivadas con el propio suero o plasma del paciente, y en una mezcla de sueros o plasmas normales, se puede establecer si hay una deficiencia linfocitaria y si es intrínsecamente celular o debida a factores séricos extrínsecos, tóxicos o inhibitorios.

Una diversidad de factores específicos y no específicos interfieren con la función linfocitaria de un paciente, la cual se puede detectar incubando linfocitos con sueros autólogos y heterólogos. (12)

3.- Para detectar una exposición previa a diversos agentes patógenos por ej. Malaria, Hepatitis, Infecciones por Mycoplasma Pneumoniae, enfermedad Periodontal y ciertas infecciones virales. La exposición previa se puede detectar sólo "in-vitro" mediante reacciones linfoproliferativas en respuesta al antígeno correspondiente, debido a que muchos de los individuos ya no poseen anticuerpos detectables.

En forma similar, en diversos estados autoinmunes, los antígenos pertinentes estimulan específicamente la transformación linfocitaria sólo en pacientes que padecen dichos estados, ésta reacción provee una poderosa herramienta diagnóstica para detectar condiciones autoinmunes.

Además los antígenos responsables de alergias también estimulan "in-vitro" reacciones específicas linfoproliferativas, debido a que las reacciones alérgicas inmediatas, así como las reacciones por contacto y la hipersensibilidad por drogas, se producen con frecuencia en respuesta a antígenos timodependientes. (9)

Por consiguiente la transformación linfocitaria también se puede utilizar en el diagnóstico de estados alérgicos.

4.- Se está haciendo cada vez más evidente que la aplicación exacta y adecuada de la histocompatibilidad de receptores y donadores para trasplantes, sólo puede lograrse utilizando reacciones de leucocitos mezclados y cultivo mixto de linfocitos (CML) (incubación linfocitos donador + linfocitos del receptor mitomizados).

Esto se basa en la observación de que las respuestas de transformación linfocítica "in-vitro" resultan de mezclar leucocitos de individuos distintos (mezcla heteróloga) pero no individuos idénticos (mezcla autóloga).

5.- Existen además varias aplicaciones experimentales de la transformación linfocitaria que justifican una breve mención.

La capacidad funcional de las subpoblaciones de linfocitos derivados del Timo (T) y linfocitos de la médula ósea (B) pueden determinarse, permitiendo así una localización mas exacta de las inmunodeficiencias de un paciente.

Este ensayo se puede utilizar para detectar hiperreactividad de las subpoblaciones de células T. supresoras, inmunodeficiencia variable que añadidos a cultivos de linfocitos normales suprimen la producción "in-vitro" de inmunoglobulinas.

Finalmente, las mismas técnicas usadas para analizar la transformación linfocitaria pueden emplearse para producir líquidos sobrenadantes de cultivos que contienen mediadores de inmunidad celular.

La técnica de transformación linfocitaria requiere del estudio de varios parámetros para su estandarización como son la Conc. Celular VS. Tiempo Respuesta y Conc. Mitógena Vs. Respuesta Linfocítica. (17)

**DOSIS RESPUESTA.-** Es muy importante determinar la inmunocapacidad de los linfocitos ensayando la reactividad de éstos con dosis subóptimas de un mitógeno como la fitohemaglutinina (PHA-P).

En condiciones experimentales, hay variabilidad considerable linfoproliferativa de individuos normales, y el grado de reactividad del mismo individuo varía considerablemente al repetir las pruebas.

Esto se debe en parte a las variaciones inevitables en las técnicas de cultivo tisular, y en parte a los efectos de influencias del medio ambiente sobre la reactividad de los linfocitos del donador.

Es en consecuencia primordial, controlar la variabilidad técnica analizando siempre controles normales de la misma edad y preferentemente del mismo sexo en forma simultánea.

## 2.6.- MITOGENOS

Para detectar la capacidad de sensibilización y respuesta antigénica se requiere de la presencia de diferentes mitógenos.

Generalmente son lectinas vegetales capaces de provocar transformación linfocitaria; activan a las poblaciones de células T y B de una forma tal que no está relacionada con la especificidad antigénica del receptor linfocitario porque reaccionan con las estructuras constantes, no con las hipervariables, en la superficie de la célula. Con frecuencia se les denomina también activadores celulares policlonales B. o T. (11)

Existe una amplia gama de antígenos que ha sido empleada en la activación de los linfocitos :

- 1.- P.P.D.
- 2.- Cándida
- 3.- Toxoide Antitetánico
- 4.- Medicamentos

Los mitógenos transforman del 60% al 90% de los linfocitos de adultos normales y, recién nacidos sin depender de una inmunización previa. (Tabla I)

MITOGENO	FUENTE BIOLÓGICA	ESPECIFICIDAD RELATIVA
Fitoheماغلوتینا ( PHA )	<u>Phaseolus vulgaris</u> ( frijol )	Células T
Concanavalina ( con A )	Canavalina ensiformes ( haba )	Células T ( subconjunto diferente de la PHA ) .
Globulina antitímocítica ( A.T.G. )	Antisuero heterólogo	Células T
Proteína de stafilococcus ( S.P.A. )	<u>Stafilococcus aureus</u> cepa cowan I	Células B . Células T .
Mitógeno de la fitolaca ( P.W.M )	<u>Phitolaca americana</u>	Células B y T
Streptolisina ( S.L.S )	Estreptococos Grupo A	( Principalmente B )

Tabla I

Cuando se incuban los macrocultivos en ausencia de CO<sub>2</sub> las células se pueden cultivar en frascos o tubos herméticamente cerrados. En ambos casos, las células generan suficiente CO<sub>2</sub> con estimulación adecuada. Sin embargo los estimulantes débiles no inducen suficiente actividad metabólica celular como para mantener el desarrollo en éstas condiciones, el uso del buffer de ácido N-2 hidroxietil piperazina-N-2 etano-sulfónico (Hepes) soluciona parcialmente éste problema.

Síntesis óptima de DNA en respuesta a mitógenos como en antígenos (4)  
(Fig.2)

### CURVA DE TIEMPO-RESPUESTA

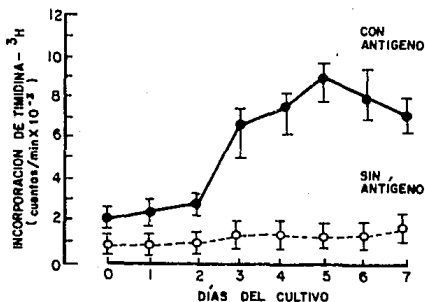


FIG. 2

Nótese en la curva que de 2 a 4 días de incubación hay respuesta para los mitógenos, y para estimulantes antigénicos es de 5 a 7 días.

La respuesta a dosis subóptimas de mitógenos potentes, alcanza también un máximo luego de 4 días, indicando una relación directa entre el tamaño de la población celular reactiva y la velocidad de síntesis de DNA.

Los ensayos con linfocitos se han hecho posible gracias al desarrollo de análisis cuantitativo de incorporación de precursores radiactivos.

La incorporación de timidina tritiada [ $^3\text{H}$ ] TdR  $0.5 \mu\text{Ci}$  por concavidad, actividad específica,  $2 \text{Ci}/\text{mmol}$  es muy utilizada en general para determinar síntesis de DNA por células en fase S.

Algunos investigadores utilizan la [ $^{125}\text{I}$ ] 5-yodo-desoxiuridina,  $200 \text{Ci}/\text{mmol}$  (New England Nuclear Corp. Boston Mass) porque tiene la ventaja de poderse medir en un contador de centelleo gamma, en lugar de beta.

Para asegurarse de que el precursor radiomarcado está en exceso, es importante añadir un precursor radiomarcado de baja actividad específica 4 a 16 horas antes del procesamiento.

La incorporación de timidina tritiada es sólo una medida de proliferación, ya que las células que sintetizan DNA en la fase S no necesariamente continúan dividiéndose.

Por consiguiente, se recomienda el microensayo más rápido de síntesis proteica para analizar la eficacia de la respuesta a mitógenos en el diagnóstico de estados de inmunodeficiencias.

Así mismo se ha afirmado que la incorporación significativa de [<sup>3</sup>H]Uridina se observa dentro de las 4 a 8 horas de incubación.

Esto puede proporcionar el indicador más veloz de transformación linfocitaria, pero la sensibilidad de éste ensayo no es superior al que utiliza [<sup>3</sup>H] leucina.

El ensayo de síntesis de DNA, si bien más lento, es más sensible y requiere menos células, y se recomienda utilizarlo para detectar sensibilización antigénica.

Los antígenos activan al comienzo sólo a un pequeño clon de la población linfocitaria previamente sensibilizada, pero luego de repetidas divisiones durante los 5 a 7 días de incubación, del 5 al 35% de los linfocitos aparecen transformados.

Por lo tanto al determinar la inmunocapacidad de los linfocitos, es muy importante ensayar la reactividad de éstos hacia dosis subóptimas de un mitógeno, tal como la fitohemaglutinina (PHA-P).

Esto se logra determinando la respuesta a cinco diluciones de fitohemaglutinina (PHA-P), con lo cual se detecta la hiporreactividad de los linfocitos en individuos con reacciones normales frente a dosis óptimas de estimulantes potentes (Fig. 3).

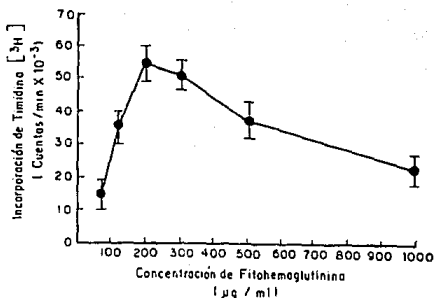


FIG. 3

Por ejemplo en varios estados de inmunodeficiencias, la respuesta proliferativa de dosis óptimas de fitohemaglutinina (PHA-P) es normal, en tanto que se puede detectar una reactividad subnormal sólo en respuesta a dosis subóptimas como sucede en el síndrome de Wiskott-Aldrich (Tabla 2) (3).

CONC. DE PHA-P µg/ml	INDIVIDUOS NORMALES cpm	PACIENTES cpm
NINGUNA	2250 ± 120	7500 ± 2500
8	45000 ± 18000	51000 ± 15000
2	74000 ± 16000	53000 ± 20000
1	92000 ± 20000	38000 ± 13000
0.5	88000 ± 8000	23000 ± 14000
0.25	49000 ± 10000	13000 ± 8000

TABLA 2

Los antígenos usados para evaluar transformación linfocitaria humana son todos timodependientes y activan la proliferación de células T y B. Algunos autores proponen el uso de una mezcla de antígenos para evaluar la reactividad de los linfocitos "in-vitro".

Todos los estimulantes pueden disolverse en agua o medios estériles. La actividad de éstos se preserva en alícuotas a 4°C, sólo la estreptomycin, se mantiene congelada, (la cual se puede descongelar una sola vez para evitar que se desnaturalise).

Para determinar la respuesta celular de un sólo individuo se debe realizar un cultivo mixto de leucocitos (CML) "Unidireccional".

Esto se logra preparando leucocitos viables pero no proliferativos que actúan como estimuladores, éstas células viables se obtienen irradiando leucocitos con 1000 a 4000 R, o incubándolos 25 min. a 37°C con mitomicina que luego debe de ser eliminada por lavado, ambos métodos bloquean la respuesta celular proliferativa. Debido a que no bloquean la síntesis protéica.

En la transformación linfocitaria la activación ocurre sobre la membrana al ponerse en contacto con el antígeno y posteriormente se lleva a cabo un proceso bioquímico que finalmente induce la síntesis protéicas y de ADN. (26)

## 2.7.- RECEPTORES Y SU INTERACCION CON DROGAS EN LA TRANSFORMACION LINFOCITARIA

Los receptores son proteínas de la membrana celular que pueden interactuar con moléculas producidas por otros tejidos, antígenos y medicamentos.

Hay varios tipos de receptores en los padecimientos alérgicos :



- A.- Antígenos de clase I HLA del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).
- B.- Receptores adrenérgicos de células blanco.
- A.- Los antígenos de clase I localizados en las células blanco interactúan con los medicamentos, estableciéndose la actividad citotóxica en los linfocitos T. Se ha reportado en pacientes con trombocitopenia y neutropenia asociada a alergia por drogas, tres mecanismos que tratan de explicar el daño inmunológico. (6)
- 1 Tipo complejo inmune (Ag-Ac) complejo con droga y Ac-Antidroga (Quinidina).
  - 2 La droga hapteno ataca a la superficie de la célula sanguínea y los anticuerpos contra la droga permiten su destrucción; como acarreador de la droga (Penicilina).
  - 3 La droga puede disparar la formación de auto-anticuerpos los cuales interactúan con la célula blanco sin la droga. (Fig. 4)

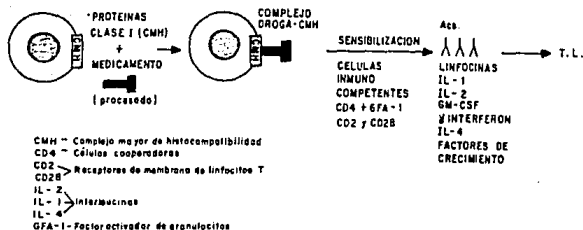


FIG. 4

En el caso de la penicilina ésta se une covalentemente con proteínas via-lisina (aminoácido) de los antígenos de clase I (HLA-A9, HLA-B15 y HLA-Bw35) formándose el complejo droga - CMH (Fig. 5 y 6). (6)

### MOLECULAS DE CLASE I Y CLASE II DEL (CMH)

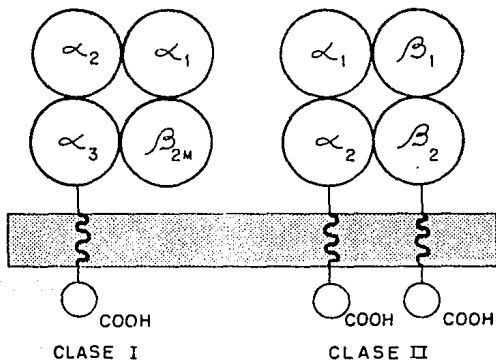
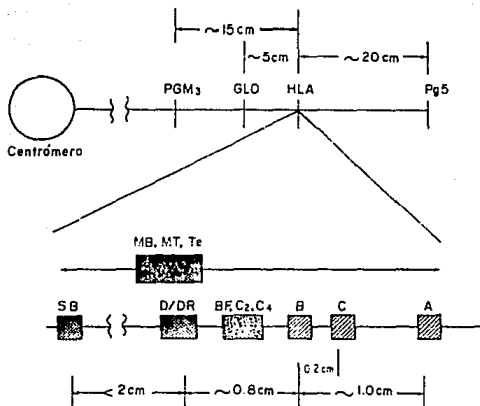


Fig. 5

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD HLA HUMANO



El complejo HLA en el brazo corto del cromosoma 6

- PGM<sub>3</sub> - Enzima
- GLO - Glucosilasa
- HLA - Antígeno de histocompatibilidad de leucocitos
- cm - Centi - margen | Unidades de recombinación genética,
- A } Locus en una parte del cromosoma
- C } Locus en una parte del cromosoma
- B } Locus en una parte del cromosoma
- BF } Complotipos, haplotipos del complemento Locus FB
- C<sub>2</sub> } Complotipos, haplotipos del complemento Locus C<sub>2</sub>
- C<sub>4</sub> } Complotipos, haplotipos del complemento Locus C<sub>4</sub>
- D - Locus D
- DR - Locus DR

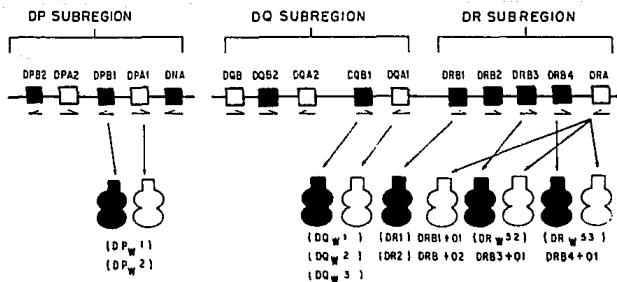
FIG 6

El antígeno presentado a la célula estimula la producción de moléculas solubles que también afectan las funciones de las células T; como las Interleucinas-I (IL-1) que están involucradas en la patogénesis de la fiebre, y respuesta de fase aguda.

Además varios estudios muestran que la Interleucina-I estimula las poblaciones de células CD4<sup>+</sup> cooperadoras y la maduración de células CD8<sup>+</sup> supresoras; y también incrementan la síntesis de Interleucina-2.

En resumen la activación de las células T. por interacción del receptor clase I, complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), con un antígeno específico (droga) es mediada por células cooperadoras como CD4<sup>+</sup> y otras células T como CD2 y CD28, posteriormente se lleva a cabo la movilización de Ca<sup>++</sup> libre y entrada de las células a la fase S; expresándose receptores para linfoquinas, Interleucina-2 proteína absolutamente necesaria para la proliferación o transformación linfocitaria.

Ciertos antígenos del HLA-ABC pueden ser relacionados con un fenómeno de respuesta inmune (RI) como el HLA-B27 a una enfermedad de Espondilitis, el efecto gene respuesta inmune es altamente específico para un genotipo y un antígeno; y puede conferir responsabilidad en enfermedades autoinmunes con ciertos alelos particularmente de la clase II como el DR3 que asocia al Lupus eritematoso sistémico (Fig. 7) (Tabla 3). (5, 6)



ORGANIZACION DEL GENE DE HLA PARA LA REGION CLASE II

- DP del Locus DP
- DQ del Locus DQ
- DR del Locus DR
- DP<sub>w</sub> DP (More shop / no confirmado)
- DQ<sub>w</sub> DQ (no confirmado)
- DR1 DR1 isotipo
- DPB2 isotipo de la región DP
- DQB isotipo de la región DQ
- DRB1 isotipo de la región DR

FIG 7

**CARACTERISTICAS GENETICAS DE LAS MOLECULAS  
CLASE I Y CLASE II DEL (CMH)**

	Clase I	Clase II
Terminología de expresión de moléculas	HLA - A, B, C Casi todas las células, G.R. maduros, trofoblasto tejido embrionario	Ia; DR, DQ, DP Linfocitos $\beta$ monocito, dendríticos células T. estimuladas
Estructura cadena $\alpha$ cadena $\beta$	44 KD 11.5 KD	34 KD 29 KD
Interrelación con membrana cadena $\alpha$ cadena $\beta$	Intrínseca Extrínseca	Intrínseca Intrínseca
Localización del polimorfismo cadena $\alpha$ cadena $\beta$	Dominios $\alpha_1$ y $\alpha_2$	Dominios $\alpha_1$ de DQ y DP dominios $\beta_1$ de DR, DQ y DP
Sitio del Gene cadena $\alpha$ cadena $\beta$	Cromosoma 6 Cromosoma 15	Cromosoma 6 Cromosoma 6
Número de loci expresado cadena $\alpha$ cadena $\beta$	3 (HLA - A, B, C) 1	1 DR, 1 DQ, 1 DP 2 IDR, 1 DQ, 1 DP
Naturaleza de unión del Ag	Fragmento membrana celular (e.g membrana viral)	Proteína soluble (e.g Toxide tetánico)
Reconocimiento celular del Ag	CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>
Consecuencia del reconocimiento celular T	Muerte de célula blanca por unión del Ag	Ag. células T específica cooperadora Hipersensibilidad tardía

Tabla 3

## 2.8.- RECEPTORES ADRENERGICOS Y DE ACTIVACION

La afinidad del adrenoceptor a la droga ha sido asociada con un aumento de la mitogénesis en la transformación linfocitaria; la mayoría de las drogas modifican la respuesta linfocítica por interacción directa o indirecta; y ésto es importante en la inducción y control del asma por medicamentos : (Salicilatos, Fenilbutazona y Cloropropamida).

Estudios experimentales con linfocitos T muestran que éstas células tienen adrenoceptores similares a las células del músculo bronquial.

La mayoría de éstas células muestran uniones competitivas con antagonistas adrenérgicos: en la misma forma las drogas pueden interaccionar y provocar una patología clínica. (3)

## RECEPTORES Y VIAS BIOQUIMICAS DE ACTIVACION

Las repercusiones bioquímicas de éstas señales activadoras intramembranales producen cambios paralelos a la de la activación de las células T; que se inician con la estimulación por el antígeno mas IL-1 sobre la activación de la fosfolipasa C que escinde el fosfatidil inositol difosfato en sus productos reactivos diacilglicerol e inositol  $P_3$ . La creciente concentración intracelular de calcio activa diversos sistemas enzimáticos que llevan finalmente a la síntesis de RNA, proteína e IL-2; a la vez que la división del diacilglicerol a ácido araquidónico via 5-lipoxigenasa, aumenta la formación de GMPc responsable de la fosforilación de sustratos y activación de RNA-polimerasas dependientes del DNA y síntesis ribosómica. (11) (Fig. 8)

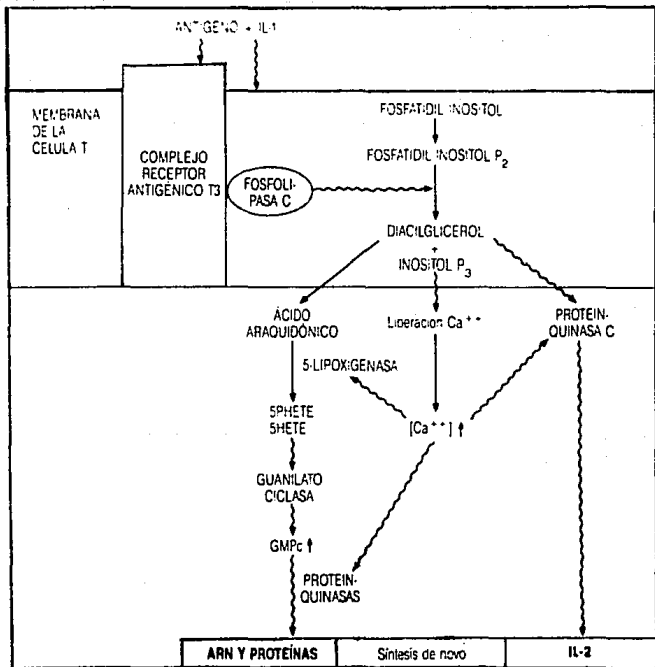


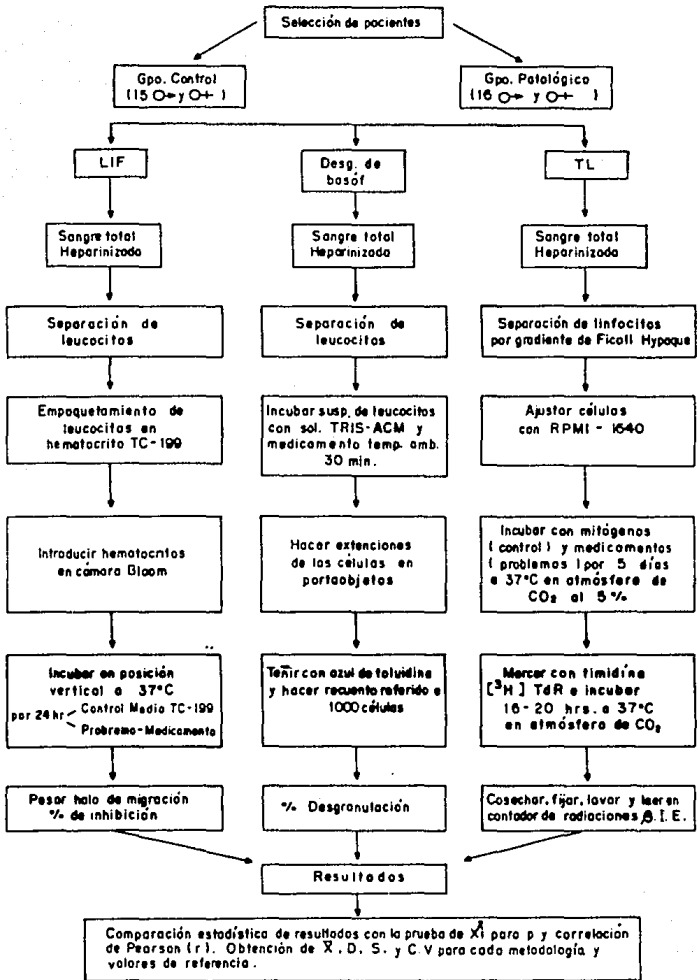
FIG. 8



### **CAPITULO III**

### **PARTE EXPERIMENTAL**

### 3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



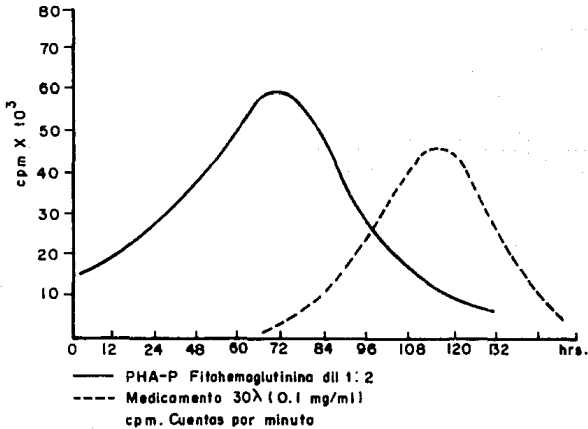
Las modificaciones a la técnica de Transformación Linfocitaria (T.L.) realizadas en forma experimental consistieron en:

- a) Tiempo óptimo (Tiempo - Respuesta)
- b) Concentración óptima de Antígeno (Dosis - Respuesta)

### TIEMPO - RESPUESTA

El tiempo óptimo de incubación del antígeno (medicamento) para estimular a los linfocitos; fue a las 120 horas (5 días) a diferencia del mitógeno fitohemaglutinina (PHA-P) el cual es a las 72 horas (Gráfica 1).

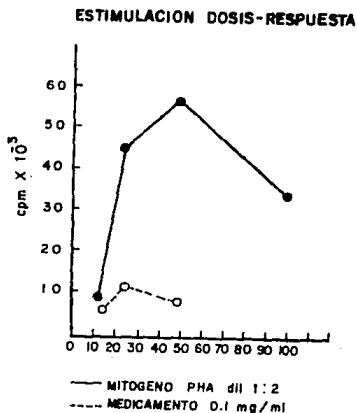
### ESTIMULACION TIEMPO-RESPUESTA



GRAFICA 1

## DOSIS - RESPUESTA

En forma semejante a la de la estimulación con mitógeno (PHA-P) se hace una curva de estimulación con tres diferentes concentraciones del medicamento ajustado a 100%/ml. (Gráfica 2).



GRAFICA 2

### 3.2.- MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

#### 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para las Técnicas de Transformación Linfocitaria, Desgranulación de Basófilos y LIF.

Tomar 20 ml. de Sangre con jeringa de 20 ml y con 0.5 ml. de heparina de 1000 U./ml.

### 3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Para la técnica de LIF.

- a) Cámaras de Bloom.
- b) Cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- c) Microhematocritos sin heparina
- d) Pinzas, ceguetas
- e) Vasos de precipitado
- f) Vulvos
- g) Pipetas milimétricas
- h) Pipetas Pasteur

Para Técnica de Desgranulación de Basófilos.

- a) Gradillas
- b) Tubos de 12 x 75 mm.
- c) Portaobjetos
- d) Pipetas Pasteur

Para Técnica de Transformación linfocitaria

- a) Jeringas Desechables
- b) Pipetas Pasteur estériles
- c) Tubos de Falcon
- d) Pipetas Volumétricas
- e) Cámara de Neubauer
- f) Pipetas de Thoma
- g) Tubos de Rosca de 13 x 100
- h) Filtro Millipore 0.45  $\mu$
- i) Gasa estéril
- j) Papel filtro
- k) Micropipeta automática

### 3.2.3 REACTIVOS

#### Para LIF

- a) Medio de TC-199 R.A. (Gibco)
- b) Hepes - Buffer 1M (Sigma)
- c) Penicilina + Estreptomicina (1000 U/ml.) (IMSS)
- d) Parafina. (Sigma)
- e) Lubricante de Silicona. (Sigma)

#### Para desgranulación de Basófilos

- a) Buffer TRIS - ACM R..A. (Sigma)
- b) Rojo Neutro R.A. (Sigma)
- c) Albúmina Humana Grado III (Sigma)
- d) Azul de Toluidina. (Sigma)

#### Para Transformación Linfocitaria

- a) Ficoll-Hypaque 0.075 (Marca Hyla (Microlab))
- b) Timidina Tritiada (actividad específica 6.7 Ci/mml.Conc. 1M Ci) (Dupont.)
- c) Solución balanceada de Hank's (Gibco)
- d) Heparina 0.5 ml de 1000 U/ml. (IMSS)
- e) Solución salina isotónica. (IMSS)
- f) Ac. Tricloroacético al 10% (IMSS)
- g) Fitohemaglutinina (PHA-P) (Microlab sigma.)
- h) Líquido de Centelleo (Marca Packard)
- i) RPMI - 1640 (Gibco)
- j) Suero fetal bovino (Inactivado) (Microlab)
- k) Medicamentos del IMSS
- l) Antibióticos (Penicilina, Estreptomicina 1000 U/ml. del IMSS)

### 3.2.4 EQUIPO

- a) Proyector. (Minette Eva-Vision)
- b) Balanza Analítica. (Chyo Corporation)
- c) Campana de flujo laminar. (Vecko)
- d) Mechero
- e) Microscopio
- f) Baño María a 37 °C
- g) Centrifuga I. PR-2
- h) Espectrofotómetro de Centelleo de radiaciones Beta
- i) Estufa de 37°C con CO<sub>2</sub>

### 3.2.5 PREPARACION DE REACTIVOS

#### PREPARACION DE TRIS-ACM:

En un matraz aforado de 100 ml, poner 10ml de buffer trisalino concentrado, 1 ml. Stock Ca<sup>++</sup> (Conc 100 X) 1 ml Stock Mg<sup>++</sup> (Conc 100 X) agua destilada casi 98 ml., 1 ml de albúmina conc. y aforar.

Trisma	0.25 M
Na Cl.	0.120 M
KCl	0.005 M
Ca <sup>++</sup>	6 x 10 <sup>-4</sup> M
Mg <sup>++</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup> M
Albúmina	0.03%

#### PREPARACION DEL ROJO NEUTRO:

Solución madre: rojo neutro 0.3% en alcohol absoluto y filtrar.  
Solución de Trabajo: 0.6 ml de solución madre + 5.4 ml de alcohol absoluto y filtrar.

### ALBUMINA HUMANA CONCENTRADA:

Disolver 45 mg (0.045 g) de albúmina humana seca, en 1.5 ml de solución salina 0.9%.

### AZUL DE TOLUIDINA:

Disolver 200 mg de azul de toluidina en 100 ml de una solución de  $Al_2(SO_4)_3$  al 2.5% (2.5 gr.) y filtrar

### PREPARACION DEL ANTIGENO A RETAR

La mayoría de los antígenos se ajustan a 100  $\gamma$  por ml. (0.1 mg/ml) disuelto en solución salina; por Ej. (Dipirona tableta con 500 mg.) En un mortero triturar y agregar 10 ml de solución salina, disolver, filtrar y proseguir con una serie de diluciones partiendo de 1ml. (50 mg), dil 1:5= 10 mg y de ahí 2 (1: 10). Otros antígenos como estrógenos, albúmina-halotano, xilocaína, medio de contraste, antígenos bacterianos y Cándida se ajustan :

Estrógenos	50 $\gamma$
Albúmina-halotano	2.5%
Xilocaína	1:10 en Salina
Medio de contraste	1:10 en Salina
Antígenos bacterianos	1:10 en Salina
Cándida	1:10 en Salina
P.P.D.	1:10 en Salina

P.P.D. (derivado protéico purificado) 2 U.



### PREPARACION DE ALBUMINA-HALOTANO

Albúmina al 4% en buffer de 100  $\gamma$  = 0.1 mg.

Halotano 10% agitar por 4 horas, así queda la solución de trabajo  
dil 1:4

### PREPARACION DE LIQUIDO DE CENTELLEO

POPOP	0.5 gr. grado centelleo
PPO	5.0 gr. grado centelleo
c b p	1000 ml Tolueno, grado centelleo

(Marca Packard)

### 3.3.- METODOLOGIA

Se estudiaron 16 pacientes con alergia a medicamentos de acuerdo al criterio clínico; del sexo masculino y femenino cuyas edades oscilaban entre 20 y 50 años; los cuales pertenecían al servicio de alergia del Hospital de Especialidades del Centro Médico la Raza.

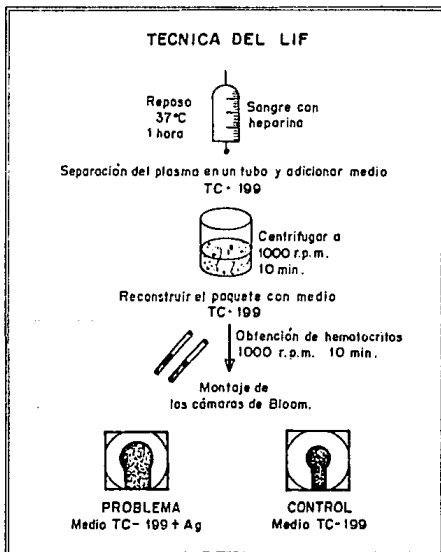
El grupo control sano estuvo integrado por 15 pacientes sin antecedentes alérgicos con las mismas características de edad y sexo entre edades de 20 y 50 años.

A los dos grupos se les determinó: Factor de inhibición de leucocitos (LIF), Desgranulación de Básofilos y Transformación Linfocitaria a varios medicamentos: Acido acetil salicílico (A.A.S), Dipirone, Metronidazol, Naproxén, Miniprés, Halotano, Sulfas, Trimetropin, Estreptomina, Acetaminofén, Penicilina, Papaverina y Pirazinamida.

## LIF

### FUNDAMENTO

Los linfocitos timodependientes sensibilizados a un antígeno cuando son puestos en contacto con el mismo, liberan una linfocina (LIF) factor inhibidor de leucocitos que es capaz de inhibir la migración de células hacia el exterior del tubo capilar.



### TECNICA (WOLFSON Y COL.)

- 1.- Tomar 20 ml de sangre con heparina, dejar reposar e incubar en posición vertical por 1 hora a 37 ° C.
- 2.- Doblar la aguja y recolectar el plasma en un tubo de rosca de 13 x 100 estéril (plasma + 8 gotas de glóbulos rojo)
- 3.- Centrifugar a 100 rpm. durante 10 min. desechar el plasma y lavar las células 2 veces con amortiguador Medio TC-199 centrifugando cada vez a 1000 rpm. 10 min.
- 4.- Por último decantar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 0.3 ml de Medio TC-199.
- 5.- Hacer microhematocritos (prueba) centrifugando a 1000 rpm., durante 10 min. para ver si es adecuado el paquete globular.
- 6.- Terminar de hacer los microhematocritos de acuerdo al número de antígenos que se quiera probar.
- 7.- Introducir a la cámara de Bloom el microhematocrito ya cortado entre la interface celular y el plasma (sobre un botón de silicona).
- 8.- Terminar de sellar la cámara de Bloom con otro cubreobjeto mediante calor sobre la parafina.
- 9.- Introducir por los orificios superiores de la cámara y mediante una jeringa Medio TC-199 para control y antígeno ajustado a una concentración óptima para el problema.
- 10.- Dejar en reposo en posición horizontal durante 24 hrs. a 37 ° C.

- 11.- Proyectar la imagen de migración sobre una hoja de papel blanco y dibujar con lápiz.
- 12.- Recortar el área de migración.
- 13.- Pesar el área recortada (para los cálculos).

#### NOTA

Antes de iniciar la técnica y para llevar a cabo el paso 7 es necesario que la cámara de Bloom estéril se le pegue en una de sus caras un cobreobjeto (por medio de parafina caliente) y se deje la otra cara sólo con parafina alrededor para recibir el otro cobreobjeto (paso 8).

#### CALCULOS

$$\% \text{ INHIBICION} = \frac{\text{peso del área de migración del problema} \times 100}{\text{peso del área de migración del control}} - 100$$

#### VALORES DE REFERENCIA

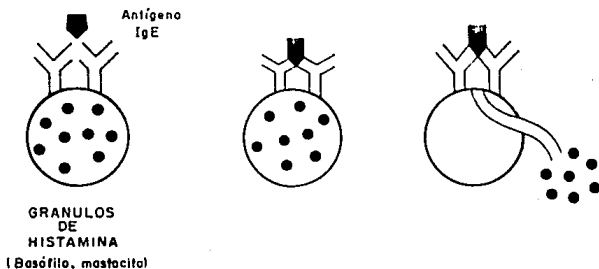
MENOS DEL 25% DE INHIBICION

#### DESGRANULACION DE BASOFILOS

#### FUNDAMENTO:

Los basófilos sensibilizados a un antígeno específico al estar en contacto con el, se desgranulan liberando gránulos de histamina: el azul de toluidina tiñe gránulos de complejo-histamina-heparina, incluidos dentro de las células basófilo.

La acción del rojo neutro consiste en intensificar la tinción específica del azul de toluidina. La liberación de histamina es causada por una interacción Antígeno-Anticuerpo y es representativa de los fenómenos de hipersensibilidad inmediata.



### TECNICA DE DESGRANULACION DE BASOFILOS

- 1.- Invertir la jeringa con la sangre, dejarla reposar en posición vertical durante 1 hora a 37 °C.
- 2.- Doblar la aguja y pasar el plasma sobrenadante a un tubo de ensaye de 12 x 75 mm (sin glóbulos rojos y etiquetado).
- 3.- Centrifugar 5 min. a 1800 rpm a temperatura ambiente.
- 4.- Decantar, aflojar el botón de células y resuspender, agregando 0.5% de TRIS-ACM a cada problema y a cada control.

PREPARAR POR DUPLICADO LOS SIGUIENTES TUBOS

CONTROL	PROBLEMA
Suspensión celular 0.25 ml	0.25 ml.
Sol. Salina Isotónica 0.25 ml	-----
Medicamento (Conc. 100 ‰)	0.25 ml.

Incubar 30 min. a temperatura ambiente.  
Tomando con pipeta Pasteur la suspensión celular + antígeno.  
Hacer extensiones en portaobjetos limpios y enumerados.

- 5.- Dejar secar a temperatura ambiente.
- 6.- Fijar las preparaciones con metanol durante 15 min.
- 7.- Teñir con azul de toluidina 2 min.
- 8.- Escurrir y decolorar con etanol absoluto 30 seg.

Dejar secar y leer observando en inmersión los basófilos con granulaciones típicas teñidas de morado rojizo, contar los basófilos que se encuentren en 1000 células.

CALCULOS

$$\% \text{ DESGRANULACION} = \frac{\text{Basófilos en el problema} \times 100}{\text{Basófilos en el control}} - 100$$

Ejemplo :

10 Basófilos en el control - 100

5 Basófilos en el problema - X

-----  
100 - 50% Desgranulación

### VALORES DE REFERENCIA

MENOS DE 30% DESGRANULACION

### TECNICA DE TRANSFORMACION LINFOCITARIA

#### FUNDAMENTO

En presencia de una sustancia blastógena o un antígeno, los pequeños linfocitos se transforman en una gran célula blástica acompañándose de síntesis de RNA y DNA; la medición de la proliferación puede hacerse mediante la incorporación de Timidina Triaada, midiéndose por cuentas por minuto (cpm) y reportándose como índices de estimulación (I.E.).

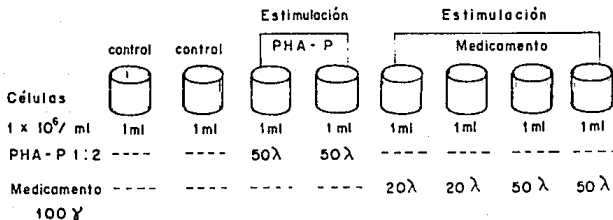
- 1.- Tomar 20 ml. de sangre con heparina y jeringa de plástico.
- 2.- Dejar la jeringa en posición vertical 1 hora a 37 °C., separar los leucocitos (plasma + 15 gotas de glóbulos rojos) en un tubo de ensaye de rosca estéril (los pasos 2, 3, 4, 5, 6 y 8 deben realizarse dentro de la campana de flujo laminar).
- 3.- Separar los linfocitos por gradiente de Ficoll-Hypaque 1: 3 y centrifugar a 1000 rpm. por 30 min.
- 4.- Obtener de la interface linfocitos T y B, y lavar dos veces con solución de Hank's (el primer lavado puede hacerse con solución salina isotónica estéril, centrifugar a 1500 rpm. por 10 min., decantar cada vez).

- 5.- Ajustar las células adicionando 1 ml. de RPMI (aminoácido de enriquecimiento) y en seguida hacer el recuento de células (con pipeta de thoma dil 1:20), tomar 0.5 ml. de suspensión celular y aforar a la marca 11, con azul de tripano al 0.8%, agitar, y cargar la cámara de Neubauer: contar los cinco cuadros de la cuadrícula central y efectuar el siguiente cálculo :

$$\frac{\# \text{ Células} \times 1 \text{ ml.}}{1 \times 10^6} = \text{Vol. Total}$$

Vol. Total - Vol. Inicial de Células en RPMI-1640 = Vol. de RPMI que hay que agregar para ajustar las células a  $1 \times 10^6/\text{ml}$ .

- 6.- En tubos de cultivo de 13 x 100 de Falcon pipetear lo siguiente.





- 7.- Incubar a 37 ° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 48 horas para Fitohemaglutinina (PHA-P) y 96 horas (para medicamentos).
- 8.- Adicionar 0.1 ml de Timidina Trittiada (2uCi/ml) a todos los tubos.
- 9.- Incubar otras 16 a 20 horas, y cosechar, centrifugar a 1500 rpm. 10 min. y desechar el sobrenadante.
- 10.- Adicionar 20 lamdas de solución de Hank's (o bien al decantar dejar una gota sin escurrir); tomar con pipeta Pasteur (células y medio) y verter sobre papel filtro recortado en cuadritos, los cuales se numeran progresivamente, pasar a una base de cartón ayudados con alfileres.
- 11.- Secar a temperatura ambiente.
- 12.- Depositar los papeles filtro en una solución de Tetracloruro de carbón (TCA) al 10% por 30 min.
- 13.- Lavar con agua destilada varias veces y colocar en cada vial el papelito correspondiente y dejar secar toda la noche (o bien secar todos los papelitos en el vaso de precipitado, enumerar los viales y al día siguiente colocar el papelito correspondiente en cada vial).
- 14.- Depositar 8 ml. de líquido de centelleo en cada vial.
- 15.- Llevar al contador de radiaciones Beta.

### CALCULOS

$$\text{I.E.} = \frac{\text{cpm. tubos con células + RPMI + mitógeno (PHA-P)}}{\text{cpm. tubos con células + RPMI}}$$

$$\text{I.E.} = \frac{\text{cpm. tubos con células + RPMI + droga o medicamento}}{\text{cpm. tubos con células + RPMI}}$$

cpm. (cuentas por min.)  
PHA-P (fitohemaglutinina mitógeno)  
RPMI (medio de cultivo)

### 3.4.- CALCULOS ESTADISTICOS

Para comparar el grupo patológico con el grupo control se aplicó la prueba estadística de  $\chi^2$  para inferir estadísticamente si había diferencias significativas de los resultados observados en una población alérgica a medicamentos con respecto a una población sana.

La  $\chi^2$  se utilizó para comparar muestras pareadas en forma simple y fácil de aplicar debido a que el número de muestras no era muy grande  $N = 16$ .

La obtención de la  $\bar{X}$ , D.S. y C.V. para cada metodología es útil para valorar los resultados obtenidos en el protocolo y el estudio de correlación de las diferentes metodologías inmunológicas se realizó mediante el cálculo de la correlación de Pearson ( $r$ ) para evaluar los eventos celulares y humorales que participan en las reacciones de hipersensibilidad en la alergia a medicamentos.

La obtención de valores de referencia en la población mexicana es básica para el análisis de los resultados entre los dos grupos de estudio y obtención de conclusiones.

## **CAPITULO IV**

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1.- RESULTADOS

El método de la Transformación Linfocitaria (T.L.) fué estandarizado, estableciéndose las condiciones óptimas de la dosis-respuesta y tiempo-respuesta.

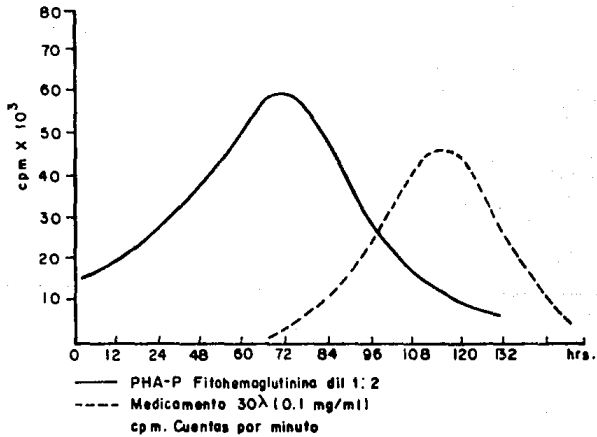
Se encontró que el tiempo óptimo de incubación del antígeno (medicamento) era a las 120 hrs. (5 días) ver Gráfica I (Fig. 2). Se obtuvieron los valores de referencia de la (T.L.) y se relacionan en la Tabla I. Los resultados de las determinaciones inmunológicas del grupo alérgico: T.L, LIF y Desgranulación de Basófilos se muestran en la Tabla II, éstos resultados fueron graficados y comparados con el grupo control y el análisis de datos resultaron estadísticamente significativos  $P < 0.001$  ver Gráfica II.

Se calcularon estadísticamente la  $\bar{X}$ , D.S. y C.V. de los resultados de cada grupo de estudio (Tabla III); obteniendo para el grupo control: T.L =  $1.36 \pm 0.53$ , LIF =  $15 \pm 10$ , D.B =  $15 \pm 15$  y para el grupo alérgico T.L =  $3.37 \pm 1.33$ , LIF =  $28.4 \pm 20.3$  y D.B =  $18.12 \pm 16.06$

En la gráfica III se muestra el porciento de positividad de los resultados del grupo alérgico a medicamentos, obteniendo un valor predictivo correspondiente para T.L. = 87%, LIF = 56% y D.B. = 25%, lo cual muestra una mayor participación celular en los eventos de hipersensibilidad.

La correlación entre las dos técnicas que evalúan inmunidad celular LIF V.S. T.L. muestra baja correlación estadística  $r = -0.52$   $p < 0.02$  (Gráfica IV), no-así la correlación de D.B. VS. T.L. que mostró correlación  $r = 0.22$ ,  $P = N.S$  (Gráfica V).

### ESTIMULACION TIEMPO-RESPUESTA



GRAFICA 1

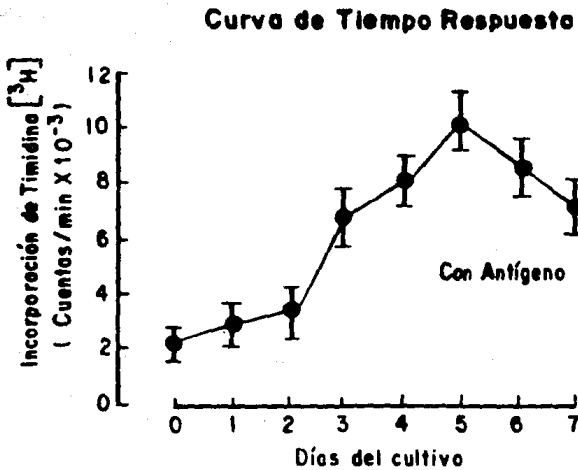


FIG. 2

**Resultados de la T.L. de Personas Sanas**

<b>GRUPO CONTROL</b> (sin antecedentes alérgicos)	
<b>Pacientes</b>	<b>T.L. (I.E.)</b>
1	1.9
2	1.0
3	0.8
4	1.9
5	1.9
6	1.4
7	2.1
8	0.4
9	1.3
10	1.9
11	1.3
12	1.2
13	1.8
14	0.7
15	0.9

**Tabla I**

**T.L. Transformación Linfocitaria**

**I.E. Indices de Estimulación**

## Resultados de las Metodologías Inmunológicas para valorar Hipersensibilidad

GRUPO ALERGICO A MEDICAMENTOS				
Pacientes	Diagnost. Alerg. a Medic.	T.L. (I. E.)	LIF (% de Inhib)	Desgran Basóf. (% de Inhib)
1	"	4.4	0	40
2	"	3.5	24	0
3	"	2.5	40	0
4	"	5.3	32	25
5	"	2.7	55	8
6	"	2.8	6	28
7	"	4.1	59	12
8	"	4.6	0	0
9	"	3.6	41	65
10	"	3.2	17	15
11	"	2.5	16	0
12	"	4.1	7	44
13	"	5.4	7	6
14	"	3.6	40	25
15	"	0.7	51	0
16	"	1.0	59	22

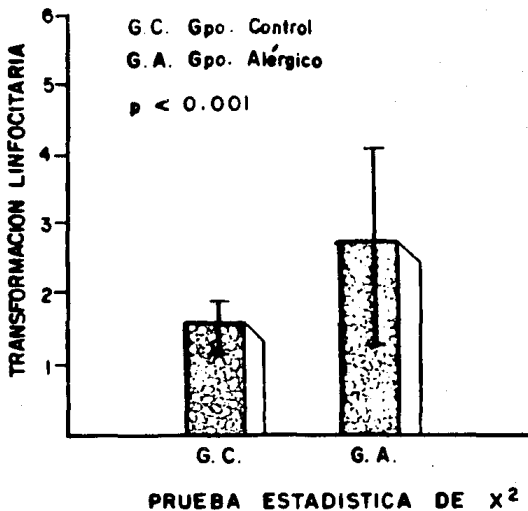
Tabla II

T L Transformación Linfocitaria

I F Índice de Estimulación

LIF Factor de Inhibición de Leucocitos





GRAFICA II

Grupo Alérgico a Medicamentos		T. L. I. E.	LIF % Inhibición	Desgr. de Basófilos % Desgranulación
n = 16	$\bar{X} \pm D. S.$	3.37 $\pm$ 1.33	28.4 $\pm$ 20.3	18.12 $\pm$ 16.06
	C. V.	39.46	71.4	88.63
GRUPO CONTROL S/Anteced. Alerg.				
n = 15	$\bar{X} \pm D. S.$	1.36 $\pm$ 0.53	15 $\pm$ 10	15 $\pm$ 15
	C. V.	38.9	80	83.3

TABLA III

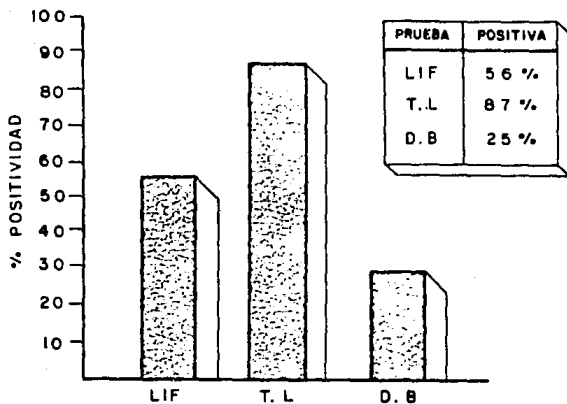
T.L. Transformación Linfocitaria

I.E. Índice de Estimulación

LIF. Factor de Inhibición de Leucocitos

C.V. Coeficiente de Varianza

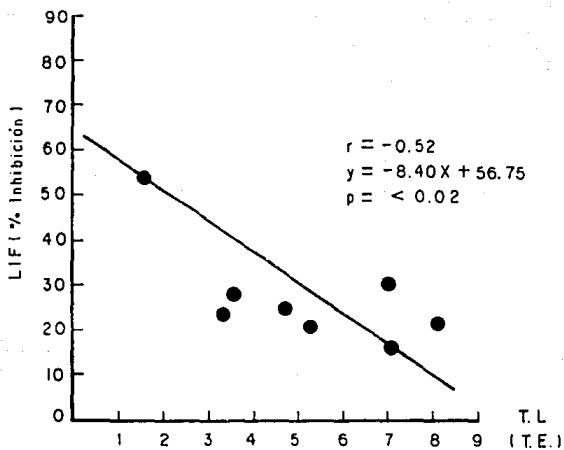
### ALERGIA A MEDICAMENTOS



T.L. - Transformación linfocitaria  
D.B. - Desgranulación de basófilos  
L.I.F. - Factor inhibidor de leucocitos

GRAFICA III

### Correlación LIF vs T.L.



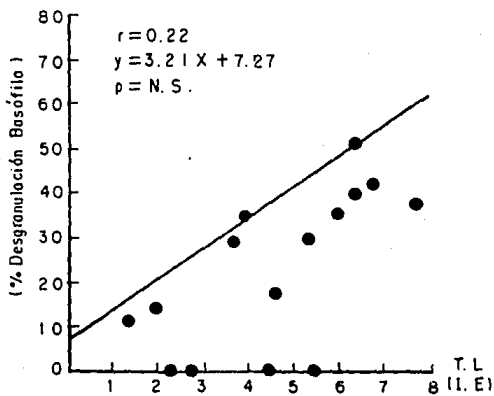
GRAFICA IV

LIF. Factor Inhibidor de Leucocitos

T.L. Transformación Linfocitaria

I.E. Índice de Estimulación

### Correlación entre Desg. de Basófilos y T. L.



GRAFICA V

N.S. No Significativa

I. E. Índice de Estimulación

T. L. Transformación Linfocitaria

#### 4.2.- DISCUSION

El diagnóstico de la alergia a medicamentos está apoyado por el laboratorio de inmunología, y se realizó con los leucocitos de los pacientes, los cuales fueron incubados con los medicamentos seleccionados de acuerdo a la historia clínica, por el método de la Transformación Linfocitaria (T.L.); para evaluar la participación celular en los eventos de hipersensibilidad que desencadenan la alergia.

Esta técnica (T.L.) muestra que la proliferación de linfocitos es debida al estímulo antigénico, al ser incubados los linfocitos con los medicamentos, produciendo aumento en la síntesis de DNA.

La correlación de la estimulación y la respuesta de los linfocitos sensibilizados previamente se mide metodológicamente al agregar timidina tritiada después de la incubación de 120 hrs. Calculando los índices de estimulación (I.E) los cuales fueron de < 3.0 cuando hay alergia; también lo reportaron investigadores como Rocklin, Gill y Koponen.

La experiencia tradicional en cuanto a la metodología inmunológica se basa en pruebas como : LIF y Desgranulación de Basófilos, éstas muestran algunas deficiencias en cuanto a sensibilidad y especificidad como fué demostrado en el trabajo de investigación dando como resultado una predictibilidad baja.

En 1963 Permain, Licette y Fitzgerald mostraron que la prueba de la (T.L) era óptima como auxiliar para el diagnóstico clínico; pero a pesar de ello la técnica no ha tenido la difusión y aplicación como exámen de rutina en el diagnóstico de padecimientos alérgicos, debido al alto grado de complejidad y costo.

Esta prueba por lo tanto sólo puede ser determinada en laboratorios especializados en inmunología y debería ensayarse en forma rutinaria ya que la prueba de Transformación Linfocitaria tiene la ventaja de tener mayor sensibilidad, especificidad y valor predictivo como apoyo en el diagnóstico de enfermedades alérgicas a medicamentos como Eritema fijo, Dermatitis atópica y síndrome de Steven-Johnson.

**CAPITULO V**  
**CONCLUSIONES**



61

## CONCLUSIONES

El método de la Transformación Linfocitaria inicialmente empleado para la valoración de inmunodeficiencia y en el trasplante de órganos resulta también adecuado para la valoración de los fenómenos de hipersensibilidad, como ocurre en los procesos alérgicos, teniendo establecidos los parámetros dosis-respuesta, y tiempo respuesta como se efectuó en el presente trabajo para antígenos (medicamentos).

La respuesta inmunológica de los linfocitos T de los pacientes alérgicos, al ponerlos en contacto con los antígenos, (medicamentos) estimulando y provocando la proliferación celular y obteniendo de ésto un incremento en el índice de estimulación (I.E) con respecto al grupo control sano resulta una técnica más sensible y específica que las empleadas tradicionalmente en un Laboratorio de Inmunología.

Las metodologías como el LIF y la Transformación Linfocitaria valoran la respuesta celular en los fenómenos de hipersensibilidad; en éste trabajo de tesis se observa diferente sensibilidad en las metodologías empleadas; con un valor predictivo mayor en la técnica de la Transformación Linfocitaria con respecto al LIF y baja correlación con la técnica de Desgranulación de Basófilos, que es mediada por la IgE específica o bien otros mecanismos inespecíficos de liberación de histamina.

Las pruebas de laboratorio mencionadas en los síndromes de hipersensibilidad deben de tener una mayor aplicación clínica, no sólo en el diagnóstico y tratamiento, sino en la prevención de futuras recaídas y probables complicaciones dermatológicas como: síndrome de Steven-Johnson, Eritema fijo, y Eczema atópico.

## BIBLIOGRAFIA

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bengt Hallengren, Arne Forsgren and Arne Melander. Effects of antithyroid drug on lymphocyte function in-vitro. J. Clin. Endocrinol Metab, 51: 2, 298-1980
- 2.- Bloom, B.R. And J.R. David. In vitro methods in cell mediated and Tumor immunity, Academic Press, Inc. New York Edic. 1976
- 3.- Conti, Cifone MG. Alesse. E.Janning Angelestti P. V. Effect of Salicylates on lymphocyte blastogenesis in-vitro association with other non esteroide anti-inflammatory drugs. Clin. Rheumatology June 2 (2) 127-132. 1983.
- 4.- Daniel P. Stites, John D. Stobo, H.Hugh Fundenberg, J, Vivian Wells. Inmunología Básica y Clínica 4a. Ed. El Manual Moderno pag. 377-520. 1983.
- 5.- Dinorello, CH, A. Interleukin-I And the pathogenesis of the acute-phase response. New England J. Med, 311 1413-1984.
- 6.- Eisenberg. R. A. Cohen Philip L. MD. The role immunology mechanisms in the pathogenesis of rheumatic diseases. Primer on Rheumatic Diseases. pag. 36 - 1988.
- 7.- Engvall Eva, Enzyme Immunoassay Elisa and Emit. Inmunología y Alergia Methods in Enzymology del Notibehring No. I Vol. 2 Enero 1988
- 8.- Garon, G.A. Lymphocytes and drug hypersensitivity. The Lancet Noviembre 12 1081, 1966.
- 9.- Gill A. Fred. The association in increased spontaneous lymphocyte transformation in-vitro with clinical manifestation of drug hypersensitivity. J. of Immunology Vol 98 No. 4, 778-785 1967.

- 10.- Heng M.C, Kloss S.G. Chase D.G. Erythroderm associated with mixed lymphocyte-endothelial cell interaction and Staphylococcus aureus infection, J. Dermatol Dic. 115 (6) 693-705. 1986
- 11.- Ivan Roitt. Inmunología Esencial,  
Edit. JIMS. 6a. Edic. Impreso en España pag 93-95 1988.
- 12.- Jay W. Smith, Alton L. Steiner and Charles W. Parker.  
Human lymphocyte metabolims, effects of cyclic and Nucleotides on stimulation by phytohemaglutinin. J. of Clinical Investigation, Vol (50) 442-445. 1971.
- 13.- Jimenez-Camarasa J.M. García Calderón and Moragas, M.D.  
The lymphocyte transformation test in fixed drug eruption. The New England J. of Med Vol. 292 No. 16, 819-821, 1975.
- 14.- Joseph A. Bellanti. Inmunología,  
Edit. Interamericana, S.A. de C.V. 3a Edic. pag. 40, 70, 138. 1986
- 15.- Koponen Marianne,, P. D. Werner J. Pichler, M.D. and L. DE Weck M.D.  
T. Cell reactivity to penicillin phenotypic analysis of in-vitro activated cell subsets. J. Allergy Clin. Inmunol, Oct. Vol. (78): 645-652. 1986
- 16.- Libros de Investigación Y Ciencia, Varios Autores  
Copyright Edit. Labor, S.A. Impreso en España. 1a. Edic. pag. 79-83. 1983
- 17.- Noel R. Rose y Herman Friedman. El Laboratorio en Inmunología  
Edit. Médica Panamericana, 2a. Edic. pag. 281-291-913. 1984
- 18.- Patterson Roy. M.D. Diagnosis and treatmen of drug allergy  
J. Allergy Clin. Inmunol, Feb. 380-384. 1988

- 19.- Permain G. Lycette R.R. Fitzgerald P.H. Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet I, 637. 1963.
- 20.- Rocklin, R. John. Detection in-vitro of celular drug hipersensitive. J. Allergy Clin. Immunol. 13:29-34. 1971.
- 21.- Rok, K.L. y B. Benacerraf. The role of the molecules in the activation of T. lymphocytes IV the bases of the thymocytes IL-1 response and its possible role in the generation of the T. cell repertoire. J. Immunol. 132; 1654. 1984
- 22.- Suzumura A. Silberberg D.H. Lisak R.P. The expression of MHC antigens on oligodendrocytes; induction of polymorphic H-2 expression by lymphokines. J. Neuroimmunol. May; II (3); 179-90 1986.
- 23.- Valverde E. J. M. Vich, J. Huguet J.V. García Calderón and P.A. García Calderón. An in-vitro study of lymphocytes in patients with atopic dermatitis. Clinical Allergy Vol 13 pag. 81-88 1984.
- 24.- Waithe K. W. I. Hirschorn. Lymphocyte response to activators. Handbook of Experimental. Immunology Vol 2 Cellular Immunology. 1976
- 25.- Williams Rojas M. Inmunología FondoEducativo Interamericano. Inmunología 5a. Edic. pag. 10-13. 1983.
- 26.- Williams W. R. Ahd B.H. Davies. Modulation of lymphocyte adrenergic receptors and transformation responses by therapeutic drugs. J. Clin Lab Immunol. 13; 29-34 1984.
- 27.- Williams W.R. Davison, L. A. Effects of therapeutics drugs on lymphocyte transformation. J. Clin. Pharmacol. Jan. 15 (1) 83-90 1983.
- 28.- Yatti, A. Richard: Serum inhibitors of lymphocyte responses. The Lancet June 26: 1351-1352, 1971