

COMPARACION DE LA HEMOLISIS AL 50% Y AL
100% EN LA MEDICION DEL COMPLEMENTO
SERICO EN HUMANOS.

TESIS PROFESIONAL

MIRNA OBDULIA GARCIA VELASCO

México, D. F.

1968



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

U. N. A. M.

Facultad de Química

COMPARACION DE LA HEMOLISIS AL 50% Y AL
100% EN LA MEDICION DEL COMPLEMENTO
SERICO EN HUMANOS.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUEMADO FARMACEUTICO BIOLÓGICO

p o s o n t a

MIRNA OBDULIA GARCIA VELASCO

México, D. F.

1961

JURADO ASIGNADO: PRESIDENTE: Ing. Ramón Ulacia Esteves
VOCAL: Q.F.B. Srta. Magdalena Acosta S.
SECRETARIO: Q.F.B. Srta. Carmen Reina B.
1er. SUPLENTE: Ernestina Ballesteros R.
2o. SUPLENTE: Socorro Cao Romero M.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE NEFROLOGIA, HOSPITAL DE
PEDIATRIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL.

SUSTENTANTE: MIRNA ABDULIA GARCIA VELASCO.
ASESOR DEL TEMA: MAGDALENA ACOSTA SEGURA.
SUPERVISOR TECNICO: GUILLERMO SOLOMON S.

A MIS PADRES CON CARINO

Sl. MARIANO GARCIA G.

Sra. ESPERANZA VELASCO DE GARCIA

CON AGRADECIMIENTO AL

DR. GUILLERMO SOLOMON S.
Por su valiosa ayuda co-
mo director de este tra-
bajo.

AL DR. DAVID SANTOS A.

A LA SRITA. Q.F.B.

MAGDALENA ACOSTA SEGURA

C O N T E N I D O

INTRODUCCION

GENERALIDADES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

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

Los numerosos estudios realizados a la fecha en diversas enfermedades nefrológicas, nos han demostrado la intervención del sistema de complemento en su etiopatogenia, por lo que la determinación cuantitativa del complemento en el suero de estos pacientes, es de gran utilidad para su diagnóstico. Con éste fin se han ideado varios métodos todos ellos basados en la reacción de "fijación de complemento", que consiste en provocar la hemólisis de los eritrocitos de carnero sensibilizados con sus correspondientes anticuerpos al encontrarse en presencia de el complemento total. En vista de que esta hemólisis puede ser medida en grados variables, es la intención de este trabajo determinar si es indiferente la aplicación clínica práctica del método que tomando como punto final el 100% de hemólisis o hemólisis total, como sustituto en el laboratorio de rutina del método que utiliza como punto final el 50% de la hemólisis de los eritrocitos. Ya que este método es más complicado que el primero se procedió a determinar el coeficiente de correlación de los dos métodos. Los métodos, y los resultados que se obtuvieron se dan en el desarrollo de este trabajo.

GENERALIDADES .

Los conceptos actuales (1) sobre la naturaleza y funciones del complemento (C') parten de tres periodos principales de investigación, encabezados — por Ferrata en 1907, Ritz y Coca en 1914 y Gordon en 1926, los cuales indicaron que el complemento inter—venía en varios sistemas inmunes y demostraron que — la hemólisis de los eritrocitos de carnero sensibilizados por el anticuerpo, requerían de 4 fracciones de suero normal.

Posteriormente, Pillen en 1943 y Ecker en 1948, introdujeron la aplicación de procedimientos — químicos para el fraccionamiento del suero normal y el método cuantitativo para la medición de fraccio—nes proteínicas que constituyen el método de medi—ción del complemento hemolítico a base de precipiti—nas (Heidelberg y Mayer 1948), identificándose los 4—componentes del complemento entonces conocidos: C'₁,—C'₂, C'₃, C'₄. Posteriormente se conoció que el C'₃ es—ta formado por seis componentes que previamente se consideraron como una sustancia simple, sabiéndose — actualmente que el complemento total está constitui—do por 9 proteínas pertenecientes a la fracción de — las beta-globulinas, poseedoras cada una de un alto — grado de pureza funcional y un grado de pureza fun—cional y un grado pobre de pureza química (2).

Hasta la fecha se conoce que sólo los cua—tro componentes (C'₁, C'₂, C'₄, C'₃) se requieren para—fagocitosis e inmunoadherencias que habitualmente — son considerados como parte integral del mecanismo — de defensa. Mientras que los nueve componentes pare—cen ser necesarios para los mecanismos citotóxicos y citolíticos, lo que podría tener interés desde el pun—to de vista de trasplantes, fenómenos de hipersensibi—lidad retardada y enfermedades autoinmunes.

Así pues podríamos definir al complemento como el conjunto de beta-globulinas que actuando de una manera perfectamente sincronizada en tiempo y en secuencia siempre igual, intervienen en mecanismos inmunológicos que se desarrollan en los seres vivos y que intervienen en los mecanismos de ~~defensa~~ e bien en los fenómenos de autodestrucción, ya sea por exageración del mecanismo de defensa como en la glomerulonefritis humana, o bien por citolisis propia, como en las enfermedades autoinmunes (Lupus eritematoso, anemias hemolíticas, etc.). En vista de la facilidad para el reconocimiento del fenómeno de lisis a nivel de los eritrocitos, estos han sido usados desde hace (3) tiempo por medio de la prueba de "fijación de complemento", para tener un índice aproximado de la cantidad existente de complemento total.

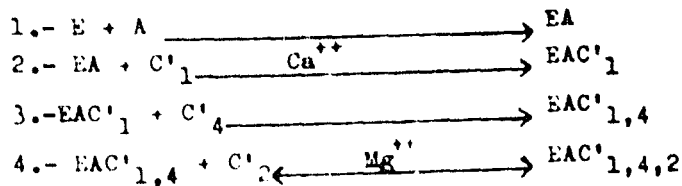
La prueba de "fijación de complemento estudiada a partir de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolina de conejo (EA) se resume en el esquema siguiente:

E = Eritrocitos

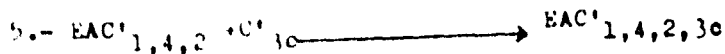
C' 1,2,3 etc. = Componentes del complemento

A = Anticuerpo

EA = Eritrocitos sensibilizados



reacción reversible.



- 6.- EAC' 1,4,2,3c + C' 3b → EAC' 1,4,2,3c,3b
- 7.- EAC' 1,4,2,3c,3b + C' 3e → EAC' 1,4,2,3c,3b,3e
- 8.- EAC' 1,4,2,3c,3b,3e + C' 3f → EAC' 1,4,2,3c,3b,3e,3f
- 9.- EAC' 1,4,2,3c,3b,3e,3f + C' 3a → EAC' 1,4,2,3c,3b,3e,3f,3a
- 10.- EAC' 1,4,2,3c,3b,3e,3f,3a + C' 3d → EAC' 1,4,2,3c,3b,3e,3f,3a,3d
- 11.- EAC' 1,4,2,3c,3b,3e,3f,3a,3d → HEMOLYSIS.

MATERIAL Y METODOS:

Materiai humano

Se determinó el título de complemento hemolítico en 156 enfermos con glomerulonefritis aguda o crónica y en 31 controles los cuales estuvieron constituidos por individuos sanos. Esta determinación se hizo aplicando ~~los~~ métodos en forma comparativa, uno basado en la hemólisis al 50% y el otro en la hemólisis al 100%.

Materiai de vidrieria

Pipetas de Khan graduadas en centésimas.
Tubos de ensaye de 12 por 75 y de 10 por 75.

Gradillas metálicas
Baño María a 37°C
Espectrofotómetro Coleman Jr.
Centrífuga Internacional
Centrífuga Refrigerada

Reactivos

1.-Solución de Alsever

Fórmula

Glucosa.....2.05 g
Citrato de sodio.....0.8 g
Cloruro de sodio.....0.42 g

Preparación:

En un matraz aforado de 100 ml disolver estas -- substancias, utilizando el agua necesaria para afora el volumen del matraz.

2.-Amortiguador

Fórmula

Cloruro de sodio.....83.8 g
Carbonato ácido de sodio..... 2.52g

Dietil barbiturato de sodio.....3.0 g
Acido dietil barbitátrico.....4.6 g
Mg Cl₂: 6H₂O.....1.0 g
Ca Cl₂: 2H₂O.....0.2 g

Preparación:

Disolver las últimas tres sustancias en 500 ml de agua destilada y caliente, agregar los otros tres, previamente disueltos en agua fría, y llevarlos a un volumen de - 2000 al ajustando el pH a 7.6.

Nota: Para su uso se hace una dilución 1:5.

3.-Hemolisina de carnero glicerizada y titulada 1- a 1000 de los Laboratorios Hyland.

4.-Eritrocitos de carnero

Preparación y conservación:

a.-Preparar una suspensión al 50% de eritrocitos - de carnero en solución de Alsever.

b.-Conservarlos en el refrigerador a 4°C. Estos eritrocitos se pueden utilizar todo el tiempo que permanezcan sin alteraciones: desarrollo de contaminantes y sin hemolizarse.

c.-Tomar 1.0 ml de la suspensión de eritrocitos de carnero (al 50% en Alsever) y verterlos en un tubo grande - de centrifuga de capacidad de 10 ml.

d.-Agregar amortiguador diluido 1:5 y con pH de 7.6 hasta completar el volumen del tubo.

e.-Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.

f.-Separar el sobrenadante y repetir esta operación cuantas veces sea necesario para obtener un sobrenadante incoloro, y consecuentemente un paquete de eritrocitos limpio.

M E T O D O S .

I.-TITULACION DEL COMPLEMENTO AL 100% DE HEMOLISIS.

1.-Hacer una dilución del suero problema, poniendo 2.0 ml de amortiguador con 0.5 ml del suero problema, mezclando varias veces con la misma pipeta para homogeneizar.

2.-Preparación de eritrocitos sensibilizados:

a.-De los eritrocitos de carnero previamente lavados y tomar 1.0 ml del paquete de eritrocitos y agregar 19.0 ml - de amortiguador en un matraz de 50 ml.

b.-Por otra parte en un tubo de ensaye se ponen 20 lam das de hemolisina de carnero titulada 1:1000 y 20 ml de amor tiguador.

c.-La hemolisina así preparada se pasa al matraz que contiene los eritrocitos de carnero, mezclandose perfectamente y dejandose reposar durante 30 minutos.

3.-Numerar una serie de 10 tubos y medir en ellos el sue ro problema, amortiguador y eritrocitos sensibilizados segun se indica en el siguiente cuadro.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suero pro- blema di- luido.(ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
Amortigua- dor.(1:5) (ml)	0.18	0.16	0.14	0.12	0.10	0.08	0.06	0.04	0.02	0.00
Eritrocitos sensibiliza- dos.(como en 2) (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

CUADRO "A"

4.-Agitar para mezclar perfectamente.

5.-Incubar en baño de agua a 37°C durante 30 minutos.

6.-Sacar del baño de agua y centrifugar a 2000 rpm durante 3 minutos.

I n t e r p r e t a c i ó n .

Leer la lisis obtenida en los 10 tubos cuya interpretación se hará de la siguiente manera, y de acuerdo con los valores representados en la siguiente tabla.

Tubo	Unidades
1.- _____	250
2.- _____	125
3.- _____	83.3
4.- _____	62.5
5.- _____	50.0
6.- _____	41.6
7.- _____	35.7
8.- _____	31.2
9.- _____	27.7
10.- _____	10.0

Ejemplo; Si la hemólisis se presenta desde el tubo número 4 se reportarán 62.5 unidades de complemento, y así sucesivamente. En caso de que no haya hemólisis en ninguno de los diez tubos se reportará 10 unidades de complemento, que comprenderán los valores del 1 al 9.

II.-TITULACION DEL COMPLEMENTO AL 50% DE HEMOLISIS.

1.-Sensibilizar los eritrocitos de carnero con hemolisis al igual que en el método al 100% de hemólisis.

2.-De los eritrocitos sensibilizados tomar 4.0 ml y agregarles 1.0 ml de amortiguador.

3.-Hacer dos diluciones del suero con amortiguador — una en proporción 1:20 y otra en proporción 1:40.

4.-Con estas dos diluciones se montaran los tubos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del cuadro "B", poniendose las cantidades de —

reactivos que allí se indican, quedándonos finalmente dos series de seis tubos; una correspondiente a la dilución - 1:20 y la otra correspondiente a la dilución 1:40. Estas dos series de tubos tienen cantidades iguales de los diferentes reactivos difiriendo solamente en el uso de una u otra dilución.

Nota: Los tubos 1, 2 y 3 del mismo cuadro sirven para las dos diluciones.

Tubo	H ₂ O Destilada. (ml)	Eritrocitos sensibilizados. (como en 2) (ml)	Amortiguador. (1:5) (ml)	ml. de suero problema. Dils. 1:20 ó 1:40	Solución salina. (ml)
1 100% lisis	1.7	0.3	-	-	-
2 0% lisis	-	0.3	1.7	-	-
3 Blanco	-	-	2.0	-	-
4	-	0.3	-	1.0	0.7
5	-	0.3	0.2	0.8	0.7
6	-	0.3	0.4	0.6	0.7
7	-	0.3	0.6	0.4	0.7
8	-	0.3	0.8	0.2	0.7
9 Blanco	1.5	0.3	-	0.2	-

CUADRO "B"

- 5.-Una vez que se tienen los tubos con sus respectivas diluciones, agitar para mezclar e incubar a 37°C volviendo a agitar cada diez minutos a lo largo de la incubación.
- 6.-Sacar del baño de agua y agregar 0.7 ml de solución salina fría a cada tubo para completar en todos ellos un volumen de 2 ml, observándose que los tubos 1, 2, 3 y 9 ya tienen este volumen, como se ve en el cuadro "B".
- 7.-Centrifugar todos los tubos menos el de 0% de lisis, en centrífuga refrigerada a -5°C durante 3 minutos.
- 8.-Decantar los sobrenadantes a celdillas Coleman y leer-

a 550 milimicras de longitud de onda. Previamente llevar a cero el espectrofotómetro Coleman Jr. con el blanco No. 9.

Nota: El tubo No. 3 sirve para ajustar a 100 el espectrofotómetro.

El hecho de usar dos diluciones se hizo con el fin de chequear con más exactitud el método, supuesto que como se verá más adelante (cálculos) en los casos en los que las unidades de complemento, obtenidas con los valores de la 1:20 y los obtenidos con los valores de la dilución 1:40 difieran en pocas unidades, entonces se sacará una media aritmética y el resultado de ésta serán las unidades de complemento que se reporten por este método.

C a l c u l o s .

Se toma la lectura del tubo número 1 que corresponde a una lisis al 100%, a partir de esta lectura se hacen los cálculos con las lecturas de los tubos 4, 5, 6, 7, y 8 para sacar el % de cada una de éstas. Estos cálculos se hacen tanto para la dilución 1:20 como para la dilución 1:40, así como la lectura del tubo No. 1 se usa para sacar los % de las dos diluciones. Ejemplo:

Tubo No.1 = Lectura = 540 Unidades de Densidad Óptica
(D O)
- 100% Lisis.

Dil. 1:20			Dil. 1:40		
Tubo	D O	%Lisis	Tubo	D O	%Lisis
1.-	510	94	1.-	494	91
2.-	500	92	2.-	436	80
3.-	422	78	3.-	381	70
4.-	395	73	4.-	270	50
5.-	275	50	5.-	38	7

Estos valores se grafican en una escala porcentual y semilogarítmica, teniendo en las coordenadas los % de hemólisis y en las abscisas el volumen del suero problema, uniendo los puntos en la forma que se ve en la gráfica que representa el ejemplo anterior y que se encuentra en la página siguiente.

Una vez trazada la tendencia de la gráfica se busca la hemólisis al 50% y se ve a que volumen de suero problema corresponde. Para poder obtener las unidades de complemento al 50% de hemólisis se aplica la siguiente fórmula:

$$U \text{ de } C'_{H50} = \frac{1}{\text{Vol.}} \times \text{Dilución}$$

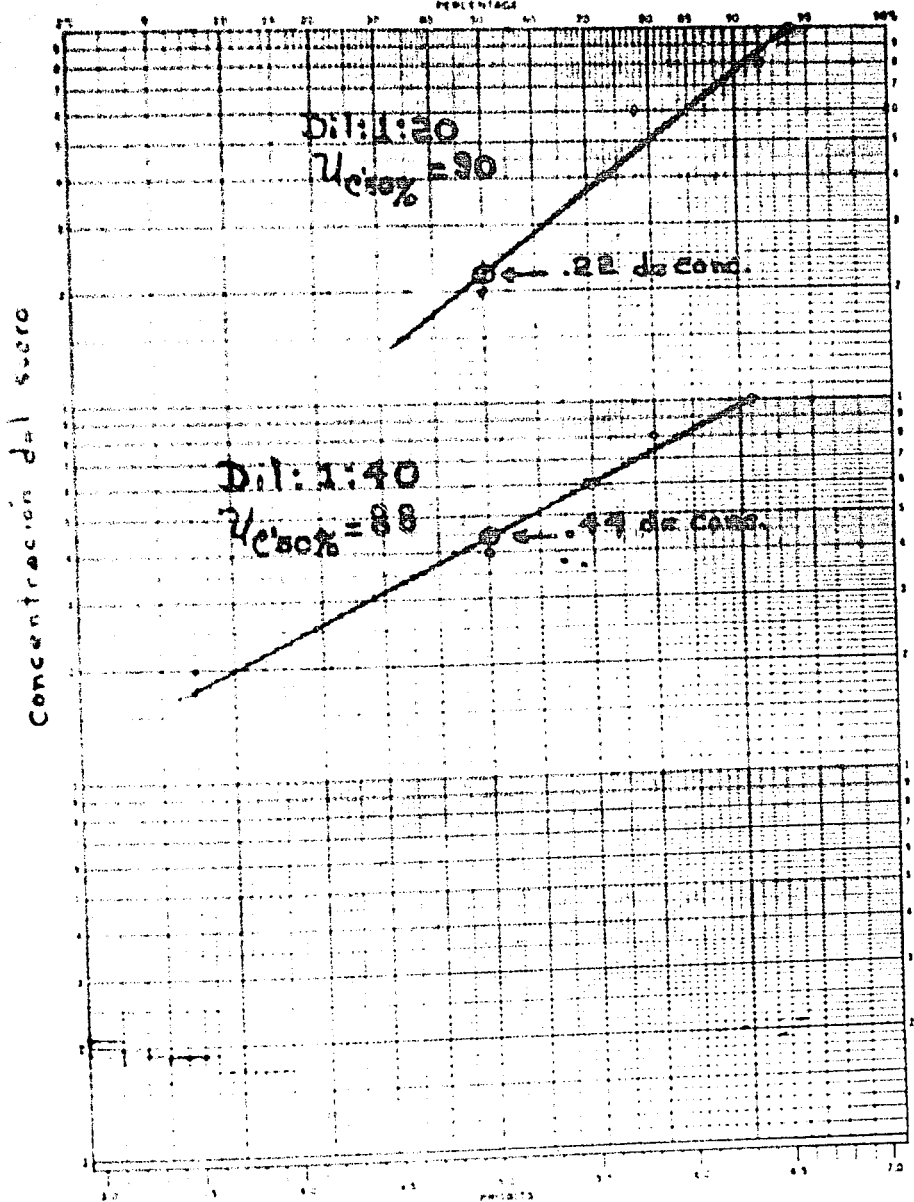
Substituyendo en la fórmula los valores de el ejemplo que nos ocupa tenemos:

$$U \text{ de } C'_{H50} = \frac{1}{.22} \times 20 = 90$$

$$= \frac{1}{.44} \times 40 = 88$$

Como ya se indicó con el objeto de checar nuestro método se hizo simultaneamente la dilución 1:40 de todos los sueros problema, tomando una media aritmética de los resultados obtenidos, en el caso de que estos fueran ligeramente diferentes, y repitiendo todas las determinaciones cuando la diferencia en los resultados no fuera razonablemente coincidente. Por consiguiente en nuestro ejemplo las unidades de complemento C'_{H50} serían 89.

% de Hemólisis



RESULTADOS.

Como se ve en la gráfica No.1 el 96% de los individuos se encontraron con complemento bajo al 100% de hemólisis (C'_{H100}), lo cual es debido a que en esta gráfica sólo se trata de casos de individuos afectados de glomerulonefritis, enfermedad en la cual ya es conocido que cursa con hipocomplementemia (4) (5).

Se consideraron cifras normales, las mayores de 50 unidades de complemento (C'_{H100}).

En la gráfica No.2 todos los casos se encuentran con cifras normales de complemento, pues son determinaciones hechas en individuos sanos.

La gráfica No.3 nos revela que el 95% de los casos aquí graficados se encontraron con cifras de complemento bajo, al 50% de hemólisis (C'_{H50}), el 5% restante se encontró con cifras de complemento normal, coincidiendo casi exactamente con los resultados de la gráfica No.1 en donde se estudió a los mismos pacientes considerando cifras normales las mayores de 150 unidades.

La gráfica No.4 muy similar en resultados a la gráfica No.2, nos muestra a todos los controles dentro de las cifras normales de complemento al 50% de hemólisis, con cifras mínimas normales de 151 unidades.

Nota: Los valores graficados se encuentran representados en la tabla "A".

Los valores estadísticos resultantes de la comparación de el total de determinaciones (controles y nefrópatas) de C'_{H50} y C'_{H100} se representan en el cuadro "C" para ambos casos. Como se ve en este cuadro obtuvimos un valor de p menor que 0.0001.

DETERMINACION DEL COMPLEMENTO HEMOLITICO AL 50% Y 100%
EN 187 INDIVIDUOS (156 NEPROPATAS Y 31 CONTROLES)

NEPROPATAS.

No. DE CASOS	UNIDADES C ⁵⁰			No. DE CASOS	UNIDADES C ¹⁰⁰
		a			
19	0	a	20	65	5.0
12	21	a	40	11	10.0
17	41	a	60	11	27.7
18	61	a	80	21	31.2
22	81	a	100	23	35.7
17	101	a	120	18	41.6
43	121	a	140	7	50.0
8	141	a	160		
0	Mayor de 161				
SUMA	156			SUMA	156

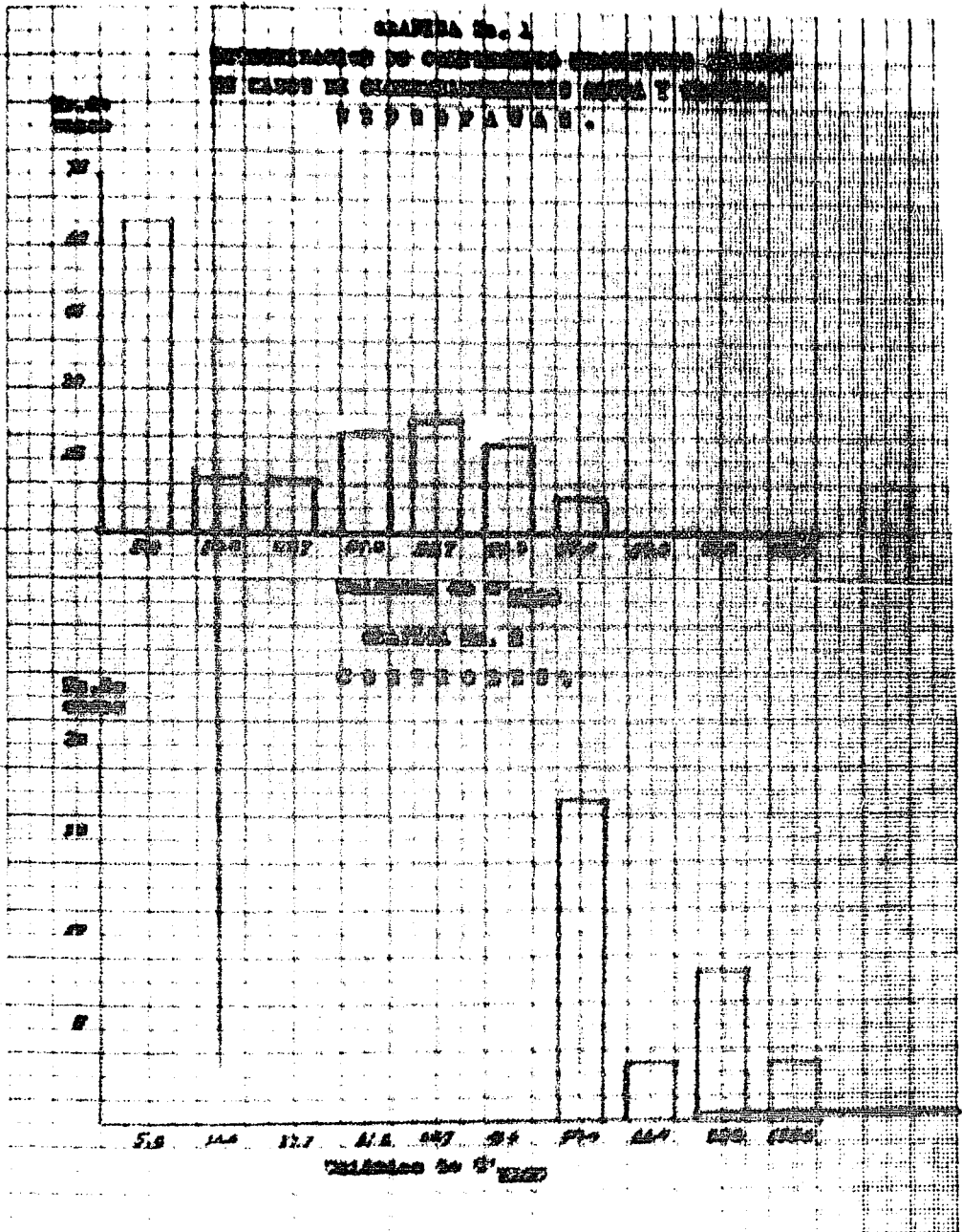
CONTROLES.

No. DE CASOS	UNIDADES C ⁵⁰			No. DE CASOS	UNIDADES C ¹⁰⁰
		a			
0	0	a	150	17	50.0
1	151	a	160	3	62.5
4	161	a	170	8	83.5
7	171	a	180	3	125.0
10	181	a	190		
7	191	a	200		
2	201	a	210		
SUMA	31			SUMA	31

TABLA "A" .

GRAPH No. 1

PERCENTAGE OF CEMENTATION DEFECTS IN CASES OF CEMENTATION WITH VARIOUS TYPES OF CEMENT.



C U A D R O " C "

CALCULO DE p EN LA DETERMINACION DEL
COMPLEMENTO HEMOLITICO AL 90 Y 100 %
(156 NEFROPATAS Y 31 CONTROLES)

VALORES	50%		100%	
	NEFROPATAS	CONTROLES	NEFROPATAS	CONTROLES
n =	156	31	156	31
\bar{x} =	83.3	182.7	21.2	67.1
s =	43.9	12.1	15.8	23.6
\bar{s} =	3.5	2.2	1.3	4.2
$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 =$	4.1		4.4	
$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 =$	23.8		10.4	
$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\bar{s}_1 - \bar{s}_2}$				
p <	0.0001		0.0001	

666

n = Número de observaciones

\bar{x} = Promedio aritmético

s = Desviación estandar

\bar{s} = Error por azar del promedio aritmético

$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ = Error de la diferencia de los promedios

$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\bar{s}_1 - \bar{s}_2}$ = Diferencia de los promedios entre el error de la diferencia.

p = Probabilidad de error

CONCLUSIONES.

Se comprobó una vez más lo encontrado por otros autores (4,5) que el complemento hemolítico se encuentra en cifras más bajas en algunas nefropatías resultante de un proceso inmunológico como la glomerulonefritis aguda, y algunos casos de glomerulonefritis crónica.

La comparación de la determinación de complemento hemolítico al 50 y 100% de hemólisis mostró que ambas técnicas son similares, aunque de todos es conocido la mayor exactitud de la primera, pero como ya habíamos comentado al inicio de este trabajo la mayor facilidad y menor necesidad de instrumental de la determinación al 100% de hemólisis nos hizo emprender la comparación de los dos métodos y llegamos a comprobar que desde el punto de vista de la exactitud que requiere el trabajo clínico de rutina es indiferente el empleo de las dos técnicas ya que los resultados obtenidos en ambas muestran un valor de $p < 0.0001$ (cuadro "C").

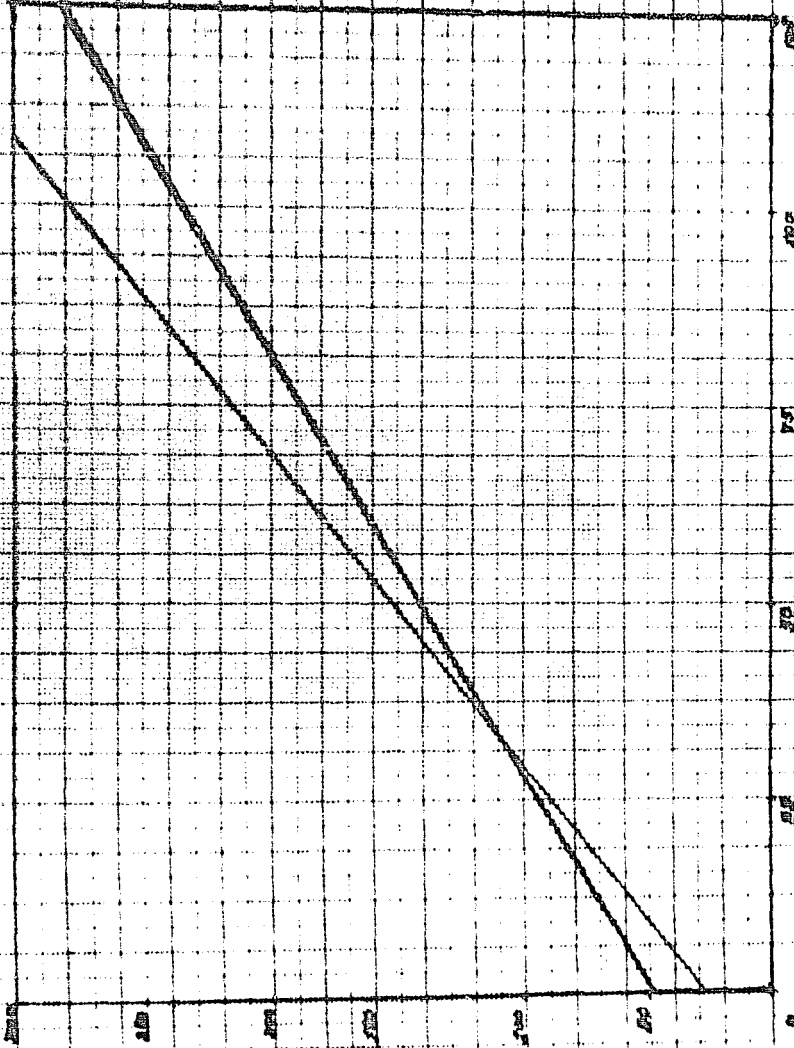
El coeficiente de correlación (r), entre los dos métodos se encuentra representado por las líneas de regresión en la gráfica No.5, y es de 0.865 o sea muy cercano a 1 en donde las dos técnicas serían idénticas. Esta es una comprobación más de la similitud entre los dos métodos. La gráfica de correlación nos enseña también que en las determinaciones hechas por ambos métodos cuyos resultados sean bajos, la similitud es más grande y por consiguiente la probabilidad de error es mínima y despreciable. Es más estimo convencidos de que esta gráfica puede ser usada para traspolar las unidades obtenidas al 100% de hemólisis a unidades de complemento al 50% de hemólisis.

En conclusión la determinación de C_{50} y C_{100} es similar en todos aquellos padecimientos en donde existe hipocomplementemia y posiblemente en aquellos en donde existe hipercomplementemia, si ésta es muy importante, la comparación en unidades de los dos métodos no sería válida ya que

las líneas de regresión en esa parte de la gráfica se abren más, pero no existe la posibilidad ($p < 0.0001$) de encontrar cifras de complemento bajo por un método y elevado por otro o viceversa.

*Diagrama de Curvas de Tensões e de Deformação
 do concreto em compressão axial simples*

Figura No. 1



$\sigma = \text{Tensão}$

$\epsilon = 50.000 - 1.000$
 $\sigma = 0.001$
 $\sigma = 12.101 - 0.109$

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

- 1.-Benjamin, W.Z., Lester, G. and Robert, T.M.
The Inflammatory Process. 2a. Edition.
Academic Press, New York. London, 820-830, 1965.
- 2.-Stanley, Y.
Functions and Mechanism of action of Complement.
The New. Eng. J. of Med. Vol: 340: 140-145-274, 1966.
- 3.-Kabat and Mayer's
Experimental Immunochemistry. 1ra. Ed.
Charles C. Thomas. Publisher. Springfield. Illinois. U.S.A.
79-187, 1948.
- 4.-Lange, K.W., E. J and Slobody, L.B.
The significance of serum complement levels for the —
diagnosis and prognosis and of acute and subacute glomerulonephritis and lupus eritematosus disseminatus. Ann.
Int. Med. Vol: 53: 636, 1960.
- 5.-Sólonon, G., Biro, C., Santos, D.
Determinación del complemento hemolítico al 100% de hemólisis en 156 casos de glomerulonefritis aguda, su utilidad como prueba diagnóstica, y como guía en el pronóstico. En prensa, 1968.
- 6.-J.H. Humphrey, and R.G. White.
Inmunología Médica. 1ra. Ed.
Editores Toray, S.A. Barcelona. 115-244-334, 1964.
- 7.-William, C. Boyd.
Fundamentos de Inmunología. 2a. Ed.
Editorial Universal de Buenos Aires 327, 332, 340, 617, 1963

8.-J.E.Cushing y D.H.Campbell

Principios de Inmunología.1ra.Ed.

Editorial Acribia Zaragoza.Barcelona.Buenos Aires.México

32,95,179,224,314,1962.

9.-A.Ciba Foundation Symposium

Complement

Edited by G.E.W.Walstenholme,O.B.E.F.R.C.P.,F.I.Biol.and

Julie Knight,B.A.,J.andA.Churchill, LTD

London,W.I.1965.

10.-Kabat and Mayer's

Experimental Immunochimistry.2a.Ed.

Charles C Thomas.Publisher.Sprinfeld.Illinois.U.S.A.

133-235,1964.
