

53
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA "

PRODUCCION, PURIFICACION Y
ESTANDARIZACION DEL ANTICUERPO
MONOCLONAL ANTI-CD4⁺ PARA LA ELIMINACION
IN VIVO DE ESTA SUBPOBLACION CELULAR.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ELIZABETH SANDOVAL LEYVIN

L



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México




UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO
DE INMUNOLOGIA L-313
CAMPUS - II
F E S ZARAGOZA
U N A M

BAJO LA DIRECCION DE LA Dra. MARTHA LEGORRETA HERRERA

APOYADO POR CONAC y T CON EL PROYECTO No. 0683P-M





JURADO


PRESIDENTE: Dr. Ruben Marroquín Segura

VOCAL: Dra. Martha Legorreta Herrera

SECRETARIO: Q.B.P: Francisco Alvarado Pérez.

SUPLENTE: Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera.

SUPLENTE: M. en C. Teresa Corona Ortega





*DEDICO ESTE TRABAJO
A MI MAMA: MARTHA LEYVIN G.*

Por que este trabajo es en respuesta de su confianza, de que siempre ha tenido tiempo para escucharme y alentarme con sus consejos para seguir adelante como ser humano y profesionista. Gracias a ella estoy logrando una de mis metas mas importantes por lo que con amor infinito se lo dedico.



AGRADECIMIENTOS

A mi padre Lic. Guillermo Sandoval A. por sus valiosos consejos e incondicional ayuda.

A mi tío Lic. José Faustino Pérez G., por apoyarme en los momentos difíciles de mi vida y sobre todo por brindarme la confianza que me ayudo a seguir adelante.

A mi tío Ing. Alberto Pérez G Por su invaluable ayuda y sus valiosos consejos.

A mis primos Por todo el respeto y confianza que me han brindado. Y por que se que cuento con ustedes en todo momento.

A la Dra. Martha Legorreta H. Mi gratitud por su orientación, consejos y el apoyo que me ha brindado en todo momento para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Pedro Sánchez Cruz, por colaboración, invaluable ayuda y sus consejos, pero sobre todo por su amistad. Gracias.

A la Q.F.B: Lourdes Vega N, por su compañía, amistad y apoyo incondicional,

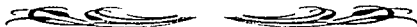


A Miguel Gabriel, Cam y Cruz, mis amigos incomparables, quienes con sus invaluable consejos y apoyo me han dado la fuerza necesaria para poder concluir esta etapa de mi formación.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros con los que he convivido en la Universidad, principalmente: Benita, Beto, Eunice, Guadalupe, Manuel, Rosalba, y Sandra. Con quienes he compartido muchos momentos de alegría.



Agradezco, en forma muy especial, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo a los ratones, cobayos y ratas que fueron sacrificados (q. d. e. p.).



Mi agradecimiento a los profesores.

Dr. RUBEN MARROQUIN SEGURA
M. en C. MAURILIO FLORES PIMENTEL
Q.F.B. Ma. de LOURDES VEGA NAVARRETE
Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA
Q.B.P. DORA ALICIA GONZALEZ PEREZ
Q.F.B. FRANCISCO J. PARADA GARCIA
Q.F.B. ARMANDO RAMIREZ GONZALEZ
Q.F.B. JOSE OSCAR GONZÁLEZ MORENO

Por sus compañía, consejos y disposición en todo momento para la realización de este trabajo:



Agradezco al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) muy especialmente al Biólogo Sigifredo Pedraza, por la asesoría y apoyo brindado para la realización del presente trabajo.



Agradezco ala Escuela Militar de Graduados, especialmente al M. en C. Ramón Arturo Valdés Espinosa y al M. en C. Pedro Sánchez Cruz, por permitirme realizar una parte experimental, así como su asesoría y apoyo brindado.

I N D I C E

	Página
I. Introducción.	1
II. Fundamentación del tema.	
1. El sistema inmune.	3
2. Estructura y clasificación de las inmunoglobulinas	4
3. Linfocitos T y sus marcadores.	5
4. Papel de las células T en paludismo	6
4.1. Papel de las células T CD4'	6
4.2. Papel de las células T CD8'	8
5. Anticuerpos monoclonales.	9
5.1. Obtención de anticuerpos monoclonales.	9
5.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales <i>in vivo</i>	11
5.1.2. Producción de anticuerpos monoclonales <i>in vitro</i>	11
6. Purificación de anticuerpos monoclonales.	12
6.1. Precipitación con Sulfato de Amonio.	13
6.2. Cromatografía por afinidad. Fc-específica.	14
7. Citometría de Flujo.	15
8. Células formadoras de anticuerpos.	16
III. Planteamiento del problema.	18
IV. Objetivos.	20
V. Hipótesis.	21
VI. Material.	22
VII. Metodos.	
• Producción de anticuerpos monoclonales anti-CD4' en medio de cultivo.	24
• Producción de anticuerpos monoclonales anti-CD4' en líquido de ascitis.	24
• Preparación de membranas para diálisis.	25
• Precipitación de gamma-globulina con $(NH_4)_2SO_4$.	25
• Purificación monoclonal utilizando proteína G.	26
• Concentración del anticuerpo monoclonal anti-CD4.	26
• Electroforesis.	27
• Determinación de células formadoras de anticuerpo	29
Técnica de Jerne	29
Modificación de Dresser a la técnica de Jerne.	29

• Obtención de suero de cobayo.	30
• Obtención de suero de rata.	30
• Inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (FACS)	31
• Inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo (FACS)	31
• Eliminación de la subpoblación celular CD4 ⁺ .	32
Primer protocolo.	32
Segundo protocolo.	32
Tercer protocolo.	33
• Diseño experimental	34
VIII. Resultados.	35
IX. Análisis de resultados.	49
X. Conclusiones.	53
XI. Preparación de soluciones.	54
XII. Referencias	58

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Estructura básica de una inmunoglobulina.	4
Fig. 2. Regulación de los mecanismos inmunes hacia paludismo.	8
Fig. 3. Vía de síntesis de purinas.	10
Fig. 4. Cromatografía por afinidad Fc-específica.	14
Fig. 5. Corrimiento electroforético. Condiciones reductoras.	36
Fig. 6. Células foadoras de anticuerpos	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades fisico-químicas y biológicas de inmunoglobulinas de ratón.	5
Tabla 2.	Concentración de algunas proteínas en sobrenadante a varias cantidades de suplementos de suero.	12
Tabla 3.	Afinidad hacia proteína A/G por varios anticuerpos monoclonales.	15
Tabla 4.	Porcentaje de células CD3+ y CD4+ en ratones F1 normales.	37
Tabla 5.	Poblaciones celulares CD3+ y CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios. Primer protocolo.	39
Tabla 6.	Poblaciones celulares CD3+ y CD4+ en ganglios linfáticos. Segundo protocolo	41
Tabla 7.	Porcentaje de linfocitos CD3+ y CD4+ en ratones no inmunes tratados con el YTS 191.1. Día 12 de tratamiento del tercer protocolo.	44
Tabla 8.	Poblaciones celulares CD3+ y CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios. Tercer protocolo.	43
Tabla 9.	Células formadoras de anticuerpos determinadas por la técnica de Jerne.	47
Tabla 10.	Células formadoras de anticuerpos determinadas por la técnica de Dresser.	47

INDICE DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1. Lecturas de absorbancia de fracciones obtenidas al pasar el MAb por la columna de proteína G.	35
Gráfica 2. Histogramas de la población CD4+ de timo. Marcados con MAb YTS 191.1.	36
Gráfica 3. Histograma de la población celular CD4+ en sangre periférica. Protocolo 1, día 5.	38
Gráfica 4. Porcentaje de células CD4+ en sangre. Protocolo 1.	39
Gráfica 5. Porcentaje de células CD4+ en órganos linfoides primarios, secundarios y sangre periférica. Protocolo 1.	40
Gráfica 6. Porcentaje de células CD3+ en órganos linfoides primarios, secundarios y sangre periférica. Protocolo 1.	40
Gráfica 7. Cinética de eliminación de la población CD4+ en ganglios linfáticos. Protocolo 2.	41
Gráfica 8. Porcentaje de células CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios. Protocolo 3.	42
Gráfica 9. Porcentajes de células CD4+ de ratones sin tratamiento y del día 12 de tratamiento del tercer protocolo, de ratones tratados con IgG de rata, ratones no inmunes e inmunes tratados con YTS 191.1.	44
Gráfica 10. Comparación de la eliminación de la población CD4+ en los protocolos realizados.	45
Gráfica 11. Comparación de la determinación celular por inmunofluorescencia directa e indirecta.	46

ABREVIATURAS

Ab = Anticuerpo
Ag = Antígeno
APS = Persulfato de amonio
CS = Coeficiente de sedimentación
Cadena H = Cadena pesada.
Cadena L = Cadena ligera.
CD = Cluster Designation (Designación de agrupamientos).
CD3 = Marcador de superficie que poseen todos los linfocitos T.
CD4 = Marcador de superficie que poseen todos los linfocitos T cooperadores.
CD8 = Marcador de superficie que poseen todos los linfocitos T citotóxicos.
CFA = Células formadoras de anticuerpos
CPA = Células presentadoras de antígeno.
CHO's = Carbohidratos.
EC = Eritrocitos de camero
HGPRT = Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa.
IFN- γ = Interferón-gamma.
Ig = Inmunoglobulina.
IL = Interleucina.
LT- α = Linfotóxina alfa.
MAb = Anticuerpo monoclonal.
MHC-I = Complejo principal de histocompatibilidad clase I.
MHC-II = Complejo principal de histocompatibilidad clase II.
NK = Células Natural Killer.
NO = Oxido nítrico.
P.M = Peso molecular
PBS = Solución amortiguadora de fosfatos.
pI. = Punto isoelectrico.
rpm = revoluciones por minuto.
SAS = Solución saturada de sulfato de amonio.
SCID = inmunodeficiencia severa combinada.
SDS = Duodecil sulfato de sodio.
SFB = Suero bovino fetal.
TCR = Receptor de células T.
TH₁ = Células T CD4+ tipo 1 (células T helper tipo 1).
TH₂ = Células T CD4+ tipo 2 (células T helper tipo 2).
TNF- β = Factor de necrosis tumoral-beta.

I

INTRODUCCION

El paludismo es una enfermedad causada por un parásito protozoario del género *Plasmodium*, se transmite al hombre por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*. En los huéspedes vertebrados *Plasmodium sp* tiene un ciclo de vida complejo, que involucra varios estadios de diferenciación, tanto en su morfología como en su antigenicidad. El ciclo de vida incluye estadios extracelulares denominados esporozoitos y merozoitos, estas formas invaden hepatocitos y eritrocitos respectivamente; así como también incluye formas intracelulares que invaden células del parénquima hepático y eritrocitos (Langhorne, 1994). Cada esporozoito puede generar 20,000 o más merozoitos que se liberan de los hepatocitos infectados, para introducirse en los eritrocitos (Wayne, 1988).

Cada fase de su ciclo de vida expresa un gran número de antígenos, los cuales son capaces de estimular diversas respuestas en el sistema inmune. Algunas de estas respuestas son importantes en el desarrollo de protección, mientras que otras están involucradas en la patología. La inmunidad a paludismo se establece bajo condiciones naturales de forma muy lenta, requiere de repetidas infecciones, lleva años desarrollarla y puede no ser absoluta ya que la parasitemia persiste en ausencia de enfermedad clínica, lo que se traduce como fuente potencial de transmisión (Legerreta-Herrera, et al., 1994)

Hoy en día el paludismo es una enfermedad ampliamente extendida. El número de casos anuales varía de 150 a 300 millones. Se han hecho intentos para erradicar el paludismo por medio de insecticidas y drogas antiparasitarias, al principio tuvieron éxito, pero el parásito desarrolló mecanismos de resistencia a las drogas y el vector desarrolló resistencia al DDT. Estos sucesos condujeron a un aumento en la investigación en Inmunología del paludismo. (Perlmann, 1988. Weidanz., et al., 1990).

Se han realizado avances en el estudio de la inducción, regulación y mantenimiento de mecanismos inmunes hacia *Plasmodium*. Observándose que la inmunidad contra paludismo involucra respuestas tanto celulares como humorales (Doolan, Beck y Good, 1994). Las células T juegan un papel importante ya que interactúan con las células B para la formación de anticuerpos, en el primer grupo de células se encuentran dos subpoblaciones celulares que son las células T cooperadoras (CD4+) y las células T citotóxicas (CD8+) las cuales mediante la producción de citocinas o bien de forma directa inducen en el huésped respuestas inmunes con actividad antiparasitaria (Weidanz, Melancon y Cavacini 1990).

Este trabajo forma parte de otro de mayor magnitud en donde se pretende estudiar la participación de las células CD4+ y células CD8+ en la especificidad de la respuesta inmune a paludismo. Una forma de evaluar la participación de las subpoblaciones celulares CD4+ y CD8+ es por medio de selección negativa. Esto es, eliminarlas *in vivo* y observar las modificaciones de la respuesta inmunológica consecuencia de esta eliminación.

El objetivo principal de esta tesis es la eliminación *in vivo* de la subpoblación de células T CD4+ mediante el uso del anticuerpo monoclonal anti-CD4+ (YTS191.1) así como verificar la eficiencia de la eliminación de las células *in vivo* por la técnica de Jerne y por fluorocitometría de flujo.

II

FUNDAMENTACION DEL TEMA

1. EL SISTEMA INMUNE:

El cuerpo humano libra un combate constante e imperceptible contra microorganismos invasores. La batalla es dirigida por el sistema inmune, capaz de eliminar virtualmente cualquier invasor sin afectar a los tejidos del propio cuerpo. Los principales defensores son los linfocitos B mediante la producción de anticuerpos que son moléculas bifuncionales que se unen de manera específica al antígeno e inician una gama de fenómenos secundarios como la fijación de complemento. Participan también las células T reforzando la actividad de los linfocitos B y potenciándola con una segunda respuesta defensiva. (Grey, Sette, Buus, 1990, Stites et al., 1991).

Una de las formas en las que se puede iniciar la respuesta inmune es cuando el receptor de una célula B reconoce a un determinante antigénico de un antígeno, lo cual induce la activación del linfocito B quien se transforma en célula plasmática. Estas células plasmáticas producen anticuerpos con especificidad para el determinante reconocido primero por el receptor original que lleva el linfocito B. Todos los anticuerpos producidos por las células pertenecientes a la misma clona tienen la misma estructura química. Un antígeno posee un gran número de determinantes, y el huésped responde produciendo diferentes anticuerpos contra los diversos determinantes, una respuesta de anticuerpo policlonal. (Grey, Sette y Buus, 1990; Handbook 1994).

Las células B son capaces por sí solas, de llevar a cabo el reconocimiento, interaccionando sin intermediarios, con los antígenos. Sin embargo las células T solo pueden responder al antígeno cuando una célula accesoria lo presenta, a estas células se les denomina células presentadoras de antígeno (CPA), entre las cuales cabe señalar a los macrófagos, células dendríticas (células especializadas que se encuentran en los nódulos linfáticos y en el bazo) y las propias células B. Después que el linfocito T interacciona con el antígeno, se activa y ejerce sus funciones de célula citotóxica o de célula cooperadora, para lo cual secreta sustancias que movilizan a las otras células estimulando por ejemplo la maduración de las células B, así mismo la producción de anticuerpos (Grey, Sette y Buus, 1990).

ESTRUCTURA Y CLASIFICACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Los anticuerpos se encuentran en la fracción globulínica de las proteínas que circulan en la sangre y se denominan inmunoglobulinas, constituyen junto con el complemento la sección humoral del sistema inmune (Sikora y Smedley, 1986).

Todas las inmunoglobulinas independientemente de su especificidad, tienen una estructura común de 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas (H), con grupos de oligosacáridos covalentemente unidos y 2 cadenas ligeras no glicosiladas (L). Las cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuros. La cadena ligera también se encuentra unida por enlaces disulfuros a una cadena pesada. (Figura 1). Hay dos tipos de cadenas ligeras, κ y λ . Las moléculas individuales de anticuerpos pueden contener cadenas κ ó λ pero nunca ambas. (Stites, 1991; Abbas, 1995)

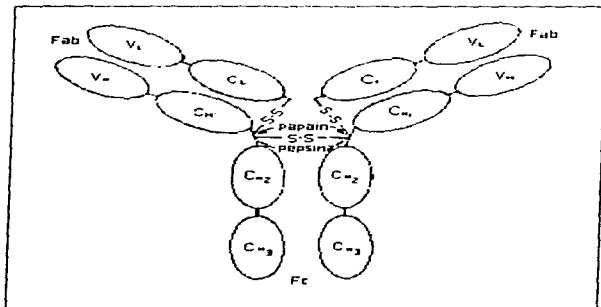


Figura 1. Estructura básica de una inmunoglobulina.
(Manson, 1992)

Las inmunoglobulinas pueden dividirse en 5 clases de acuerdo a su cadena H; IgG (γ), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) e IgE (ϵ). Anticuerpos de clase G, D y E son de tipo monomérico H₂L₂. La IgA en suero es principalmente monomérica, pero en secreciones se encuentra

como un dímero unido por la pieza secretora y la cadena J. (H₂L₂)-SC-J-(H₁L₁). La IgM está compuesta por 5 unidades monoméricas (H₁L₂), (Handbook 1994).

Las inmunoglobulinas de ratones se pueden agrupar como en los humanos, en 5 clases IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, de acuerdo a sus componentes de cadenas pesadas. Las cadenas ligeras también son de tipo κ o λ. Las IgG de ratón pueden ser subdivididas en 4 subclases IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃, de acuerdo a sus componentes de la cadena pesada (gamma). Las cadenas pesadas de estas inmunoglobulinas tienen virtualmente el mismo tamaño molecular y muy similar corrimiento electroforético, pero sus secuencias de aminoácidos son considerablemente diferentes. La tabla 1 muestra algunas propiedades físico-químicas y biológicas de inmunoglobulinas de ratón (Handbook 1994).

Ig.	cadena H	cadena L	CS	P.M.	PM de H	CHO's. (%)	pl
IgG ₁	γ	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	7.0-8.5
IgG _{2a}	γ _{2a}	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	6.5-7.5
IgG _{2b}	γ _{2b}	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	5.5-7.0
IgG ₃	γ ₃	κ, λ	7S	150 000	50 000	2-3	-
IgM	μ	κ, λ	19S	900 000	80 000	12	4.5-7.0
IgA	α	κ, λ	7S	170 000	70 000	7-11	4.0-7.0
IgD	δ	κ, λ	7S	180 000	68 000	12-14	-
IgE	ε	κ, λ	8S	190 000	80 000	12	-

Ig. = Inmunoglobulina

H = Cadena pesada

L = Cadena ligera

CS = Coeficiente de sedimentación

P.M. = Peso Molecular

CHO's. = Carbohidratos

pl = punto isoeléctrico

Tabla 1. Propiedades físico-químicas y biológicas de inmunoglobulinas de ratón. (Handbook 1994)

3. LINFOCITOS T Y SUS MARCADORES.

Los linfocitos expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie. Algunas de estas moléculas aparecen en determinados estados de la diferenciación o activación celulares, durante breves periodos de tiempo, mientras que otras son características de distintas líneas celulares. Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores y en muchas de ellas esta identificación se puede realizar mediante anticuerpos monoclonales específicos. Se ha desarrollado una nomenclatura para estas moléculas de la superficie celular mediante el sistema CD (designación de agrupamientos; del inglés Cluster Designation), en el que los marcadores se numeran como CD1, CD2, etc. (Roitt, 1994).

La maduración del linfocito T en timo, se acompaña de una serie compleja de cambios en su fenotipo, el primer marcador que aparece sobre su superficie es el CD2 (receptor para los eritrocitos de carnero), aparece un rearrreglo de los genes TCR (receptor de la célula T), posteriormente aparece el receptor CD3, éste marcador al igual que el CD2, lo poseen todos los linfocitos. Todavía en timo, le aparecen los marcadores CD1, CD4 y CD8. Los linfocitos se caracterizan de acuerdo a los marcadores de superficie. El linfocito T citotóxico expresa CD8, mientras que los linfocitos T cooperadores expresan CD4. Dentro de las funciones de la respuesta inmune mediada por linfocitos T, están: Las respuestas efectoras antígeno-específicas, y las respuestas que regulan la actividad de otros linfocitos, mediante la secreción de linfoquinas. Dentro de las funciones efectoras están: la citotoxicidad mediada por células, la inmunidad mediada por células T y B, y la secreción de linfoquinas potentes, por ejemplo, interferón-gamma e interleucinas (Smith D. L. *et al.*, 1992).

4. PAPEL DE LAS CÉLULAS T EN PALUDISMO.

Las células T parecen jugar un papel importante en montar una respuesta inmune contra paludismo ya que involucran dos mecanismos principales como son la regulación en la formación de anticuerpos y la inducción de una respuesta de tipo celular. Con estos mecanismos se induce y se mantiene la inmunidad, después de una exposición inicial, reflejando una memoria a largo periodo. (Troye-Blomberg M. 1994; Langhorne J. 1994).

Se ha establecido que el desarrollo de una inmunidad contra esta infección es timo dependiente, los eventos que lo confirman son: a) Los animales deficientes de células T son incapaces de responder efectivamente contra *Plasmodium*. b) El desarrollo de inmunidad protectora está asociada con la activación de células T por células presentadoras de antígeno y c) las células T de animales inmunes a paludismo transfieren tal inmunidad a animales receptores no inmunes. Intervienen principalmente las poblaciones celulares CD4+ y CD8+. De las cuales se desconoce de que forma participan en la especificidad de la respuesta inmune (Weidanz W. y Long 1988; Troye-Blomberg, *et al.*, 1994).

4.1. Papel de las células CD4+

Los linfocitos T tipo CD4+ forman el subgrupo denominado células cooperadoras debido a su capacidad para incrementar las respuestas de las células B y amplificar las respuestas que las células T CD8+ llevan a cabo. Los linfocitos T CD4+ por lo general reconocen antígenos peptídicos que están unidos a las moléculas clase II del MHC (Complejo principal de histocompatibilidad) presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno (Godfrey H. M. y Zlotnik A., 1993).

En paludismo, las células CD4+ son de vital importancia para el desarrollo de inmunidad en la etapa eritrocítica, esto se ha demostrado tanto en modelos experimentales animales como en humanos (Troye-Blomberg, *et al.* 1994). Las células CD4+ comprenden dos tipos de células funcionales, que se clasifican con base en su producción de citocinas en: células TH₁ y células TH₂. El balance entre estas dos subpoblaciones es importante para eliminar la infección (Langhorne, 1994; Taylor-Robinson, 1995).

Después de la exposición al antígeno en un contexto de moléculas clase II del MHC, las células T CD4+ se activan y proliferan, produciendo diferentes citocinas. El patrón de citocinas que producen estas células permite hacer una diferenciación entre dos subpoblaciones: Las células TH₁ producen: Interleucina-2 (IL-2), Interferón-gamma (IFN- γ) y Linfotoxina-alfa (LT- α también conocida como TNF- β). Mientras que las células TH₂ producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citocinas producidas por las células TH₁ están involucradas en reacciones inflamatorias y a su vez estimulan a los macrófagos como células presentadoras de antígenos. Las citocinas de TH₂ están relacionadas con el factor de crecimiento y en la diferenciación de células B, por lo que inducen la producción de anticuerpos. Por otro lado algunas citocinas secretadas por TH₁ y TH₂ pueden llevar a cabo un efecto mutuamente inhibitorio, como sucede con el IFN- γ producido por TH₁ que inhibe la función de IL-4 producida por TH₂, así como también las células TH₁ y las células B que producen IL-10 citocina que inhibe al IFN- γ producido por TH₁ (Meding y Langhorne, 1991; Mossman y Sad, 1996).

Las citocinas son importantes en la respuesta inmune contra el paludismo, (Fig. 2) por ejemplo la presencia de Interleucina-12 (IL-12) activa a células TH₁, las que a su vez activan otras células como macrófagos capaces de eliminar al parásito. Por otro lado la presencia de IL-4 activa a células TH₂ y estas a su vez producen factores de diferenciación y proliferación para los linfocitos B que son importantes para el control y eliminación del parásito al final de la infección, puesto que producen anticuerpos específicos contra el parásito (Von-Der-Weid, *et al.* 1992; Langhorne, 1994).

La interacción que existe entre las células CD4+ TH₁ y los linfocitos B se estudió en ratones SCID (ratones con inmunodeficiencia severa combinada) a quienes se les transfirieron células T CD4+ inmunes y se observó que estas células protegían a los ratones, es decir eran capaces de controlar la infección, sin embargo, cuando se les transfirieron células CD4+ y células B de los ratones fueron capaces de eliminar a los parásitos (Meding y Langhorne, 1991).

Por otro lado, el óxido nítrico (NO) juega un papel significativo en una parasitemia primaria de paludismo, pero no en una parasitemia recrudesciente. El NO involucrado puede estar regulado por TH₁ con la secreción de IFN- γ , el cual activa macrófagos para producir cantidades grandes de NO que matan a los parásitos directamente. TH₂ secreta IL-4 que coopera con células B para producción de anticuerpos específicos IgG, (Taylor-Robinson, *et al.* 1993).

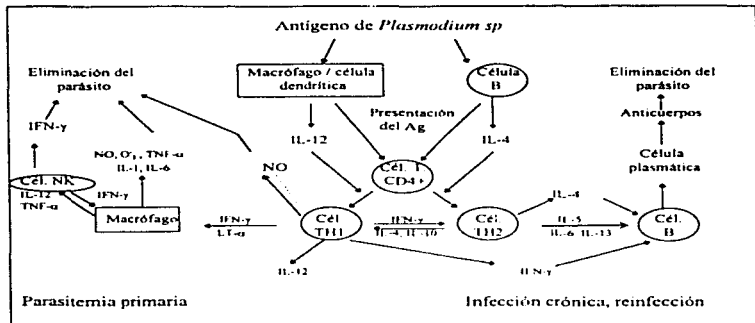


Figura 2. Regulación de los mecanismos inmunes hacia paludismo. (Taylor-Robinson, et al. 1993).

4.2 Papel de las células T CD8+.

Las células T CD8⁺ regulan la mayoría de la citotoxicidad específica para el antígeno, poseen la capacidad para matar otras células infectadas por parásitos (intracelulares) o por virus. Reconocen los antígenos peptídicos unidos a las moléculas clase I del MHC sobre la superficie de la célula blanco. Como consecuencia de esa interacción se activan y liberan linfocinas (como IL-2 e IFN-γ), que pueden incrementar las respuestas inmunitarias de otros linfocitos T y B. (Kabelitz, et al. 1988; Godfrey, et al. 1993).

En el caso de la infección con *Plasmodium*, las células CD8⁺ se activan y ejercen una actividad citotóxica, además de liberar citocinas, amplificando de esta forma la función de las células CD4⁺ en la activación de mecanismos efectores antiparasitarios (Weidanz, Melancon-Kaplan y Cavacini, 1990). No obstante su participación en estadios eritrocíticos no se ha demostrado claramente, se sugiere que las células CD8⁺ en paludismo no son requeridas para suprimir la infección eritrocítica, esto debido a que los eritrocitos humanos poseen moléculas MHC clase I en cantidades muy bajas (reticulocitos) por lo que sería difícil el reconocimiento del antígeno por CD8⁺ (Van Der Heid, et al. 1993. Troye-Blomberg, 1994).

A nivel hepático las células T citotóxicas CD8⁺ actúan limitando el desarrollo de esporozoitos por lo que se cree que estas células tienen funciones importantes contra

estadios pre-eritrocíticos (Rodríguez. *et al.*, 1991). Se ha observado que IFN- γ e IL-6 actúan en la infección hepática, directamente o como resultado de una cascada de eventos, restringidos por MHC y células T citotóxicas, por lo que se sugiere que las células CD8⁺ pudieran inducir protección inmune en contra del estado pre-eritrocítico (Mazier D., 1990. Seguin-MC. *et al.* 1994).

5. ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los Anticuerpos Monoclonales (MAbs) son anticuerpos con una especificidad definida y predecible. Son completamente homogéneos química, física e inmunológicamente. Así mismo no se diferencian estructuralmente de otros anticuerpos que se encuentran bajo condiciones naturales. La propiedad que hace únicos a los MAbs es que todas las moléculas de una preparación cualquiera son idénticas. Su reacción con un antígeno definido debe ser exactamente la misma todas las veces. Es precisamente ésta constancia en su preparación y en efecto, lo que los hace ser tan útiles (Sikora y Smedley, 1986; Handbook 1994; Stites, 1991).

Para obtener en el laboratorio una cantidad ilimitada de un anticuerpo definido contra un antígeno, se necesita el aislamiento y la inmortalización de la clona de linfocitos B de un animal productora de anticuerpos. Dicha clona podría ser aislada y crecer *in vitro*, mediante cultivo celular. De esta forma, los linfocitos B clonados continuarían produciendo el anticuerpo que podría obtenerse del fluido sobrenadante que cubre las células de cultivo. Un inconveniente es que las células productoras de anticuerpos tienen una vida corta cuando son cultivadas *in vitro*; Sin embargo un tipo de célula que podía cultivarse fácilmente es el de una enfermedad maligna de los linfocitos B, conocida como mieloma o plasmacitoma, las cuales tienen la capacidad de reproducirse indefinidamente. En 1975, Kohler y Milstein describieron que las células productoras de anticuerpos pueden ser inmortalizadas fusionándolas con líneas celulares del mieloma. Cuando el proceso de fusión es completo se establece una colonia o una clona aislada de células hijas que se conocen como hibridomas que han heredado algunas características de ambos progenitores, estas células producen un anticuerpo el cual se conoce como anticuerpo monoclonal (Sikora y Smedley, 1986; Coligan. *et al.* 1992).

5.1. Obtención de anticuerpos monoclonales.

Para determinar que linfocito va a ser inmortalizado, se inmuniza a un animal de experimentación por inyección del antígeno de interés, el sistema inmune del ratón pone a funcionar los linfocitos B capaces de producir anticuerpos que reconocen al antígeno

utilizado en la prueba. Después se sacrifica al animal y de su bazo se obtienen los linfocitos que se utilizarán en el proceso de fusión con la línea del mieloma. De esta manera es muy probable que muchos de los linfocitos fusionados estuviesen secretando anticuerpo contra el antígeno de interés (Catty, 1989).

La selección de los hibridomas productores del anticuerpo es de acuerdo a dos propiedades: 1) falta de producción o de secreción de inmunoglobulinas y 2) carencia de actividad de la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Las células se fusionan por exposición rápida al polietilenglicol, permaneciendo en el cultivo tres poblaciones celulares: células B, células de mieloma e híbridos. Las células B mueren en forma natural, ya que termina su ciclo de vida, al morir estas se inicia la elección entre las células de mieloma y los hibridomas, es por esto que se lleva a cabo el crecimiento en medio HAT que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, debido a que las células de mieloma carecen de la enzima HGPRT por lo que son sensibles letalmente a la aminopterina la cual bloquea la vía de síntesis de purinas de novo (Fig. 3). A diferencia de las células normales que no son sensibles a la aminopterina ya que pueden llevar a cabo la vía de salvamento utilizando HGPRT y timidina para la síntesis de purinas, de esta manera las células del mieloma mueren y los hibridomas comienzan a duplicarse cada 24-48 horas y las colonias se forman con rapidez (Stites et al, 1991; Coligan et al, 1992; Abbas, 1995).

La producción de MABs se puede lograr por 2 métodos: *in vivo*, mediante la formación de líquido de ascitis en ratones o ratas e *in vitro*, en donde las células del hibridoma se cultivan en un medio de crecimiento artificial

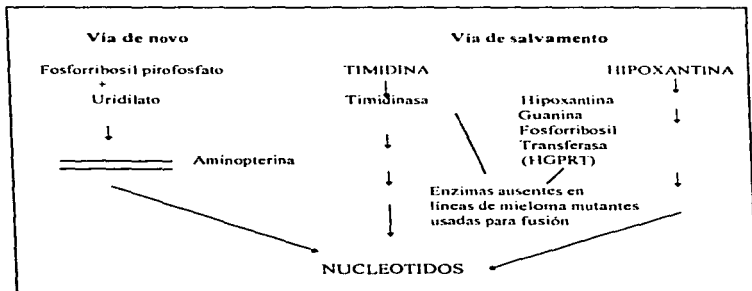


Figura 3. Vía de síntesis de purinas (Abbas, 1995).

5.1.1. Producción de anticuerpos monoclonales *in vivo*

In vivo, los hibridomas productores de MAbs se inyectan en la cavidad intraperitoneal, de ratones o ratas los cuales son previamente tratados con pristano (ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico) o adyuvante incompleto de Freund, que actúa como irritante originando que los macrófagos y monocitos sean reclutados dentro de la cavidad peritoneal. Los nutrientes secretados por estas células proveen un buen ambiente para el crecimiento de hibridomas en suspensión (Manson, 1992) Después de 1 a 3 semanas se inyectan los hibridomas los cuales empezarán a crecer rápidamente. Los MAbs son secretados en el líquido de ascitis. Este método tiene como ventaja, que los MAbs producidos *in vivo* son más concentrados (1-15 mg/ml ascitis). Sin embargo el líquido de ascitis contiene muchos contaminantes, incluyendo otras proteínas, lípidos y debritos celulares. Las otras proteínas presentes son el mayor problema entre éstas se encuentran la albúmina, transferrina e inmunoglobulinas. Estos tres contaminantes plantean tres diferentes problemas de separación: albúmina, debido a su abundancia, transferrina, debido a la similitud de sus características de carga a muchos de los MAbs y las inmunoglobulinas presentes, debido a que presentan propiedades similares a los MAbs. Por otro lado también es la presencia de enzimas proteolíticas, las cuales pueden causar daños al producto final. Estas desventajas, combinadas con la consideración ética del uso de animales, ha conducido en los recientes años a una considerable disminución en el uso de esta metodología. (Harlow De. Lane 1988; Coligan, et al 1992; Handbook 1994).

5.1.2. Producción de anticuerpos monoclonales *in vitro*

In vitro, las células del hibridoma se cultivan en un medio de crecimiento artificial, los MAbs se secretan en el sobrenadante del cultivo celular. Comparados con los producidos en el líquido de ascitis, los MAbs producidos por cultivo celular son relativamente diluidos (0.01-0.5 mg/ml de sobrenadante). Los medios más comúnmente usados son DMEM (Medio Mínimo Esencial de Dulbecco) y RPMI 1640. Los MAbs producidos por cultivo celular están contaminados por otras proteínas presentes en el medio ya que la mayoría de células de mamíferos son cultivadas con suplementos de suero fetal ya sea de carnero, caballo o bovino, la cantidad de suero en el medio de crecimiento tiene un impacto principal sobre la concentración de varias proteínas (ej. tabla 2). Hay medios, que se encuentran libres de suero evitando así la presencia de algunas proteínas, sin embargo el medio libre de suero contiene normalmente suplementos de albúmina esencial y transferrina. Siendo entonces los contaminantes producidos por este método de producción de MAbs: albúmina y transferrina, que también se encuentran en el caso de cultivos suplementados con suero solo que en estos además se encuentra IgG bovina, de caballo o de carnero (según el suero fetal utilizado) que puede ser removida pasando el sobrenadante por una columna de proteína G-sepharosa. Algunos medios se suplementan con antibióticos, los más empleados son: penicilina, estreptomycinina o gentamicina (Handbook 1994; Coligan et al. 1992)

Proteína	PM x 10 ⁻³	pI	Conc. de suero de carnero		
			5%	1%	0.1%
Albúmina	69	4.9	2x10 ⁴	400	40
Transferrina	76	5.2, 5.5	150	30	3
α -lipoproteína	195		150	30	3
Haptoglobulina	100-400	4.1, 4.5	350	70	7
IgG bovina fetal	150	5.8-7.3	25	5	0.5
Conc. de prot. total			3.75x10 ⁴	750	75
MAB	150		20	20	20
MAB (% de prot. total)			0.5	2.5	2.5

Tabla 2. Concentración en $\mu\text{g/ml}$ de algunas proteínas en sobrenadante a varias cantidades de suplementos de suero (Handbook, 1994).

El cultivo de hibridomas es relativamente sencillo ya que igual que otras células linfoides, no se adhieren al plástico o vidrio y por tanto pueden transferirse con pipetas. Esto es importante debido a que, cuando la concentración de células llega a aproximadamente 10^6 células, hay que transferir los hibridomas a un medio fresco (pueden diluirse 1:10 ó 1:20 con medio fresco). Nunca deberán llegar a un número elevado de crecimiento ya que se incrementa la probabilidad de un cambio fenotípico originando muerte celular. Las células pueden contarse en cámara de Neubauer, aunque, con experiencia se puede conocer el tiempo correcto para pasarlas a medio fresco observando su apariencia y el color del medio. También la observación de éstas en un microscopio invertido, ya que nunca se debe permitir que las membranas plasmáticas lleguen a granularse, las células sanas tienen membranas lisas (Coligan et al, 1992; Harlow y Lane, 1988).

6. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Como guía para el proceso de la separación de los anticuerpos producidos hay que discutir dos principales factores: el uso deseado y la fuente de los MABs. El grado de pureza requerida se determina por el propósito para el cual son requeridos los MABs. Por ejemplo, si la actividad biológica de estos anticuerpos es necesaria como parte de algún sistema largo, podría solo ser necesario el liberar los MABs preparados de aquellos contaminantes, los cuales interfieren en el ensayo. Por otro lado si los anticuerpos son para uso médico en humanos, estos deben estar clínicamente puros, libres de toxinas, pirógenos y materia orgánica, en el caso que no sea necesaria extremada pureza, se podría requerir otro esquema de purificación. También puede darse el caso de que los anticuerpos se utilicen como reactivos y se almacenen por largos periodos, por lo que deben de liberarse de actividad proteolítica, o su inmunoreactividad se puede perder por lo que las técnicas que se emplean

para la purificación de los anticuerpos deseados son principalmente: precipitación salina, clarificación por centrifugación, diálisis y técnicas de cromatografía. La electroforesis puede ser usada durante el esquema de purificación para calcular la pureza de el MAh después de cada paso cromatográfico y al final del esquema de purificación checando de este modo el producto final (Handbook, 1994).

6.1. Precipitación con sulfato de amonio:

Las proteínas en solución forman enlaces con el agua quedando sus grupos iónicos y polares expuestos. Cuando altas concentraciones de sales como el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ son agregadas a una solución de proteínas, las moléculas de agua que solvatan a la molécula de anticuerpo son desplazadas por los iones sulfato y amonio, que además neutralizan los grupos cargados de la proteína, la cual llega a su punto isoeléctrico y precipita. Por otro lado las sales influyen en la solubilidad de las proteínas en función de su fuerza iónica, que constituye una medida tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas que existen entre los cationes y los aniones aportados por la sal. A medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir precipitando completamente de su solución (Handbook 1994, Leningher 1993).

Este es un procedimiento importante para la separación de mezclas de proteínas, ya que las diferentes proteínas varían en su respuesta frente a la concentración de sales, debido a que la solubilidad de las especies de proteínas difieren de acuerdo a su grado de hidrofobicidad, por lo que se puede precipitar selectivamente fracciones específicas de la proteína disuelta en la muestra. Los anticuerpos de ratones necesitan 45-50% de saturación. Debido a que otros componentes del suero no precipitan en este rango, 50% de saturación es un nivel conveniente para usarse en muchas aplicaciones. (Harlow y Lane, 1988, Handbook 1994).

Las proteínas precipitadas por sales retienen su actividad y conformación nativa, pueden disolverse de nuevo, normalmente sin experimentar desnaturalización en un amortiguador apropiado. La precipitación con sulfato de amonio es la más recomendada debido a que es altamente soluble en agua, lo que permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas, así como también mantiene la estabilidad para algunas proteínas en solución. La técnica da considerable enriquecimiento, removiendo arriba del 50% de el contenido de proteína así reduciendo la mayoría de los contaminantes de la muestra como es el reducir el contenido de lípidos de la muestra. Una desventaja de precipitar con sulfato se amonio es que los anticuerpos pueden no ser puros ya que podrían contaminarse con otras proteínas de peso molecular elevado; así como también proteínas que son atrapadas en una precipitación con gran floculación. Es por esto que esta técnica no es manejable como un solo paso de purificación, pero puede ser combinada con otros métodos si la pureza del anticuerpo es necesario ((Harlow y Lane, 1988; Lehninger, 1993; Handbook, 1994).

6.2. Cromatografía por afinidad, Fc-específica.

Este tipo de cromatografía ha sido una técnica tradicional para purificar anticuerpos monoclonales, en la cual la molécula a purificar se absorbe específica y reversiblemente a una substancia de unión complementaria (ligando) covalentemente pegada a una matriz que sirve como soporte, el residuo innecesario se elimina por lavados con una solución amortiguadora y el anticuerpo requerido se libera del absorbente al que está unido por afinidad, por disrupción de los enlaces antígeno-anticuerpo al modificar el pH (figura 4) (Handbook 1994; Roitt, 1995).

Esta técnica se basa en la capacidad que poseen las proteínas A y G de unirse no solo a anticuerpos de animales que han sido inmunizados con proteína A o proteína G, sino también de animales que nunca han sido expuestos a ese antígeno, esto debido a que hay una unión específica de la porción Fc de la IgG (Harlow y Lane, 1988; Coligan, 1992, Handbook 1994).

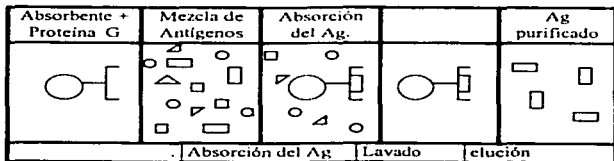


Figura 4. Cromatografía por afinidad Fc-específica.
(Roitt, 1994).

La proteína A y proteína G son encontradas en una fracción de la pared celular del *Staphylococcus aureus* y del streptococo del grupo G respectivamente. Muchos anticuerpos de especies o subclases que no se unen bien a la proteína A, se unen bien a proteína G, lo cual, va a depender de la fuente de obtención y también del tipo de inmunoglobulina que se trate. La tabla 3 resume la afinidad de Proteína G a varias fuentes de anticuerpos. (Coligan J., 1992; Handbook 1994).

Especies	Afinidad por proteína A	Afinidad por proteína G
Humano IgG	++++	++++
Cabra IgG	---	++
Caballo IgG	++	++++
Rata IgG ₁	---	+
Rata IgG _{2a}	---	++++
Rata IgG _{2b}	---	++
Rata IgG _{2c}	+	++
Ratón IgG ₁	+	++++
Ratón IgG _{2a}	++++	++++
Ratón IgG _{2b}	+++	+++
Ratón IgG ₁	++	+++

Tabla 3. Afinidad hacia proteína A / G por varios anticuerpos monoclonales (Coligan, 1992)

7. CITOMETRIA DE FLUJO.

La citometría de flujo es un método que permite medir características celulares tales como tamaño, volumen, pH, actividad enzimática, contenido de ADN a través del marcaje de partículas o células con fluorocromos (Rose et al, 1992)

Este método se caracteriza por la rapidez y el número de células que se pueden analizar así como también por su alto grado de confiabilidad y exactitud, se utiliza cada vez más en medicina y biología, destacando las pruebas inmunológicas (Rose et al, 1992). Una medición que puede hacer la citometría de flujo es la evaluación de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T por medio de sus marcadores de superficie (CD3, CD4, CD8) utilizando anticuerpos (mono y policlonales) u otras proteínas marcadas con sustancias llamadas fluorocromos que son capaces de absorber luz de una determinada longitud de onda y emitir luz de mayor longitud de onda (Ruiz, 1992 ; Fingold y Baron, 1989). Para seleccionar a los linfocitos con los marcadores de superficie CD3 (para linfocitos totales), CD4 para linfocitos cooperadores y CD8 para los linfocitos citotóxicos. Se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra dichos marcadores (Giorg 1992).

Los citómetros de flujo son instrumentos capaces de analizar las propiedades de células individuales que pasan, a gran velocidad por un orificio y por un medidor de la dispersión de luz, también analizan el volumen y la fluorescencia. Con ayuda de este equipo puede estudiarse en una sola suspensión de células varios marcadores de forma simultánea a una velocidad de casi 5.000 células por segundo (Stites et al, 1991). Las poblaciones celulares se separan, de acuerdo a su forma, tamaño y granulaciones o bien por medio de marcadores

fluorescentes (Giorg, 1992). Se evalúan estos parámetros en un sistema de fluido en el cual las partículas o células fluyen y se interceptan por un rayo luminoso y se detectan la fluorescencia que emiten (Rose et al. 1992).

Combinando las mediciones de dispersión de la luz, con la técnica de anticuerpos monoclonales, marcados con fluoresceína es fácil identificar las subpoblaciones celulares (Stites et al, 1991).

El fenómeno de la fluorescencia ocurre cuando un compuesto absorbe luz de una determinada longitud de onda, los electrones pasan de un estado basal a un estado excitado regresando después a su estado basal, emitiendo luz a una mayor longitud de onda. La luz emitida siempre es de más baja energía y por tanto de mayor longitud de onda que la luz de excitación. Estas dos longitudes de onda pueden ser captadas y separadas por filtros ópticos. Sus mediciones se basan en la luz como fuente de excitación por lo que se requiere de una iluminación intensa, la cual es dada por la lámpara de arco o laser, debido a que las células son pequeñas y pasan muy rápidamente a través del punto de detección. La fuente de luz debe ser capaz de emitir longitudes de onda específicas que puedan ser usadas para excitar a los marcadores fluorescentes. Cuando la muestra se inyecta en uno de los canales, pasa a la cámara de fluido en donde las partículas o células se transportan una por una a un punto específico en el espacio y son interceptadas por un rayo luminoso. La dispersión de la luz de la fluorescencia generada se captura por fotodetectores, los cuales convierten el fotón en señales electrónicas que se detectan y se procesan por computadora proporcionando resultados gráficos y análisis estadísticos (Rose, et al, 1992)

8. CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO.

Las células secretoras de moléculas de anticuerpos pueden identificarse mediante la técnica de Jerne, ya que pueden contarse por dilución en un medio en el cual el anticuerpo formado por cada célula individual produce un efecto rápidamente visible como son placas hemolíticas. Para esta técnica se utiliza como antígeno una proteína(s) del eritrocito la cual induce una respuesta timo dependiente, debido a que la producción de anticuerpos en respuesta a antígenos proteicos necesita de las células T CD4⁺ (ó células T cooperadoras), las cuales por medio de sus productos secretados estimulan la proliferación y diferenciación de las células B para la producción de anticuerpos (Roitt, 1994; Abbas, 1995).

En este procedimiento se mezclan células linfoides de un animal inmunizado con EC (eritrocitos de carnero) con una suspensión de agar fundido más EC está mezcla se vierte en un molde y se deja gelificar, se incuban para permitir que las células productoras de anticuerpo al liberar inmunoglobulinas, recubran a los EC circundantes. Si la inmunoglobulina liga con avides, la adición posterior del complemento producirá lisis de las células recubiertas por el anticuerpo específico. Como resultado de ello, se forman zonas

claras de lisis, llamadas placas, alrededor de cada célula formadora de anticuerpos. Estas células formadoras de anticuerpos se llaman también células formadoras de placas (CFP). Las placas directas de ésta manera revelan productores de IgM fundamentalmente, ya que este anticuerpo es muy hemolítico (Benacerraf, 1990; Roitt, 1994; Abbas, 1995).

Una de las limitaciones de la técnica de placas hemolíticas en gel es que no refleja verdaderamente el número total de células formadoras de anticuerpo ya que grandes placas pueden contener no solo una secretora de anticuerpos, por lo que el resultado obtenido no sería el valor real. Una de las modificaciones que puede realizarse para evitar estos inconvenientes es la reportada por Dresser en la cual la suspensión de células formadoras de anticuerpos se incuba sobre un portaobjetos, obteniéndose una capa muy delgada de EC en donde se evita la sobreposición de eritrocitos, además, que es posible realizar el recuento de placas por microscopio dando resultados confiables, (Dresser, 1986; Dresser, 1990 y Poduval, 1991).

III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El paludismo es una enfermedad infecciosa que por su morbilidad y mortalidad es considerada como una enfermedad parasitaria importante. La Organización Mundial de la Salud estima que hay de 300 a 500 millones de personas infectadas y se informan más de 3 millones de muertes al año principalmente en el Sur de África (Olliaro, 1996). La mortalidad en paludismo se ha observado principalmente en los casos de infección con *P. falciparum*. En nuestro país la mayor parte de los casos de paludismo son por infección con *P. vivax*, afortunadamente son muy escasos los casos de la enfermedad por *P. falciparum*. No se conocen casos de paludismo por *P. malarie* y *P. ovale* en México. Las principales zonas endémicas en el país son el Sureste (Oaxaca, Campeche, Chiapas) y la costa del Pacífico (Sinaloa y Nayarit) (Boletín de la Dirección General de Epidemiología). La respuesta inmune contra el parásito, *Plasmodium sp.*, es muy compleja. Los mecanismos celulares que generan la respuesta inmune protectora, no se conocen completamente, además el parásito evade la respuesta inmunológica por variación antigénica. Se ha establecido que para la adquisición y mantenimiento de inmunidad hay una gran dependencia de las células T, ya que juegan un papel muy importante en la cooperación para la síntesis de anticuerpos e intervienen en la inducción de una respuesta de tipo celular independiente de anticuerpos. Es evidente la importancia de la participación de las subpoblaciones celulares, T cooperadoras CD4+ y T citotóxicas CD8+ para la eliminación del parásito. No obstante se desconoce la participación de estas subpoblaciones celulares en la especificidad de la respuesta inmune contra *Plasmodium sp.*

Esta tesis forma parte de un proyecto de investigación que pretende utilizar un modelo murino experimental, para estudiar la participación de las células T CD4+ y T CD8+ en la especificidad de la respuesta inmune contra paludismo.

Para lo cual se utilizarán anticuerpos monoclonales que eliminen *in vivo* a estas subpoblaciones celulares en ratones normales y ratones inmunes a *Plasmodium chabaudi*, posteriormente, se retarán con el parásito homólogo (*P. chabaudi*), heterólogo (*P. yoeli*) y con mezclas de ambos parásitos, esto permitirá estudiar la especificidad de la respuesta inmune como consecuencia de esta eliminación. Es por ello que en esta tesis se produce, purifica y estandariza el manejo del anticuerpo monoclonal anti-CD4 para la eliminación *in vivo* de esta subpoblación celular. Así mismo se cuantifica la cantidad de anticuerpo obtenido y la dosis adecuada que se le administrará a los ratones normales e inmunes.

Una vez que ya se utilizaron los anticuerpos monoclonales en los ratones inmunes será necesario comprobar que, efectivamente, se eliminaron las células T CD4+ y T CD8+

por lo que se hará uso de fluorocitometría de flujo, y de la técnica de Jerne que utiliza un antígeno timodependiente como son los eritrocitos de carnero. Para que se formen anticuerpos contra ellos, se requiere de la cooperación de linfocitos T CD4+ con los linfocitos B, por lo que si se eliminó esta subpoblación celular no habrá producción de anticuerpos y por lo tanto el número de placas líticas deberá ser muy bajo o nulo.

Con este trabajo se establecerán las condiciones necesarias para el estudio de la participación de las subpoblaciones celulares CD4+ y CD8+ en paludismo, además será de utilidad para comprender los mecanismos de inmunidad celular que intervienen en la eliminación del parásito. Este tipo de estudios serán importantes para el posterior diseño de vacunas efectivas contra paludismo.

IV

OBJETIVOS

GENERALES:

- Purificar y calibrar el uso de anticuerpos monoclonales, anti-CD4⁺ en ratones inmunes a paludismo
- Verificar la eficiencia de la eliminación *in vivo* de las células T CD4⁺

PARTICULARES:

- Crecer *in vitro* a los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal anti-CD4.
- Purificación por afinidad del anticuerpo monoclonal empleando columnas de proteína G.
- Cuantificación de los anticuerpos monoclonales.
- Calibrar la técnica de citometría de flujo para cuantificar células T CD4⁺
- Eliminar la subpoblación celular T CD4⁺ en ratones normales y en ratones inmunes, utilizando los anticuerpos monoclonales antes descritos.
- Determinar si efectivamente se llevó acabo la eliminación de las células T CD4⁺ mediante técnicas de actividad biológica (Jeme), inmunofluorescencia directa y citometría de flujo.

V

HIPOTESIS

Si se administra el anticuerpo monoclonal anti-CD4 en ratones singénicos, este anticuerpo reconocerá al marcador de superficie para el cual fue formado y se establecerá una reacción antígeno-anticuerpo, entonces como consecuencia de esta interacción, se producirá la eliminación *in vivo* de la subpoblación celular de células CD4+. Para comprobar la efectividad de dicha eliminación se hará uso de técnicas de inmunofluorescencia directa, citometría de flujo, Jerne y Dresser.

VI

MATERIAL

Material biológico

- Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (YTS191.1) anti-CD4 (donación del Dr. Herman Waldman, Cambridge U.K.)
- Ratonés singénicos de la cepa BALB/c y (C57BL/6 X BALB/c)F₁, mantenidos bajo condiciones libres de patógenos.
- Eritrocitos de carnero (En solución de Alsever estéril).
- Suero de cobayos.
- IgG de ratas Wistar
- Anticuerpos anti-CD4-FITC (Gibco BRL).
- Anticuerpos anti-CD3-FITC (Gibco BRL).
- Anticuerpos anti-IgG de rata-FITC (Gibco BRL).

Equipo de laboratorio

- Cámara de electroforesis Bio-Rad, Protean-R II Xi-Cell
- Minicámara de electroforesis-V 8.10 Gibco BRL
- Cámara de Neubauer
- Autoclave modelo Steele, 21lbs.
- Baño de agua con controlador de temperatura, Precision
- Refrigerador, Phillips
- Congelador -25°C, Revco
- Balanza analítica Metler H80
- Balanza granataria Ohaus
- Centrífuga clínica Solbat, aparatos científicos 5000 RPM
- Bomba de vacío Feli Welch, Modelo 1410
- Bomba peristáltica, Masterflex G/L.
- Potenciómetro PBL-Sargent Welch, Scientific Company
- Vortex-Genie™, Scientific Industries
- Microcentrífuga Eppendorf
- Horno de Microondas Panasonic
- Computadora Hewlett Packard
- Impresora láser Hewlett Packard
- Citómetro de flujo Becton & Dickson FACSort
- Espectrofotómetro
- Parrillas de agitación, Corning

- Equipo de disección
- Campana de flujo laminar, Veco
- Incubadora CO₂, Lab-line instruments
- Micropipetas, Eppendorf
- Columnas para cromatografía de afinidad, Sigma.
- Microscopio invertido.

Material de laboratorio

- Cajas petri de 10 cm de diámetro
- Jeringas de insulina
- Mechero Fischer
- Pipetas Pasteur
- Bulbos para pipetas Pasteur
- Probetas
- Embudos de separación
- Espátulas
- Matraces aforados
- Perillas de seguridad
- Papel pH
- Barras magnéticas
- Soporte universal
- Pinzas para bureta
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Pipetas graduadas
- Pipetas volumétricas
- Matraz Erlenmeyer
- Botellas para cultivo celular
- Vasos de precipitado
- Matraz volumétricos
- Tubos Eppendorf

Reactivos

- Agarosa, Sigma
- Azida de sodio, Baker
- Bicarbonato de sodio, Baker
- Tris (Tris [hidroximetil] amino-metano) Sigma
- EDTA, (ác. Etilendiamintetracético), S Sigma
- Glicina, Sigma
- Acido clorhídrico, Baker
- Acido acético, Baker
- Etanol, MERCK
- Acrilamida, Sigma
- N,N-Methylen-bisacrilamida, Sigma
- Dodecil sulfato de sodio, Sigma
- Persulfato de amonio, Sigma
- Glicerol, Sigma
- β-Mercaptoetanol, Sigma
- Azul de bromofenol, Sigma
- Hidroxido de sodio, Baker
- Sulfato de amonio, Life Science
- Fosfato de potasio monobásico, Baker
- Fosfato de sodio dibásico, Técnica Química S.A.
- Lauril sulfato de sodio, Sigma
- Cloruro de potasio, Técnica Química
- Dextrosa, Baker
- Citrato de sodio dihidratado, Baker
- Acido cítrico monohidratado, Técnica Química

VII

MÉTODOS

PRODUCCION DE MAb Anti-CD4 EN MEDIO DE CULTIVO (*in vitro*).

1. Se cultivó el hibridoma YTS191.1 en botellas de 250ml de cultivo celular estériles, con medio RPMI 1640, suplementado con SF13 al 5% y antibiótico.
2. Se permitió que las células se propagaran, por lo que se incubaron en una atmósfera húmeda, a 37°C y 5% de CO₂.
3. Las células se analizaron con ayuda de un microscopio invertido cada 2 o 3 días para ver su viabilidad y se revisó que no estuvieran contaminadas.
4. Cuando se alcanzó una concentración entre $1-2 \times 10^6$ células/ml, se separaron las células a una nueva botella de cultivo con medio RPMI 1640, dilución 1:10. Se incubaron nuevamente en una atmósfera húmeda, a 37°C y 5% de CO₂.
5. Los pasos 1, 2, 3 y 4 se realizaron de forma continua hasta que se obtuvo la cantidad de anticuerpo anti-CD4 necesario.
6. Se transfirió el contenido de las botellas de cultivo con crecimiento celular a tubos cónicos estériles.
7. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Se colectó el sobrenadante y descartó el botón.
8. El sobrenadante se guardó bajo condiciones estériles a -20°C, hasta la purificación del MAb.

PRODUCCION DE LIQUIDO DE ASCITIS CONTENIENDO MAb ANTI-CD4

1. A ratones BALB/c entre 6 y 8 semanas de edad, se les inyectó intraperitonealmente 0.5 ml de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano).
2. Dos semanas después se les administró intramuscularmente 30 mg de hidrocortisona.
3. A las 48 horas se irradió a cada ratón con 450 rads.
4. El contenido de las botellas donde se cultivó *in vitro* el hibridoma YTS191.1, a tubos falcón para centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante.
5. Las células se lavaron dos veces, resuspendiéndolas en PBS estéril. Se centrifugaron a 1500 RPM por 5 minutos y descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 5 ml de PBS estéril.
6. Se contaron las células y se determinó su viabilidad por exclusión con azul de tripano.
7. Se ajustó a una concentración de células de 2.5×10^6 células/ml con PBS, para inyectar 2 ml de ésta suspensión a los ratones intraperitonealmente.

8. Se esperó de 1 a 2 semanas para la formación de líquido de ascitis.
9. Para recolectar el líquido de ascitis, se inmovilizó al ratón con una mano, extendiendo un poco la parte abdominal, con la otra mano se insertó una aguja de 20-G en la cavidad abdominal, para que el líquido de ascitis drenara, colectándolo en un tubo falcón estéril.
10. Algunas veces el mismo ratón produjo nuevamente líquido de ascitis por lo que se colectó nuevamente, como en el paso anterior. La recolección fue hasta que ya no se acumuló más líquido o hasta que el ratón murió.

PREPARACION DE MEMBRANAS PARA DIALISIS

1. Se cortaron piezas de membranas para diálisis de tamaño conveniente y se colocaron en una solución caliente de bicarbonato de sodio 2% (p/v) y EDTA 1mM pH 8.0, por 10 minutos.
2. Posteriormente se enjuagaron en agua destilada.
3. Los tubos de diálisis se colocaron en una solución caliente de 1mM EDTA pH=8.0 por 10 minutos.
4. Se permitió que la solución se enfriara, junto con los tubos para diálisis, para después guardarlos a 4° C asegurándose que el tubo esté bien sumergido.

PURIFICACION DE γ -GLOBULINA POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.

1. Se descongeló el sobrenadante o líquido de ascitis, se clarificó por centrifugación a 5000 rpm 15 minutos. Se descartó el botón formado.
2. Se determinó el volumen del sobrenadante o líquido de ascitis.
3. El sobrenadante o líquido de ascitis centrifugado se vertió en un matraz Erlen-meyer sobre un baño de hielo para adicionar lentamente, con agitación lenta y constante la solución SAS, hasta que se alcanzó una concentración final de saturación del 50%.
4. Se dejó en agitación lenta durante 4 horas en el cuarto frío (4°C).
5. Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos.
6. El sobrenadante se recuperó en cada precipitación para que posteriormente se volviera a tratar con solución SAS.
7. Por otro lado el precipitado (botón obtenido en la centrifugación) se disolvió en PBS pH 7.2 (ver anexo) y dializó contra PBS 1X en frío manteniendo la agitación, durante 3 a 5 días, haciendo dos cambios PBS 1X, para eliminar completamente el sulfato de amonio.
8. Después de completada la diálisis, se centrifugó la muestra a 5000 rpm durante 15 minutos para eliminar cualquier precipitado que se haya formado.
9. La muestra se conservó en refrigeración si se pasaba en menos de 72 horas por la columna de afinidad, si era por más de 72 horas se congelaba la muestra.

10. La técnica de precipitación de gamma globulina con solución SAS, se llevó a cabo en forma cíclica con el sobrenadante recuperado en el paso 6. Hasta que ya no había precipitación.

PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD UTILIZANDO COMO MATRIZ PROTEINA G-SEFAROSA

Esta técnica se realizó a 4°C. (cuarto frío)

1. La Proteína G-sefarosa se empacó en una columna de cromatografía para líquidos, teniendo el cuidado de no dejar burbujas.
2. Se lavo la columna, con PBS pH 7.2 pasando 10 veces el volumen ocupado por la proteína G utilizando PBS.
3. Ya lista la columna se pasó por ella, a una velocidad de 20 ml/min el sobrenadante o líquido de ascitis (previamente tratado con SAS, dializado y filtrado) Y se recolectó el fluido para que pasara nuevamente por la columna cuantas veces fuera necesario. Ya que pasó todo el sobrenadante se dejó lavando la columna con PBS para eliminar todos los contaminantes presentes en la muestra a purificar.
4. Después una solución de glicina/HCl pH 2.4 se pasó por la columna con el fin de eluir de la columna el anticuerpo adherido a la proteína G. En este paso las fracciones fueron recolectadas en tubos Eppendoff de 1.5 ml los cuales contenían entre 50 y 200 μ l de una solución de tris 2M pH 8.3, para ajustar a un pH neutro el anticuerpo eluido en 1ml de glicina/HCl, de tal forma que no se desnaturalizara el anticuerpo debido a las condiciones ácidas del medio, por tal motivo la elución se realizó lo más rápido posible. Terminando la elución se dejó lavando la columna con PBS.
5. La concentración de proteínas se determinó en la solución de cada tubo Eppendoff por espectrofotometría, a una longitud de onda (λ) de 280nm, con un blanco de PBS. Se juntaron todas las fracciones para dializarlas contra PBS a 4°C con agitación constante. Se hicieron cinco cambios (uno en la mañana y otro en la noche) para eliminar completamente las sales.
6. El sobrenadante o líquido de ascitis recuperado en el paso 5 se pasó nuevamente, por la columna en forma cíclica, hasta que ya no se obtenían lecturas de proteínas en las fracciones de cada elución obtenidas en el paso 7.

CONCENTRACIÓN DEL MAb ANTI-CD4.

1. Una vez completada la diálisis de la técnica de purificación con proteína G, se sacó la muestra y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos para eliminar cualquier precipitado que se hubiera formado.
2. Se concentró la solución del MAb anti-CD4, con el equipo Speed-Vac, hasta que quedaba un volumen de 5 a 10 ml de solución de MAb en total.

- De ese concentrado se prepararon alícuotas de 1 ml en tubos Eppendoff, etiquetados adecuadamente y se determinaba su concentración de proteínas por espectrofotometría a 280nm utilizando como blanco PBS.
- Por último se congelaron las alícuotas y mantuvieron a -20°C.
- Cuando se tuvieron varios eluidos, se descongelaron y vertieron en un solo tubo falcón estéril, con el fin de hacer un pool de todo el MAb obtenido y purificado.
- El pool obtenido se mezcló muy suavemente y se prepararon alícuotas de 1 ml en tubos Eppendoff.
- Se determinó la concentración de proteínas por espectrofotometría a 280nm con un blanco de PBS.
- Se realizó un ensayo para determinar funcionalidad de los anticuerpos que se obtuvieron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

ELECTROFORESIS

Armazón para preparar el gel .

Se empalmaron, con ayuda de dos pinzas sujetadoras, dos vidrios: uno de 8.2 x 10.2 cm y otro de 7.2 x 10.2 cm, colocando entre ellos dos barras espaciadoras de 1mm de grosor (una de cada lado).

Los vidrios empalmados se colocaron sobre un soporte de vidrio para sellar la parte inferior con agarosa al 2%. De tal forma que no se presentaran fugas al agregar el gel.

Preparación del gel de corrimiento:

- Para preparar el gel de corrimiento de poliacrilamida en un matraz Erlen-meyer, de 50 ml se adicionaron las siguientes soluciones:

•Agua destilada	3.25 ml
•Acrilamida 40%	2.40 ml
•Bisacrilamida 2%	1.65 ml
•Tris pH=8.8 [1.5M]	2.50 ml
•SDS 10%	0.10 ml
- Se mezclaron suavemente, evitando la formación de burbujas ya que el aire evita la polimerización del gel. Por último se adicionó al mismo matraz 4µl TEMED y 100µl de APS 10%.
- Esta mezcla se vació en el armazón a un nivel aproximado de 3 cm del borde y se agregó agua cuidadosamente por los extremos, aproximadamente 1 ml, para que formara una capa, cuya interfase se observó cuando el gel polimerizó.
- Después se desalojó es agua.

Preparación del gel empacador

1. Para la preparación del gel empacador, en un matraz erlen-meyer, de 50 ml se adicionaron las siguientes soluciones:

• Agua destilada	6.46 ml
• Acrilamida 40%	1.23 ml
• Bisacrilamida 2%	0.85 ml
• Tris pH=6.8 [1.0M]	1.25 ml
• SDS 10%	0.10 ml
2. Se mezcló suavemente, evitando la formación de burbujas. Por último se adicionaron 10 µl de TEMED y 100 µl de APS 10%.
3. Se llenó el armazón hasta el tope, con la solución del gel empacador y se insertó el peine para que se formaran los pozos en donde posteriormente se colocarían las muestras. Se dejó reposar el gel hasta que polimerizara .

Preparación de la muestra:

1. Se combinaron partes iguales de la muestra de proteína y de la solución reguladora de tratamiento 2X (anexo) en tubos Eppendorf.
2. Los tubos se colocaron en un baño hirviendo por tres minutos, antes de colocar las muestras en los pozos del gel.

Marcado y corrimiento electroforético del gel.

1. El peine se retiró suavemente de los geles, cuidando de no destruir los pozos y se lavaron los pozos con una jeringa, primero con agua destilada y por último con solución reguladora.
2. Se colocó el armazón dentro de la cámara de electroforesis, para colocar las muestras en los pozos del gel.
3. Una vez colocadas las muestras se llenó con solución amortiguadora de corrimiento (anexo) el compartimento superior e inferior de la cámara de electroforesis.
4. La fuente de poder se conectó para correr la electroforesis a 80 Volts en un principio, Al iniciar el corrimiento en el segundo gel se aumentó el voltaje a 150 Volts.
5. Se suspendió el suministro de corriente cuando el colorante, se encontraba aproximadamente 1 cm del límite del gel.

Tinción y decoloración del gel.

1. La tinción de los geles fue con azul de Coomassie, dejando en agitación lenta durante 1 hora.
2. El gel se sacó y transfirió a una solución decolorante (anexo), realizando los cambios necesarios, para lograr una buena decoloración, y observar bien las bandas.

DETERMINACION DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO

Técnica de Jerne

1. Al ratón seleccionado para la técnica de Jerne se le inyectó intraperitonealmente 0.2 ml de una solución de eritrocitos de carnero (EC) al 10% en solución salina, 5 días después se sacrificó por dislocación cervical.
2. Se extrajo el bazo y se maceró sobre una malla fina con un tubo de ensaye enjuagando con medio MEM 1X para obtener una suspensión de células de la cual se hizo una dilución 1:30 con medio MEM 1X.
3. Se mezcló 0.1 ml de la suspensión de células de bazo (dilución 1:30), 0.2 ml de un suspensión de EC al 10% en solución salina, y 2 ml de agarosa al 0.6% en MEM (que se mantuvo a 45°C para que no solidificara o se formaran grumos).
4. Se homogenizó la suspensión usando un vortex y se vació rápidamente en un caja Petri pequeña distribuyéndola por toda la caja con movimientos rotatorios. Lo anterior se realizó lo mas rapido posible con el fin de evitar la formación de grumos al solidificarse el medio.
5. Las placas se incubaron a 37°C durante 45 minutos.
6. A cada caja se agregó 2ml de complemento de cobayo diluido 1:10 en MEM 1X. Se distribuyo por toda la superficie de la placa y se incubaron 37°C por 30 minutos.
7. Después de incubar las cajas se contaron las placas hemoliticas que aparecieron en cada caja para hacer el cálculo de celulas formadoras de placa por bazo.

Modificación de Dresser a la técnica de Jerne.

1. Al ratón seleccionado para esta técnica se le inyectó intraperitonealmente 0.2 ml de una solución de eritrocitos de carnero (EC) al 10% en solución salina, 5 días después se sacrificó por dislocación cervical.
2. Se extrajo el bazo sin restos de grasa y pelos de ratón.
3. En una caja de Petri pequeña se maceró el bazo sobre una malla fina con un tubo de ensaye, se enjuagó con medio MEM 1X.
4. De la suspensión de células obtenida se hizo una dilución 1:30 con medio MEM 1X.
5. Se prepararon unos portaobjetos, sumergiendo y sacando rápidamente cada porta objetos, en una solución de agarosa al 0.5% a una temperatura de 80-100%.
6. En un tubo se colocaron 0.8 g de agarosa en 9 ml de agua destilada, para disolver completamente el agarosa el tubo se metió al autoclave y se llevo a 12 libras, después se colocó el tubo en un baño maria a 45°C. Se adició al tubo de agarosa 1 ml de medio MEM 10X, y se ajustó el pH con una solución de bicarbonato de sodio.
7. Al mismo tiempo, los portaobjetos tratados y pipetas Pasteur se mantuvieron sobre una placa tibia (aproximadamente 30°C).
8. En un tubo de ensaye se mezclaron 20 µl de la suspensión de células linfoides, 20 µl de una suspensión de EC al 7% en solución salina y 200 µl de agarosa al 0.8% en MEM a 45°C, se homogeneizó la suspensión usando un vortex.

9. La suspensión se transfirió rápidamente a la superficie tibia de un portaobjetos tratados (paso 6), usando una pipeta Pasteur, así mismo se extendió sobre el portaobjetos usando la parte delgada de la pipeta.
10. Sobre la superficie tibia se dejó de 10 a 15 segundos, después se transfirieron a una plataforma fría (10°C) por 10 segundos.
11. Se incubaron las preparaciones por 2 horas a 37°C en un ambiente húmedo, conteniendo 3-4% de CO₂.
12. A cada placa se agregó 2 ml de complemento (suero de cobayo) diluido 1:10 en MEM 1X y se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo, conteniendo 3-4% de CO₂ por 30 minutos.
13. Para fijar las preparaciones se colocaron en una solución de glutaraldehído al 0.15% en una solución de NaCl 0.15M por 3 minutos, y se lavaron con agua destilada
14. Se contaron las placas hemolíticas que aparecieron en cada portaobjetos y se hizo el cálculo de células formadoras de placa por bazo.

OBTENCION DE SUERO DE COBAYO.

1. Cada cobayo fue anestesiado con éter, para después colocarlo en posición decúbito ventral.
2. Se hizo una incisión en la región axilar.
3. Se colectó la mayor cantidad de sangre, en tubos de ensaye con ayuda de pipetas Pasteur,
4. La sangre colectada se incubó a 37°C por 15 minutos, después en hielo por 30 minutos para que la retracción del coágulo fuera más rápido. Así mismo se separó el coágulo de las paredes del tubo de ensaye con un aplicador de madera.
5. Se centrifugaron los tubos a 2500 RPM durante 20 minutos y se separó el suero y se prepararon alícuotas de 1ml en tubos Eppendorf, etiquetados adecuadamente. Se guardaron a -70°C.

OBTENCIÓN DE IgG DE RATA.

1. Cada rata fue anestesiada con éter. Después se colocó a la rata en posición decúbito ventral. Para hacer una incisión en la región axilar
2. Se colectó la mayor cantidad de sangre en tubos de ensaye, con ayuda de pipetas Pasteur
3. Los tubos con la sangre de rata se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos para que se formara el coágulo, el cual se separó de las paredes del tubo con un aplicador de madera.
4. Se centrifugó 2500 RPM durante 20 minutos y se separó el suero de todos los tubos con una pipeta Pasteur, colectándolos en uno solo, formando así un pool de suero de rata.
5. Se precipitó con solución SAS (ver anexo) la IgG presente en el suero obtenido. (Técnica de precipitación con sulfato de amonio al 50%).

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA Y CITOMETRIA DE FLUJO (FACS)

Para cada ensayo se preparaban los tubos de la siguiente manera.

TUBO	MAb-fluoresceinado	PBS-1% Albúmina-Na ₂ N
blanco-muestra*	--	20 µl
muestra* - CD ₄	3 µl *	17 µl
muestra* - CD ₃	2 µl *	18 µl

*Cantidad recomendada por el fabricante de cada anticuerpo que se quiera determinar
▲ Las muestras que se manejaban son sangre, bazo, timo y ganglios. Para cada tipo de muestra se preparaba un tubo para blanco otro para determinar la subpoblación celular CD3⁺ y un tercero para CD4⁺

A los ratones utilizados para el ensayo de inmunofluorescencia directa, se les extrajo sangre de la zona retro-orbital con ayuda de una pipeta Pasteur impregnada con un poco de heparina. Por cada tubo se utilizaron 100 µl. Después se sacrificaron los ratones por dislocación cerebral y se extrajo el bazo, timo y ganglios, teniendo el cuidado de que al extraer cada uno de ellos se colocaran en una cajita de Petri con PBS mientras se extraían los demás órganos.

Aparte, en otra cajita Petri se maceraba por separado, cada uno de los órganos obtenidos sobre una malla fina con un tubo de ensayo, enjuagando con PBS para obtener una suspensión de células. De cada órgano se obtuvo 10⁶ células y se colocaron en los tubos ya preparados y etiquetados, de acuerdo a la muestra. Se agitaron y dejaron incubarse a 4°C durante 30 minutos. Después se adicionó a cada tubo 1ml de solución de lisis de eritrocitos se agitaron y dejaron incubarse durante 12 minutos. Por último se realizaron dos lavados con PBS 1X-Albúmina 1%-NaN₃, centrifugando a 2000 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y resuspendió el botón obtenido en PBS para analizar las muestras por citometría de flujo.

TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. Y CITOMETRIA DE FLUJO (FACS)

Se sacrificó al ratón por dislocación cerebral para extraer el bazo, timo y ganglios, teniendo el cuidado de que, al extraer cada uno de se colocara en una cajita de petri con un poco de PBS mientras se extraían los demás órganos. En otra cajita Petri se maceraron, por separado, cada uno de los órganos obtenidos sobre una malla fina con un tubo de ensayo, enjuagando con PBS, para obtener una suspensión de células de la cual se tomaron 50 µl que se colocaron en tubos etiquetados de acuerdo a la muestra y que previamente se les adicionó 10 µl del MAb anti-CD4 purificado más 10 µl de PBS-1% albúmina-Na₂N₃. Se agitaron y dejaron incubarse a 4°C durante 30 minutos.

Después de la incubación se hicieron dos lavados con 3ml de PBS-1% albúmina-Na₂N, centrifugando a 2500 RPM por 5 minutos, el sobrenadante de los tubos se decantó y el botón celular obtenido se resuspendió. A cada tubo (menos al blanco) se adicionó, 10 µl de anticuerpo anti-IgG de rata-FITC (Gibco BRL). Se agitaron y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados con PBS 1X-Albúmina 1%-Na₂N, centrifugando a 2500 RPM por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en PBS para ser analizado por citometría de flujo

ELIMINACIÓN DE LA SUBPOBLACION CELULAR CD4'.

Primer protocolo de eliminación.

Se utilizaron 10 ratones singénicos de la cepa (C57-B^{1/2} x BALB/c)F₁, los cuales se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos. Se marcaron 5 de ellos como ratones testigo y 5 como ratones tratados con el anticuerpo monoclonal YTS 191.1 purificado anti-CD4, a los cuales se les inyectó intraperitonealmente 300 µg de IgG de rata y 300 µg de MAb anti-CD4 respectivamente. Las dosis fueron aplicadas diariamente durante los primeros 7 días del ensayo, después solo los días 10, 13, 19 y 22.

Se determinó el porcentaje de la población de las células CD4⁺ mediante la técnica inmunofluorescencia directa y citometría de flujo en los ratones tratados con IgG de rata y en los ratones tratados con MAb anti-CD4, en muestras de sangre periférica los días 5, 8, 14, 20 y 26. Y en ganglios linfáticos, timo y bazo los días 20 y 26 de iniciado el tratamiento. Por otro lado se seleccionaron dos ratones testigos y dos ratones tratados con el MAb anti-CD4 para inmunizarlos el día 22 (con respecto al protocolo de eliminación celular) y sacrificarlos el día 26 para realizar la técnica de Jerne.

Segundo protocolo de eliminación.

Se utilizaron 8 ratones singénicos F₁, 4 de ellos se etiquetaron como ratones tratados con el anticuerpo monoclonal YTS 191.1 y los otros 4 se marcaron como ratones control tratados con IgG de rata. La misma dosis que se administraba a los ratones tratados con el anticuerpo YTS 191.1, a los ratones control se les inyectaba IgG de rata. El primer día de iniciado el protocolo se les inyectó intraperitonealmente 500 µg. En los siguientes días de tratamiento la dosis fue de 300µg/por día. Del día 1 al 5 la administración fue diaria, después la aplicación se realizó solo los días 7, 9 y 11 de iniciado el protocolo.

Se determinó el porcentaje de la población de las células CD4⁺ mediante la técnica de inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (FACS) en los ratones control y en los

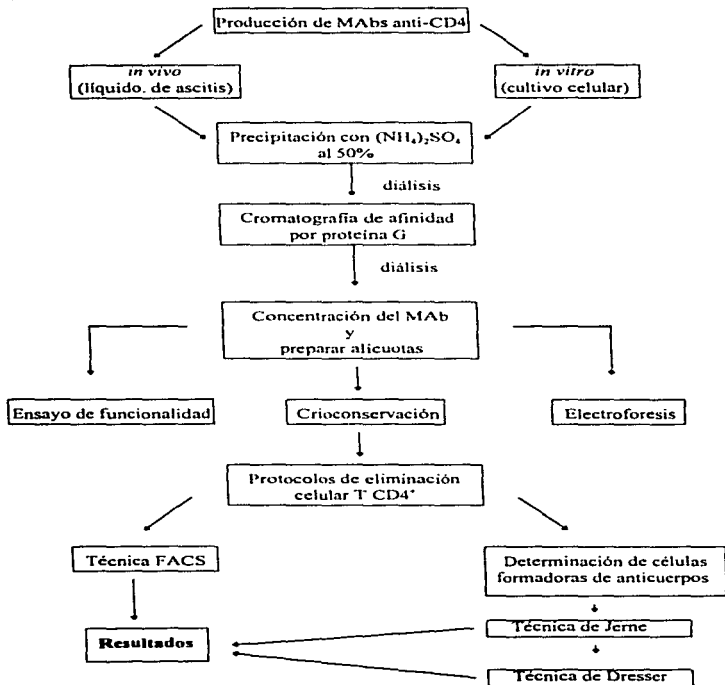
ratones tratados con MAb anti-CD4. Únicamente en ganglios linfáticos los días cero, 4, 6, 9 y 12. (con respecto al protocolo de eliminación celular). A los ratones que se les determinó el porcentaje de células CD3+ y CD4+ los días 6, 9 y 12 también se les realizó Jerne y Dresser.

Tercer protocolo de eliminación.

Se utilizaron 8 ratones singénicos F1, 4 de ellos se etiquetaron como ratones tratados con el anticuerpo monoclonal YTS 191.1 y los otros 4 se marcaron como ratones control tratados con IgG de rata, a los cuales se les administró intraperitonealmente 500µg de MAb purificado y 500 µg de IgG de rata respectivamente. En los tres primeros días la administración fue diaria después solo los días 5,7, 9 y 11 de iniciado el tratamiento

Se determinó el porcentaje de la población de las células CD4+ mediante la técnica de inmunofluorescencia directa y citometría de flujo en los ratones testigo y en los ratones tratados con MAb anti-CD4, en muestras de sangre periférica, bazo, ganglios linfáticos y timo los días 3, 6, 9 y 12. A los ratones que se les determinó el porcentaje de células CD3+ y CD4+ los días 6, 9 y 12 también se les realizó Jerne y Dresser.

DISEÑO EXPERIMENTAL

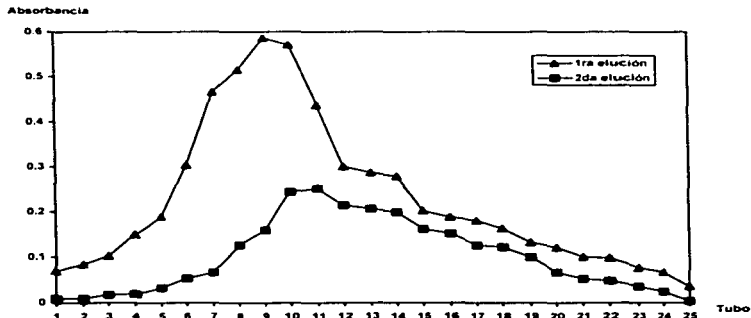


VIII

RESULTADOS

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI CD4+ (YTS 191.1) OBTENIDO.

La producción del MAb anti-CD4 se realizó por cultivo del hibridoma YTS 191.1 en medio RPMI 1640 e Hibrimax en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C como se indica en la metodología. Las células se propagaron tanto *in vitro* como *in vivo* para obtener líquido de ascitis. El sobrenadante del cultivo celular y el líquido de ascitis se precipitaron con sulfato de amonio al 50% seguido de cromatografía de afinidad utilizando como matriz proteína G-sefaroza. Se determinó la concentración del MAB a las fracciones obtenidas utilizando espectrofotometría a 280 nm. El factor de conversión utilizado fue: 1 Unidad de absorbancia es equivalente a 1.44 mg/ml de MAB (Coligan, 1992). En la gráfica 1 se ilustran lecturas de absorbancia de las fracciones obtenidas en dos eluciones después de pasar por la columna de proteína G-sefaroza. En la primera elución se observa un pico mayor que en la segunda.



Gráfica 1. Lecturas de absorbancia de fracciones obtenidas en dos eluciones al pasar el MAB por la columna de proteína G. Se considera que 1 Absorbancia es a 1.44 mg/ml (Coligan 1992).

La pureza del MAb obtenido se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras, en la figura 5 se ilustra un gel en el cual se observa una banda a 50 kDa que corresponde a las cadenas pesadas de la inmunoglobulina y otra banda a 23 kDa que corresponde a las cadenas ligeras. En cuanto a su funcionalidad se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo para verificar que dicho anticuerpo no ha perdido la capacidad de unirse a la molécula CD4 (gráfica 2).

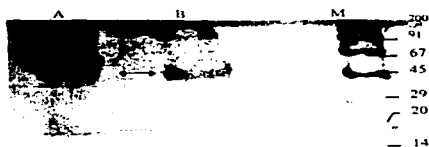
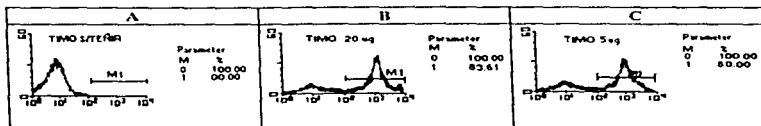


Figura 5. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras. En la línea M el marcador de peso molecular, en la línea A y B el MAb purificado que corresponde a un lote A y un lote B respectivamente. Se observan el corrimiento de las cadenas pesadas (—) y el de las cadenas ligeras (.....).



Gráfica 2. Histogramas de la población CD4+ de timo marcados con MAb YTS 191.1 20 µg (B) y 5 µg (C). En A la población sin marcar. En las ordenadas el número de células y en las abscisas Intensidad de Fluorescencia. M1 representa la población que expresa CD4.

ELIMINACION DE LA SUBPOBLACION CELULAR CD4+ "in vivo".

I. Porcentaje de células T CD3+ y T CD4+ en ratones F1 normales.

La disminución de la población celular CD3+ y CD4+ por el tratamiento *in vivo* con el MAB YTS 191.1 o con IgG de rata se determinó en tres ratones F1 normales, los porcentajes de células T CD3+ y T CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios (tabla 4), mediante Inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (FACS)

	Sangre (%)	Hazo (%)	Ganglios (%)	Timo (%)
CD3+	59	45	57	32
CD4+	35	33	44	89

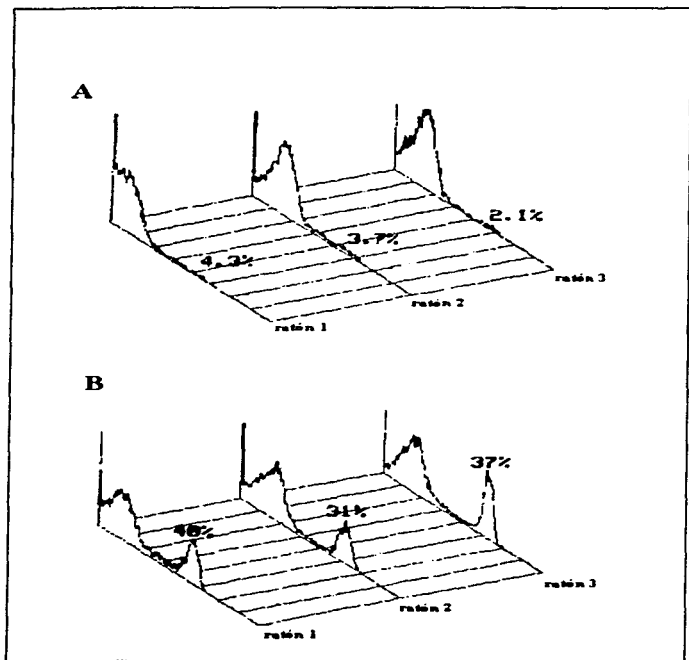
Tabla 4. Porcentaje de células CD3+ y CD4+ en ratones F1 normales. Determinado por la técnica de Citometría de flujo. El porcentaje mostrado, son el valor promedio de tres ratones

II. Eliminación de la población celular CD4+ de sangre periférica, en ratones F1 tratados con el MAb YTS191.1. 1er. protocolo.

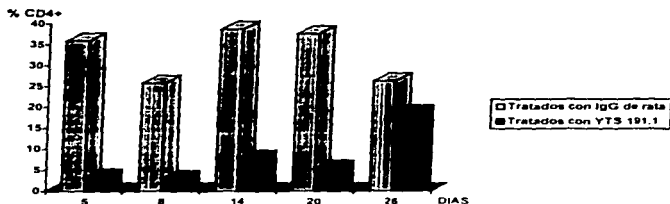
Para poder evaluar la participación de las células CD4+ en una respuesta inmune secundaria a paludismo, se realizó una cinética de eliminación utilizando el anticuerpo monoclonal YTS 191.1 dirigido contra la molécula CD4. La evaluación de la eliminación se realizó mediante citometría de flujo a los 5, 8, 14, 20 y 26 días de iniciado el tratamiento. Los resultados muestran una eliminación del 90% de dicha subpoblación celular en sangre periférica durante el día 5 (gráfica 3A) porcentaje que se mantuvo durante la mayor parte de la cinética, aunque al final del tratamiento se observa una recuperación (gráfica 3). Simultáneamente se realizó la cinética en un grupo control de ratones utilizando como anticuerpo IgG de rata. La población celular CD4 no sufrió alteración significativa (gráfica 3B).

III. Eliminación de la población celular CD4+ en órganos linfoides primarios y secundarios en ratones F1 tratados con el MAb YTS191.1. 1er protocolo

A pesar de que se obtuvo una importante eliminación de la subpoblación celular T CD4+ en sangre periférica en los ratones tratados con el MAb YTS 191.1, es importante evaluar dicha población en órganos linfoides secundarios tales como bazo y ganglios linfáticos, sitios donde se concentra una gran cantidad de estas células. La subpoblación celular T CD4+ se determinó por citometría de flujo en los días 20 y 26 de iniciado el protocolo de eliminación los resultados muestran que el grupo de ratones tratados con el MAb YTS 191.1 sufrió una disminución de la subpoblación celular T CD4+ del 57-60% en bazo y del 36-49% en ganglios con respecto del grupo tratado con IgG de rata (Gráfica 5). Dado que los órganos linfoides primarios son los productores de los linfocitos T, también se analizó el efecto del tratamiento con el MAb YTS 191.1 en el timo, donde no se observó ninguna alteración de la subpoblación celular CD4+. Debido a que las células T CD4+ expresan la molécula CD3+, en el mismo experimento se determinó el porcentaje de células con dicho receptor en sangre periférica y en los órganos ya mencionados, tanto en los ratones tratados con IgG de rata como en los tratados con YTS 191.1. No se observa disminución significativa de dicha población como se muestra en la tabla 4 y gráfica 6.



Gráfica 3. Histograma de la población celular CD4+ en sangre periférica, determinada por citometría de flujo el día cinco del tratamiento. A, ratones tratados con MAb YTS 191.1. B, ratones tratados con IgG de rata. En las ordenadas el número de células y en las abscisas Intensidad de Fluorescencia.

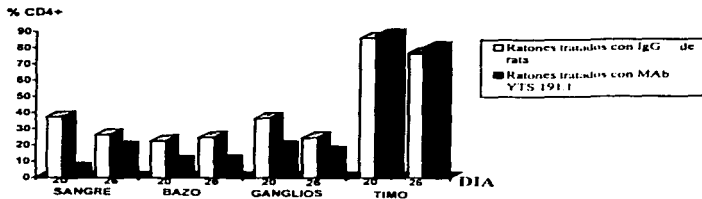


Gráfica 4. Porcentaje de células CD4+ en ratones tratados con MAbs YTS191 y ratones tratados con IgG de rata. La determinación se realizó mediante citometría de flujo en los días del tratamiento indicados.

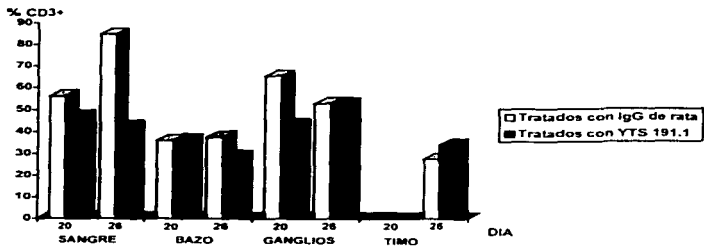
RESUMEN DE RESULTADOS DEL PRIMER PROTOCOLO

	DIA	CELULAS	TRATADOS CON IgG DE RATA (%)	TRATADOS CON MAb YTS 191.1 (%)	DISMINUCIÓN RESPECTO DEL CONTROL (%)
SANGRE	5	CD4+	35.9	3.36	90.6
	8	CD4+	25.77	2.43	90.5
	14	CD3+	61.5	18.1	18.0
		CD4+	38.57	7.73	80.0
	20	CD3+	56.1	46.9	16.4
		CD4+	37.45	5.4	85.6
26	CD3+	84.85	42.25	50.2	
	CD4+	26.2	18.45	29.6	
BAZO	20	CD3+	36.1	16.0	0.2
		CD4+	22.6	9.7	57.1
	26	CD3+	17.5	28.7	23.5
GANGLIOS	20	CD4+	24.8	10.1	59.3
		CD3+	65.3	43.3	33.7
	26	CD4+	36.5	18.9	48.2
		CD3+	53.1	53.0	0.2
		CD4+	24.6	15.7	36.2
TIMO	20	CD3+	ND	ND	----
		CD4+	86.1	88.2	0.0
	26	CD3+	34.2	27.7	19.0
CD4+		80.4	76.7	0.5	

Tabla 5. Poblaciones celulares CD3+ y CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios de ratones control (tratados con IgG de rata) y ratones tratados con el MAb anti-CD4 (YTS 191.1), evaluados por citometría de flujo en los días indicados en el 1er. protocolo de eliminación celular. El porcentaje de eliminación de la población celular en los ratones tratados con el MAb con respecto de su control se muestra en la última columna. ND, no determinado.



Gráfica 5. Porcentaje de células CD4⁺ en órganos linfoides primarios, secundarios y sangre periférica en ratones tratados con MAbs YTS-191.1 y ratones tratados con IgG de rata. La determinación se realizó mediante citometría de flujo en los días 20 y 26 del tratamiento.



Gráfica 6. Porcentaje de células CD3⁺ en órganos linfoides primarios, secundarios y sangre periférica en ratones tratados con MAbs YTS-192 y ratones testigo tratados con IgG de rata. La determinación se realizó mediante citometría de flujo en los días 20 y 26 del tratamiento. La determinación de células CD3⁺ del día 20 en el timo no se realizó.

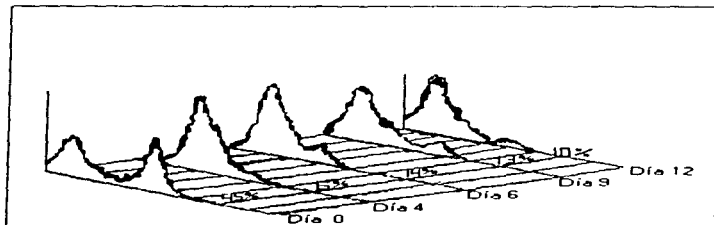
OPTIMIZACIÓN DEL ESQUEMA DE ELIMINACION.

V. Eliminación de la población celular CD4+ en ganglios linfáticos utilizando un segundo protocolo de eliminación.

A pesar de haber logrado una buena eliminación de la población celular CD4+ en sangre periférica, en órganos secundarios no se obtuvieron buenos resultados. Por tal razón se realizó un segundo protocolo de eliminación, en el cual a partir de la segunda semana de tratamiento, la aplicación del MAb se realizó cada tercer día a diferencia del primer protocolo en el que se aplicó la dosis cada cuatro días. Además de que se acordó a tres días. También se realizó la cinética en un grupo control de ratones utilizando como anticuerpo IgG de rata los cuales no sufren diferencias significativas de un día a otro (tabla 6). En cuanto a la eliminación de células CD4+, mejoró ya que en ganglios linfáticos se logró una eliminación del 67-85 % (gráfica 7)

	DIA	CELULAS	TRATADOS CON IgG DE RATA (%)	TRATADOS CON MAb YTS 191.1 (%)	DISMINUCIÓN RESPECTO DEL CONTROL (%)
GANGLIOS	4	CD3+	59.29	38.86	34.45
		CD4+	41.34	6.48	84.32
	6	CD3+	54.10	34.67	35.91
		CD4+	44.08	14.44	67.24
	9	CD3+	74.65	46.84	37.25
		CD4+	44.97	13.13	70.80
	12	CD3+	51.41	32.82	36.16
		CD4+	37.80	10.23	71.16

Tabla 6. Poblaciones celulares CD3+ y CD4+ en ganglios de ratones control (tratados con IgG de rata) y ratones tratados con el MAb anti-CD4 (YTS 191.1), evaluados por citometría de flujo en los días que se indican en el 2do protocolo para la eliminación celular. El porcentaje de eliminación de la población celular en los ratones tratados con el MAb con respecto de su control se muestra en la última columna.



Gráfica 7. Cinética de la eliminación de la población CD4+ en ganglios linfáticos de ratones tratados con MAb YTS 191.1 en un segundo protocolo de eliminación. Las células se marcaron con anti-CD4 conjugado a fluorescencia, el primer pico representa las células sin marcar y el segundo la población celular CD4+.

VI. Eliminación de la población celular CD4+ de sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios en ratones tratados con el MAb YTS191.1. 3er. protocolo.

Debido a que se logró una buena eliminación de la población celular CD4+ en ganglios linfáticos utilizando el segundo protocolo de eliminación se realizó un tercer protocolo en donde la dosis fue de 500 µg, durante los primeros días la inoculación fue diaria, después solo cada tercer día hasta cumplir los doce días del protocolo. La evaluación de la eliminación se realizó en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios mediante citometría de flujo en los días 3, 6, 9 y 12 de iniciado el tratamiento. En los resultados (gráfica 8) se observa que se alcanzó una buena eliminación de la población de células CD4+, excepto en timo. También se realizó la cinética en un grupo control de ratones utilizando como anticuerpo IgG de rata, en donde la población celular no sufrió alteración significativa. En el mismo experimento se determinó el porcentaje de células CD3+, en sangre periférica y en los órganos ya mencionados, tanto en los ratones tratados con IgG de rata como en los tratados con YTS191.1. Tabla



Gráfica 8. Porcentaje de células CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios de ratones F1 control (tratados con IgG de rata) y ratones tratados con el MAb anti-CD4 (YTS 191.1), evaluados por citometría de flujo en los días que se indican en el 3er protocolo de eliminación celular.

Simultáneamente se trató a ratones F1 no inmunes a paludismo de acuerdo al tercer protocolo. El día 12 se les determinó el porcentaje de linfocitos T CD3+ y CD4+ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios, (tabla 8). En la gráfica 9 se encuentran los porcentajes de la población celular CD4+ en el día 12 del protocolo de los ratones inmunes tratados con el YTS 191.1 y de ratones no inmunes a paludismo que siguieron el mismo tratamiento no observándose diferencia significativa.

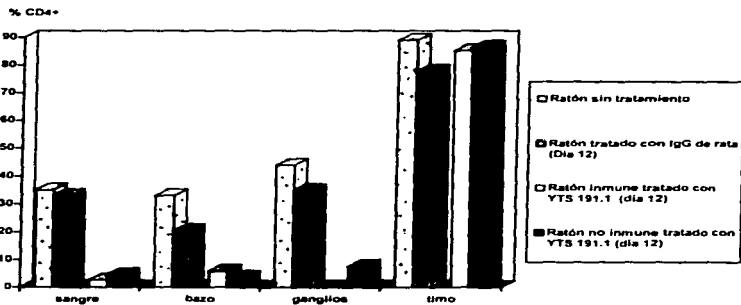
RESUMEN DE RESULTADOS DEL TERCER PROTOCOLO

	DIA	CELULAS	TRATADOS CON IgG DE RATA (%)	TRATADOS CON Mab YTS 191.1 (%)	DISMINUCION RESPECTO DEL CONTROL (%)
SANGRE	3	CD3+	53.85	33.63	17
		CD4+	33.57	2.20	93
	6	CD3+	50.35	ND	
		CD4+	34.11	4.72	86
	9	CD3+	54.82	32.17	41
		CD4+	31.29	2.95	91
12	CD3+	63.03	41.36	34	
	CD4+	32.99	2.69	92	
BAZO	3	CD3+	42.55	23.04	46
		CD4+	25.67	6.93	73
	6	CD3+	36.74	21.74	41
		CD4+	24.41	6.27	74
	9	CD3+	49.98	15.36	69
		CD4+	25.83	3.75	85
12	CD3+	32.25	19.06	41	
	CD4+	20.42	5.81	71	
GANGLIOS	3	CD3+	54.50	46.17	15
		CD4+	28.83	13.85	52
	6	CD3+	67.18	47.56	29
		CD4+	51.61	10.72	79
	9	CD3+	66.66	34.56	52
		CD4+	32.83	4.98	85
12	CD3+	60.17	44.51	26	
	CD4+	34.85	ND		
TIMO	3	CD3+	28.66	48.52	--
		CD4+	91.44	96.92	--
	6	CD3+	27.31	23.15	--
		CD4+	83.42	ND	--
	9	CD3+	18.26	20.00	--
		CD4+	91.09	73.38	19
12	CD3+	21.46	19.58	9	
	CD4+	77.65	85.17	--	

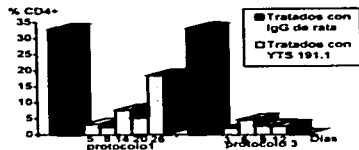
Tabla 8. Poblaciones celulares CD3⁺ y CD4⁺ en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios de ratones control (tratados con IgG de rata) y ratones tratados con el MAb anti-CD4 (YTS 191.1), evaluados por citometría de flujo en los días del protocolo 3 de eliminación celular que se indican. El porcentaje de eliminación de la población celular en los ratones tratados con el MAb con respecto de su control se muestra en la última columna. ND, no determinado

	Sangre (%)	Bazo (%)	Ganglios (%)	Timo (%)
CD3+	37.48	15.12	30.92	47.05
CD4+	4.41	3.53	7.48	86.39

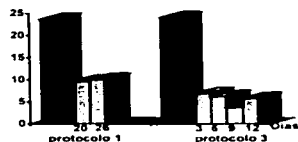
Tabla 7. Porcentaje de linfocitos T CD3⁺ y T CD4⁺ en ratones no inmunes tratados con MAb anti-CD4 (YTS191.1) el día 12 de tratamiento del tercer protocolo. La determinación se realizó por inmunofluorescencia directa y FACS.



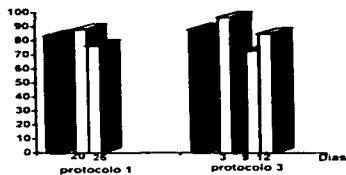
Gráfica 9. Porcentajes de células T CD4⁺ de ratones sin tratamiento y del día 12 de tratamiento del tercer protocolo tanto de ratones tratados con IgG de rata como de ratones inmunes y no inmunes a paludismo tratados con YTS 191.1.

A**Sangre**

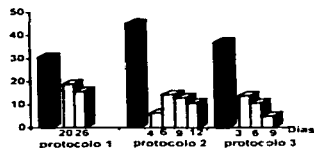
Comparación entre el protocolo 1 y protocolo 3 de la población celular CD4+ en sangre periférica de ratones tratados con YTS191.1

B**Bazo**

Comparación entre el protocolo 1 y protocolo 3 de la población celular CD4+ en bazo, de ratones tratados con YTS191.1

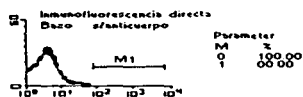
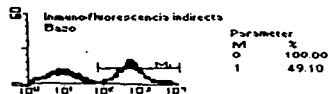
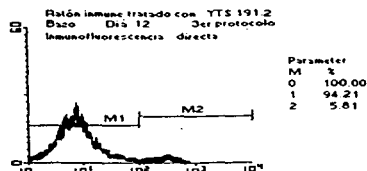
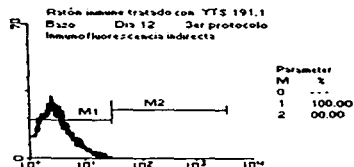
C**Timo**

Comparación entre el primer y tercer protocolo de la población celular CD4+ en timo, de ratones tratados con YTS191.1

D**Ganglios**

Comparación entre el protocolo 1, 2 y 3 de la población celular CD4+ en ganglios, de ratones tratados con YTS191.1

Gráfica 10. Comparación de la eliminación de la población CD4+ entre los protocolos realizados. La determinación se llevó a cabo por Citometría de Flujo. El porcentaje de los ratones tratados con IgG de rata es el valor promedio de los obtenidos durante la cinética del protocolo correspondiente.

A**B****C****D**

Gráfica 11. Comparación de la determinación de la población celular CD4⁺ por Imunofluorescencia directa e indirecta. Población sin marcar (A), población de CD4⁺ de ratón sin tratamiento marcado con YTS 191.1 por Imunofluorescencia indirecta (B), población de CD4⁺ de ratón el día 12 de tratamiento con MAb YTS 191.1 marcados con conjugado GIBCO por Imunofluorescencia directa (C) y con MAb YTS 191.1 (D).

Disminución de la cooperación celular T-B por la eliminación de la población celular CD4⁺.

Para verificar la eficiencia de los protocolos de eliminación celular de la población CD4⁺, se realizaron las técnicas de Jerne y la variación diseñada por Dresser en donde se evaluó la cantidad de células que forman anticuerpos para un antígeno timodependiente (eritrocitos de certero) como una prueba funcional de la cooperación de los linfocitos T CD4⁺ con los B para la formación de anticuerpos. Los resultados obtenidos por la técnica de Jerne (tabla 9), indican que en el primer protocolo de eliminación, los ratones tratados con el MAb YTS 191.1 manifiestan una disminución del 72 % en el número de células productoras de anticuerpos en comparación con los ratones tratados con IgG de rata. Con el segundo protocolo de eliminación

se logró disminuir la cooperación celular T-B hasta un 93% y en el tercer protocolo hasta un 96%. En los resultados obtenidos por la técnica de Dresser (tabla 10, fig. 6), los porcentajes de disminución, en la cooperación, son muy similares que los obtenidos por la Técnica de Jerne.

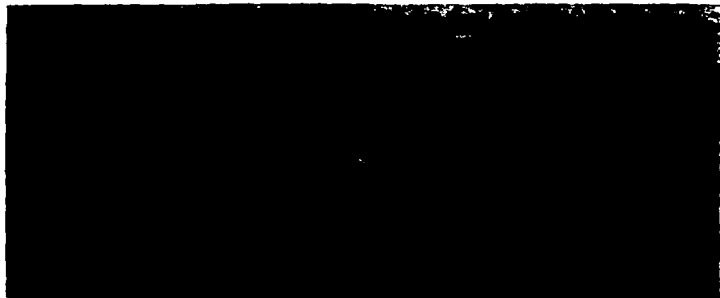
Protocolo	Día	Ratones tratados con:	No. de células productoras de anticuerpo por bazo	Disminución de la cooperación (%)
Primero	26	IgG de rata	36,150	
		YTS 191.1	10,100	72
Segundo	6	IgG de rata	27,323	
		YTS 191.1	2,550	91
	9	IgG de rata	28,125	
		YTS 191.1	2,100	93
	12	IgG de rata	30,375	
		YTS 191.1	4,275	86
Tercer	6	IgG de rata	25,875	
		YTS 191.1	1,875	93
	9	IgG de rata	28,125	
		YTS 191.1	1,200	96
	12	IgG de rata	23,625	
		YTS 191.1	1,275	95

Tabla 9. Células formadoras de anticuerpos determinadas por la técnica de Jerne en ratones tratados con IgG de rata y en ratones tratados con el MAb YTS191.1. Los valores mostrados en el cuadro son el promedio de los resultados obtenidos, debido a que en cada ensayo se realizaron preparaciones por duplicado.

Protocolo	Día	Ratones tratados con:	No. de células productoras de anticuerpo por bazo	Disminución de la cooperación (%)
Segundo	6	IgG de rata	22,500	
		YTS 191.1	750	97
	9	IgG de rata	16,875	
		YTS 191.1	750	96
	12	IgG de rata	10,875	
		YTS 191.1	1,875	83
Tercer	6	IgG de rata	14,250	
		YTS 191.1	500	96
	9	IgG de rata	14,250	
		YTS 191.1	750	95
	12	IgG de rata	10,500	
		YTS 191.1	562	95

Tabla 10. Células formadoras de anticuerpos determinadas por la técnica de Dresser en ratones tratados con IgG de rata y en ratones tratados con el MAb YTS 191.1. Los valores mostrados en el cuadro son el promedio de los resultados obtenidos, debido a que en cada ensayo se trabajaron dos ratones por grupo.

A



B



Figura 6. Células formadoras de anticuerpo (CFA) por la técnica de Dresser. En A se observa la CFA en el centro de la placa lítica. En B no se muestran CFA ya que es un control negativo

IX

DISCUSION DE RESULTADOS

Se ha demostrado que las células T CD4+ tienen un papel muy importante en el establecimiento de una respuesta inmune protectora contra paludismo, sin embargo, los mecanismos moleculares implicados no se han elucidado aún. En el presente trabajo se llevó a cabo la producción y purificación del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 (YTS 191.1) dirigido contra la molécula CD4 de ratón así como también cinéticas de eliminación *in vivo* de células CD4+ en ratones F1 con dicho anticuerpo. El esquema de eliminación de los linfocitos T CD4 permite tener ratones con niveles muy bajos de esas células, para utilizarse en experimentos que permitan conocer la posible participación de dicha subpoblación celular durante una respuesta inmune secundaria a paludismo.

Debido a que las células que producen el MAb anti-CD4 son un híbrido rata-ratón, para poder lograr producir el líquido de ascitis en los ratones BA1.B/c, se requirió someter a los roedores a inmunosupresión utilizando hidrocortisona e irradiando con rayos gamma (450 rads). El MAb también se produjo en el sobrenadante de medio de cultivo a 37°C; en atmósfera al 5% de CO₂ y 5% de SFB. En la purificación se consideraron dos técnicas; la primera fue precipitar los anticuerpos del líquido biológico añadiendo una concentración de sulfato de amonio del 50% de saturación eliminando así gran cantidad de lípidos y proteínas que no son de nuestro interés, sin embargo en el precipitado también se encuentran proteínas de peso molecular elevado por lo que se utilizó una segunda técnica de purificación. La cromatografía por afinidad Fc-específica, empleando una columna de proteína G, en la cual el MAb anti-CD4 queda unido a la proteína G y la albúmina y otras proteínas se eliminan en los lavados. Se obtuvo el anticuerpo deseado mediante la ruptura de los enlaces antígeno-anticuerpo al pasar por la columna una solución ácida que modificó el pH, en cada elución se recuperaron las fracciones que contenían el anticuerpo. A las fracciones obtenidas se les determinó la cantidad de proteína presente (gráfica 1). Cabe señalar que el líquido biológico en donde se encuentra el MAb anti-CD4 se pasó más de tres veces por la columna para obtener la mayor cantidad de anticuerpo, por lo que las fracciones obtenidas muestran lecturas de absorbancia menores en cada elución, es decir en cada elución va disminuyendo la cantidad de proteína en el líquido biológico. Para evaluar la pureza del MAb purificado, se realizó electroforesis de acrilamida en condiciones reductoras (figura 5) después de cada paso y al final del esquema de purificación revisando de este modo el producto final.

Se verificó la funcionalidad del anticuerpo purificado por la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la cual se puso en contacto, a células de un órgano linfóide, como timo y el MAb anti-CD4 purificado, como no perdió su funcionalidad se unió a las células T CD4+ presentes, de otra forma se hubiera eliminado en los lavados., para detectar la unión antígeno-anticuerpo se adicionó un anticuerpo anti-IgG de rata fluoresceinado el cual se unió al MAb purificado

por lo que al leer en el citómetro de flujo se detectó una población celular marcada con fluoresceína (gráfico 2, región M1) que representa la población celular que expresa la molécula CD4 presente en ese órgano linfoide.

Al tener una cantidad adecuada de anticuerpo se procedió a la eliminación de la subpoblación celular T CD4+ en ratones F1 inmunes a paludismo. La eliminación de la población celular CD4+ en ratones F1 tratados con el MAb anti-CD4, de acuerdo al primer protocolo, resultó casi completa de las células CD4+ en sangre periférica prácticamente durante todo el tratamiento (gráfica 4). Esta eliminación fue específica dado que no se observó tal eliminación en los ratones tratados con IgG de rata y los valores poblacionales obtenidos en tales ratones no se alejan de los valores obtenidos en ratones normales (tabla 4). En el día 26 del tratamiento con el MAb de acuerdo al 1er. protocolo, el porcentaje de células CD4+ obtenido en sangre periférica, presentó una elevación considerable respecto a las determinaciones previas, dicha observación pudiera explicarse considerando que la administración de MAb YTS 191.1 a los ratones fue diaria en la primera semana y en las dos últimas, la inoculación del anticuerpo se distribuyó por cuatro días, lo que probablemente provocó la posible disminución en la concentración del YTS 191.1 en el ratón lo que quizá permitió la recuperación de la subpoblación celular CD4+.

Con respecto a los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios) la eliminación de las células CD4+ fue menor a la observada en sangre periférica (gráfica 5), posiblemente la compartimentación de dichos órganos evita una mayor eliminación de las células CD4+ o bien que se requiera mayores concentraciones del MAb YTS 191.1. Por otra parte, en el timo no se logró la eliminación de las células CD4+, como lo indica la similitud de los porcentajes de células CD4+ tanto en los ratones tratados con YTS191.1 como en los tratados con IgG de rata. El timo como órgano linfoide primario, es el sitio donde maduran los linfocitos y por lo tanto es generador de millones de ellos, de tal manera que si se presenta la eliminación de células CD4+ mediada por la acción del YTS191.1, posiblemente un aumento en la producción de los mismos pudiera compensar dicho efecto. También se observó una disminución en el porcentaje de células CD3+ de sangre periférica en ratones tratados con YTS191.1 con respecto a los valores observados en los ratones testigos (gráfica 6). Este resultado se esperaba, dado que existen células que presentan también el marcador CD4+ al eliminar a las células CD4+ se disminuye el número total de células CD3+.

Se utilizó un segundo protocolo de eliminación, en el cual se manejaron algunas modificaciones con respecto al primero, una de ellas es que en la primera semana y en la siguiente se aplicaron dosis de anticuerpo de 300µg, cada tercer día, a diferencia del esquema inicial en el cual se aplicaba cada cuarto día. Otra diferencia es que se disminuyeron los días de tratamiento, ya que en el primer protocolo duró 26 días, tiempo en que un ratón normal tarda en reponerse a la infección provocada por el parásito *Plasmodium chabaudi*. En este segundo protocolo se estimaron 12 días de tratamiento esto debido a que el tiempo de crisis de la parasitemia con *Plasmodium sp.* se encuentra entre los días 9 y 12, en los que interesa tener eliminada a la subpoblación celular CD4+ para el estudio de la participación de esta subpoblación en paludismo optimizando de esta forma el uso de MAb purificado. En este protocolo se pretende ver si hay una mayor eliminación al emplear una dosis mayor, en

órganos secundarios por lo que se realizó únicamente en ganglios linfáticos quienes nos darían una idea de como se encuentra la eliminación en sangre periférica y demás órganos. Para realizar un tercer protocolo en el que se mantendría la misma dosis y se confirmarían los datos obtenidos por ganglios o se aumentaría la dosis para obtener una eliminación mayor. Así mismo se ahorraría una cantidad considerable de anticuerpo anti-CD3 anti-CD4 fluoresceinado ya que se disminuye el número de lecturas.

Los resultados obtenidos en ganglios linfáticos indican que inicialmente se obtuvo una mayor eficiencia de eliminación de la población celular (gráfica 7) en comparación al primer protocolo. De igual forma que en el 1er protocolo se observó una disminución en la subpoblación celular CD3+ en sangre periférica de ratones tratados con YTS191.1 que con los ratones tratados con IgG de rata (tabla 6). Este resultado era de esperarse debido a que la eliminación de las células CD4+ que también poseen el marcador CD3 trae como consecuencia la disminución del porcentaje de células CD3+.

De acuerdo a los resultados obtenidos se planteó un tercer protocolo en el cual se aumentó la dosis de anticuerpo anti-CD4 a los ratones y se siguió la cinética de eliminación en sangre periférica, y órganos linfoides primarios y secundarios, se obtuvieron porcentajes mayores de eliminación de células CD4+ con respecto al primer protocolo (gráfica 10), en cuanto a títmo se observa que igual que en el primer protocolo no hay una disminución significativa (gráfica 8). Por otro lado en ganglios se encontró que con el protocolo 3 se obtiene una eliminación mayor a partir del día 6 que en los protocolos anteriores (figura 9D), como se puede ver la eliminación tiende a aumentar ligeramente o al menos mantenerse constante entre los días 9 y el 12, que son los días en que se requiere la eliminación de esta subpoblación celular.

Durante este mismo protocolo se realizó un ensayo en el cual se indicaría si el anticuerpo producido y purificado era capaz de aumentar más el porcentaje de eliminación de las células CD4+, de tal forma que el día 12 de tratamiento con el anticuerpo se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (gráfica 11D), en donde no se obtuvo mayor intensidad en la fluorescencia, lo cual indica que el 5.81% de células CD4+ que permanecen en bazo (gráfica 11C) ya no son reconocidas por el MAb anti-CD4 YTS 191.1, por lo que no hay unión antígeno-anticuerpo y en los lavados es eliminado el MAb YTS 191.1, de la misma forma el anticuerpo anti-IgG de rata fluoresceinado no tiene a quien dirigirse y también es eliminado en los lavados, por lo que el citómetro de flujo no detecta alguna población fluoresceinada. De forma general este ensayo nos indica que, si se aumentara la dosis de MAb anti-CD4 YTS 191.1 a los ratones F1 inmunes a paludismo, el anticuerpo ya no sería capaz de eliminar más células CD4+.

Por otro lado se realizaron las técnicas de Jerne y Dresser para evaluar la cooperación de las células T con las B en la producción de anticuerpos. En ambas técnicas se utilizan eritrocitos de camero como antígeno los cuales inducen una respuesta títmo dependiente, en donde se requiere que las células T CD4+ cooperen en la estimulación, proliferación y diferenciación de las células B para la producción de anticuerpos, por lo que si el MAb YTS 191.1 es capaz de eliminar a la población de células T CD4+, se reducirá la cooperación con las células B en la formación de anticuerpos. Utilizando la técnica de Jerne en el primer protocolo de eliminación,

se logró disminuir esta cooperación hasta un 72% (tabla 9). Utilizando un segundo protocolo de eliminación, la disminución de la cooperación T-B fue del 93% y en el tercer protocolo fue entre el 95 y 96%. En cuanto a la técnica de Dresser que maneja el fundamento de Jerne, tiene como ventajas de que se obtiene una sola capa de EC y células formadoras de anticuerpos en donde se evita la sobreposición de eritrocitos y se pueden mantener las preparaciones de manera permanente, los resultados obtenidos por esta técnica (tabla 10) no se alejan significativamente de los obtenidos por la técnica de Jerne

La determinación del porcentaje de linfocitos CD4+ en los ratones tratados con YTS191.1 y los testigos, en los diversos órganos y en los días de tratamiento indicados, fue posible gracias a que el anticuerpo monoclonal anti CD4 de ratón conjugado a fluoresceína comercial tiene diferente sitio de reconocimiento de la molécula CD4 que el MAb YTS191.1 utilizado para la eliminación *in vivo* de las células CD4+ de los ratones F1.

X

CONCLUSIONES

- La determinación por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos CD4+ en los ratones tratados con YTS191.1 y en los ratones control, en los diversos órganos durante los días indicados, fue posible gracias a que el anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón conjugado a fluoresceína comercial, tiene diferente sitio de reconocimiento de la molécula CD4 que el MAb YTS191.1 utilizado para la eliminación *in vivo* de las células CD4+ de los ratones F₁.
- El MAb YTS191.1 purificado por precipitación con sulfato de amonio y por cromatografía de afinidad al ser administrado repetidamente e intraperitonealmente, de acuerdo al protocolo 3, es capaz de eliminar casi completamente la población CD4+ en sangre periférica y órganos linfoides secundarios de ratones (C57BL/6 x BALB/c)F₁ inmunes a paludismo.
- El esquema de administración del MAb YTS191.1, utilizado para la eliminación de linfocitos T CD4+. En particular el protocolo 3 permite tener ratones carentes de esas células, para utilizarse en experimentos donde se estudie la participación de los linfocitos T CD4+ en la infección producida por *Plasmodium* en ratones inmunes. Esto nos permitirá poder estudiar la especificidad de la respuesta inmune a *Plasmodium* en ratones inmunes carentes de células T CD4+.
- La misma metodología de producción y purificación se podrá aplicar al hibridoma YTS 169 que reconoce a la subpoblación celular de linfocitos T CD8+, para producir y tratar a animales inmunes a *Plasmodium* con el fin de estudiar su participación en el mantenimiento y especificidad de la respuesta inmune.
- Las técnicas de Jerne y Dresser permitieron evaluar la disminución en la cooperación de las células T con las células B, para la formación de Anticuerpos en los ratones inmunes tratados con el anticuerpo monoclonal anti-CD4. Lo anterior es una prueba funcional de la eficacia del tratamiento *in vivo* con el anticuerpo YTS 191.1.

XI

PREPARACION DE SOLUCIONES.

Solución de Alsever:

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| • Dextrosa | 20.50 g |
| • Citrato de sodio dihidratado | 8.00 g |
| • Acido cítrico monohidratado | 0.55 g |
| • Cloruro de sodio | 4.20 g |
| • Agua destilada | 1000.0 ml |

Se utiliza como medio para mantener la sangre de carnero.

Esta solución tiene un pH final de 6.1. Esterilizar en autoclave a 10lb por 15 minutos. La sangre de carnero se recibe en esta solución en proporción 1:1 y se deja durante una semana en el refrigerador antes de usarse para que se estabilicen las células, además que no deberá de usarse pasadas cuatro semanas de su recolección.

Solución Salina de Fosfatos (PBS 0.15M).

- | | |
|--|--------|
| • Cloruro de sodio | 8.00 g |
| • Cloruro de potasio | 0.20 g |
| • Fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{Anh}$) | 1.15 g |
| • Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) | 0.07 g |

Se disuelven en 1000 ml de agua destilada ajustando a pH 7.2.

Solución Salina (0.85%).

Es una solución salina isotónica. Pesar 8.5g de Cloruro de sodio y disolver en un litro de agua destilada.

Suspensión de Eritrocitos de carnero (EC).

- Centrifugar a 2500 RPM la suspensión de EC (conservados en solución de Alsever) durante 5 minutos.
- Lavar 2 o 3 veces el botón celular obtenido con solución salina fisiológica.
- Ajustar volumen a volumen en solución salina fisiológica a la concentración deseada.

Medio Mínimo Escencial (MEM).

Disolver 0.96g del medio en 100 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 con bicarbonato de sodio hasta lograr un color salmón.

Esterilizar por filtración en membrana millipore.

Solución saturada de sulfato de amonio (SAS).

- Sulfato de amonio 761 g
- Agua destilada 1000 ml

Disolver en la parrilla de agitación poco a poco. Almacenar en un frasco tapado y a temperatura ambiente.

Amortiguador de lisis.

Disolver en 800 ml de agua desionizada los siguientes componentes:

- Cloruro de amonio (NH_4Cl) 8.29 g
- Bicarbonato de potasio (KHCO_3) 1.00 g
- Na_2EDTA 37.20 mg

Ajustar el pH a 7.2-7.4 con HCl 1N y aforar con agua a 1000 ml.

PBS- NaN_3

- Azida de sodio (NaN_3) 1.00 g
- Solución de PBS 1X 1000 ml

PBS- NaN_3 al 1% de Albúmina

- Albúmina bovina 1.00 g
- Solución de PBS- NaN_3 100 ml

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS:

Acrilamida 40%:

- Acrilamida 40 g
- Agua desionizada 100 ml

Debido a que es neurotóxica se recomienda usar guantes cuando se trabaje con ella, hay que evitar un agitación vigorosa al disolver ya que puede crear aerosoles que causarían daño si se inhalan. Se debe almacenar en un frasco color ámbar a 4°C.

N, N'- metilen-bis-acrilamida 2%:

- N, N'- metilen-bis-acrilamida 2% 2.0 g
- Agua desionizada 100 ml

Aunque hay pocos datos que indican una posible toxicidad de bisacrilamina, es recomendable manejarse con precaución. Almacenar en un frasco color ámbar a 4°C.

Tris.

Hacer los cálculos para la concentración deseada, pesar y disolver en agua desionizada, el pH de la solución debe ser ajustado con HCl.

Duodecil sulfato de sodio (SDS) 10%:

- Duodecil sulfato de sodio 10 g
- Agua desionizada 100 ml

Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio (APS) 10%:

- Persulfato de amonio 0.1 g
- Agua desionizada 1.0 ml

Almacenarla a 4°C. El APS descompone rápidamente por lo que debe prepararse en el momento que se va a utilizar. Por lo que se recomienda dispensar el APS sólido en tubos eppendoff secos, para que sea diluido con agua desionizada al momento

Regulador de tratamiento para la muestra 2X

Tris 1.5M pH 6.8	25 ml
Duodecil sulfato de sodio	2.0 g
Glicerol	10 ml
Azul de bromofenol 1%	0.1 ml
β -Mercaptoetanol	5.0 ml

Aforar a 50 ml con agua desionizada.

Solución amortiguadora de corrimiento:

Tris 2M pH 8.3	65 ml
SDS 10%	20 ml

Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Solución decolorante:

Metanol	200 ml
Acido acético	100 ml
Agua desionizada	700 ml

XII

REFERENCIAS

- Abbas K. Abul, Lichtman H. Andrew, Pober S. Jordan.P. S. (1995). *Inmunología Celular y Molecular*. 2ª edición. Madrid: Mc. Graw-Hill-Interamericana de España.
- Catty D. (1989). *Antibodies a practical approach*. Printed by information press Ltd. Oxford, England. Vol 1:81-104.
- Benacerraf B., Unanue E. R. (1990). *Inmunología*. 2ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach. and Sirober W. (1992). *Current Protocols in Immunology*. Edith, Wiley Interscience.
- Dresser, D. W. (1986). Assays for immunoglobulin secreting cells. *Handbook of Experimental Immunology*. 4ª edition Blackwell, Oxford. P64.1-64.9.
- Dresser, D. W. (1990). Fast plaque sizing and some applications of the technique in antibody feedback experiments. *Journal of Immunological Methods*, 129:1-8.
- Finegold M.S. and Baron J. E. (1989). *Diagnóstico Microbiológico*. 7ª Ed., Buenos Aires. Médica Panamericana: 154-156.
- Giorg J.V. Rose N.R., (1992). Immune cell phenotyping by flowcytometry. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. *American Society for Microbiology*:3: 328-331
- Grdfrey I. D. and Zlotnik A. (1993). Control points in early T cell development. *Immunol. Today*, 14:547-551.
- Grey H.M., Sette A., Buss S. (1990). Así reconocen las células T a los antígenos. *Investigación y ciencia*. 160: 26-43.
- Harlow E., Lane D. (1988). *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. p139-243.
- Kabelitz D, Jansen O., Brucker C. (1988). Use OKT3 hibridoma cells to clonally activate CD3+ human T lymphocytes. *J. Immunology methods*. 107: 211-216.
- Langhorne J. (1994). The immune response to the blood stage of *Plasmodium* in animal models. *Immunology Letters*. 41:99-102.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Langhorne J. (1994). WHO Task force meeting on mechanisms of immunity to Malaria held in the Max-Planck. Institut für Immunbiologie. Freiburg Germany. *Immunology letters*. 41:87-88.

Legorreta-Herrera M. , Jarra W. Snounou, and Brown K. N. (1994) Specificity in protective immunity to malaria. *Advances in Modern Biotechnology* 2:11

Lehninger Albert L., Nelson D. L., Cox M. M. (1993). Principios de Bioquímica. 2ª edición. Barcelona: Ed. Omega S. A. pp138-150.

Manson M. Margaret. (1992). Methods in molecular biology (Immuno chemical protocols).New Jersey: Human Press Totowa. p 44-50.

Mazier-D, Renia-L., Nussler-A., Pied-S., (1990). Hepatic phase of malaria is the target of cellular mechanisms induced by the previous and the subsequent stages. A crucial role for liver nonparenchymal cells. *Immunol Letters*. 25:65-70.

Meding S. J. and Langhorne J. (1991). CD4⁺ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J. Immunol*. 21: 1433-1438.

Mosmann T. R. and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more. *Immunology Today*. 17:138-146.

Olliaro, P. Cattani, J., Wirth D. (1996). Malaria, the submerged disease. *Journal American Medician Association*. 275:(3)230-233

Perlmann P., Wigzell H. (1988). Immune Responses in Malaria, Preface. *Prog. Allergy*. Vol. 41: VII-IX.

Poduval T. B. (1991). Quantitation of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis, using an ELISA reader. *Journal of Immunological Methods*. 142:137-139.

Roitt M. Ivan. (1994). *Inmunología, Fundamentos*. 7ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.

Rose R.N., Conway M.E., Fahey L.J., Friedman H., and Penn M.G. (1992). Manual of clinical laboratory immunology. 4ª Ed. Washington D.C. American Society for Microbiology: 156-159, 164-168.

Ruiz A.A. (1992). Flowcytometry in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*. 211:513-514.

Seguin-MC., Klotz, F.W., Schneider-I, Weir, J.P., Goodbary,M., Slayter, M., Raner, J.J. Anigolu, J.U and Green, S.J. (1994). Induction of Nitric Oxide Synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *P.berghoi* infected mosquitoes; Involvement of interferon-gamma and CD8⁺ T cells. *J. Exp-Med*, 180:353-358.

Sikora K, Howard M.S. (1986). Anticuerpos monoclonales. 1ª edición. Barcelona. Edit. Reverté, S.A.:1-15.

Smith D.L., et. al. (1992). Delayed hypersensitivity skin test. *American Society for Microbiolgy*.15:13-18

Stites D. P., Stobo J.D. y Wells, V. (1991). Inmunología Básica y Clínica. 7a edición. México D.F. El Manual Moderno. 277-279, 288-299.

Taylor-Robinson, A.W., Philips, S. Severn, A. Moncada, S & Liew, F.Y. (1993). The role of TH1 and TH2 cells in a Rodent Malaria Infection. *Science*. 260:1931-1934.

Troye-Blomberg, et.al. (1994). T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit-Rev-Immunol*. 14: 131-55.

Troye-Blomberg. (1994). Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunology letters*. 41: 103-107.

Taylor-Robinson A. W. (1995). Regulation of immunity to malaria: Valuable lessons learned from murine models. *Parasitology Today*. 11: 334-341.

Van der Heyde Henri, Manning D. Dean, Roopenian C. Dery and Weidanz P. William. (1993). Resolution of blood-stage malaria infections in CD8+ cell-deficient $\beta 2$ -m μ mice *The Journal of Immunology*. 151:3187-3191.

Weidanz P. William, Long A. Carole. (1988). The role of T cells in immunity to Malaria. *Prog. Allergy*. 41:215-252.

Weidanz W.P., Melancon-Kaplan J. and Cavacini L.A. (1990). Cell-mediated immunity to the asexual blood satages of malarial parasites: animal models. *Immunology letters*. 25:87-96.