

5
2.ej



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN*

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA OBTENCION
DE SUERO ANTILINFOCITO T DE
HUMANO EN CONEJO**

T E S I S

*Que para obtener el Título de:
Químico Farmacéutico Biólogo*

presentan

*Alejandra Avila Miranda
Ma. Guadalupe Garrido Eslava*

Director:

M. C. Carlos Eduardo Salas C.



Cuautitlán Izcalli, 1986.

V N A M



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

Resumen	1
I Introducción	2
II Objetivos	11
III Materiales y Métodos	12
1) Preparación de soluciones	12
2) Criterio de viabilidad	13
3) Obtención del antígeno
3.1 Timocitos	13
3.2 Linfocitos	14
4) Purificación de linfocitos	
4.1 Rosetas E y EAC doble gradiente	15
4.2 Columnas de Nylon	16
5) Criopreservación de células	17
6) Descongelación	17
7) Pruebas para determinar pureza de linfocitos ..	
7.1 Rosetas E	17
7.2 Rosetas EAC	18
7.3 Microcitotoxicidad mediada por anticuerpos	19
8) Inmunización de animales	23

9) Valoración de la especificidad del antisuero obtenido y título.	
9.1 Fijación de complemento	23
9.2 Microcitotoxicidad mediada por anticuerpos	24
9.3 Inhibición en la formación de rosetas E	24
10) Análisis Estadístico.	
IV Resultados	27
V Discusion	49
VI Conclusiones	54
VII Bibliografía	55

RESUMEN.

Para prevenir el rechazo de haloinjertos se han preparado sueros antilinfocíticos (SAL) en gran variedad de animales, en los que ha demostrado ser un inmunosupresor potente. Basandonos en estos antecedentes, se decidió seguir una metodología adecuada para obtener suero antilinfocito T. Se utilizó centrifugación en densidad de gradientes para obtener linfocitos, a los cuales se les pasó por columnas de Nylon, o bien se les trató con eritrocitos de carnero al 5% para formar rosetas E y EAC y lograr con esto la separación de linfocitos T de B. La evaluación de la pureza de linfocitos T des congelados gradualmente, se hizo por formación de rosetas E y EAC y con pruebas de microcitotoxicidad en placa obteniendose 90% de linfocitos T y 10% de B. Con esta población de linfocitos se inmunizaron conejos. Para valorar el suero antilinfocito T obtenido, se utilizaron técnicas como inhibición de la formación de rosetas E, placas de microcitotoxicidad y fijación de complemento, obteniendose un título de anticuerpos de 1:640. El suero obtenido resultó bajo en especificidad.

I INTRODUCCION.

El sistema inmune comprende dos mecanismos principales - que se manifiestan como inmunidad celular y como inmunidad humoral. El linfocito es la célula primaria involucrada en ambos componentes. Al nacer, las células primordiales de la médula ósea se diferencian en dos tipos: linfocitos T, dependientes del timo, y los linfocitos B, análogos en los mamíferos a los derivados de la bolsa de fabricio en las aves. Los primeros son responsables de la inmunidad celular entre cuyas funciones se encuentra la de destruir células extrañas al sistema inmune, por medio de las linfocinas y también de activar la fagocitosis; y los últimos de la inmunidad humoral, es decir, la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas que son proteínas que se encuentran en el plasma sanguíneo ambos, en respuesta al estímulo provocado por un antígeno (13).

Las bases celulares de la respuesta inmune involucra las complejas interacciones entre los linfocitos T y los B. Así estas clases heterogéneas de linfocitos son en general morfológicamente indistinguibles y se les encuentra juntos en todos los tejidos linfoides periféricos, su estudio se ha facilitado por métodos acordados a lograr su separación. En años

recientes, se ha desarrollado una gran variedad de técnicas para aislar linfocitos B y linfocitos T. Muchos de estos métodos se han basado en propiedades físico-químicas de las subpoblaciones de linfocitos, las que incluyen propiedades de adhesión superficial, la capacidad de unirse directamente a eritrocitos de carnero, o a eritrocitos de carnero tratadas con anticuerpo y complemento. Se describen técnicas de células formadoras de rosetas y de columnas que permiten el aislamiento de poblaciones altamente purificadas de células T y B. El linfocito B se caracteriza por la presencia de una inmunoglobulina fácilmente identificable en la superficie celular; tiene un receptor específico para la región Fc de la IgG; presentan receptores para el complemento usando para ello eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos y complemento (rosetas EAC), marcadores todos éstos ausentes en los linfocitos T. Los linfocitos T se reconocen porque tienen la propiedad de formar rosetas espontáneas con los eritrocitos de carnero, propiedad no mostrada por los linfocitos B. Los linfocitos unidos a las células de carnero, son de mayor densidad que los linfocitos solos y pueden ser fraccionados por sedimentación a través de un gradiente de Ficoll - Hypaque (12).

Los linfocitos son unas de las células efectoras del sis

tema inmune y es en torno a ellas donde se han desarrollado - una amplia gamma de estudios en pacientes afectados por una - gran variedad de enfermedades, entre las que se pueden contar las enfermedades autoinmunes, las inmunodeficiencias o los -- transtornos relacionados con los trasplantes, en donde es -- fundamental deprimir el sistema inmunológico, por medio de mé todos químicos, físicos o más recientemente biológicos es decir por inmunoterapia, para evitar los fenómenos denominados de rechazo del trasplante (13). El fenómeno de rechazo es de naturaleza inmunitaria y en ella intervienen mecanismos co mo a) la producción de anticuerpos específicos, del tipo IgG - por los linfocitos B y plasmocitos contra el tejido transplan tado, que se encuentran en el suero sanguíneo; b) una rea--- cción celular mucho más importante que la anterior, en la que intervienen los linfocitos T, que invaden el injerto y lo le--- sionan tratandose de una reacción de hipersensibilidad retar--- dada en la cual dichas células son capaces de destruir las cé lulas del trasplante. Por diferentes mecanismos dentro de - los cuales se encuentran involucrados los macrófagos, sensibi lizados por los linfocitos T que terminan por destruir y eli--- minar las células dañadas del injerto. Cuando el injerto es colocado en el organismo receptor da lugar a un antígeno de - trasplante HL-A proteico que se forma en la superficie celu-

lar y que rápidamente alcanza los ganglios linfáticos, donde origina los fenómenos inmunitarios anteriormente descritos -- (10). En un principio se sospechó que en el rechazo de injertos intervenían anticuerpos circulantes, pero después se descubrió que los agentes activos eran linfocitos pequeños, los que son capaces de reconocer la superficie de células injertadas como foráneas, destruyendo específicamente las células portadoras de antígenos extraños. Sabemos ahora, que en el humano, existe un grupo de genes importantes que predominan en el proceso del rechazo de injertos (histocompatibilidad) y son los que determinan la especificidad de los antígenos principales de histocompatibilidad y que se conoce como complejo HL-A (35).

El tiempo que tarda y la intensidad de la reacción del rechazo de injerto esta condicionada por el grado de diferencias antigénicas entre donador y receptor. Los antígenos -- HL-A se encuentran expresados en la mayoría de las células nucleadas, su cantidad varía en las células de diferentes tejidos y son las células linfoides las más ricas en expresarlos (25). Considerables evidencias indican que estas células tienen un papel significativo en las reacciones del rechazo de injertos, encontrándose por ejemplo que los linfocitos T solo pueden "detectar" antígenos extraños (o extrínsecos) siem--

pre que esten asociados con sus propios antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); así para células T - citotóxicas los antígenos propios involucrados son los identificados como HLA-A, B y C; para las células T ayudadoras y las de hipersensibilidad tardía son los antígenos "Ia" codificados en la región HLA-D en el hombre (27).

Es indudable que la respuesta inmune de estos y desde luego muchos otros antígenos, se encuentra controlada genéticamente.

Con el fin de prevenir el rechazo de aloinjertos se han preparado, desde los años 60's, sueros antilinfocíticos (globulina antilinfocito) en una gran variedad de animales, en los que ha demostrado ser un inmunosupresor potente (34,37).

Se han propuesto varios mecanismos de acción para el efecto inmunosupresor de los sueros antilinfocíticos (SAL). Se ha podido comprobar la inactivación o eliminación en la circulación de linfocitos dependientes del timo, población celular generalmente considerada como la responsable del rechazo de injertos (26,33,34). Así mismo el SAL disminuye la severidad de las reacciones secundarias producidas después del trasplante de médula ósea en animales de experimentación (24,18).

Después de absorberlo en cultivo de tejidos y en linfo--

blastos derivados de la médula ósea, el SAL resulta ser citotóxico para timocitos y derivados tímicos. Esta actividad dirigida contra antígenos específicos de linfocitos T está directamente relacionada con la capacidad del SAL para prolongar la vida de primates que recibieron un alotransplante de riñón. Esta propiedad también ha sido aplicada a las pruebas de potencia inmunosupresora del SAL observadas en el exitoso transplante de piel, efectuado en primates y en ratones (8, - 9).

Es de importancia mencionar que si entre donador y receptor existen diferencias histocompatibles, el efecto del SAL no se ve disminuido y se mantiene la prolongación del injerto de piel en el hombre. En transplantes de riñón donde donador y receptor son cercanamente histocompatibles el efecto del SAL es aún más efectivo. En ambos casos, se produce una inmediata y profunda linfopenia específica de células T (23).

En resumen existen evidencias abundantes que sugieren -- que el efecto inmunosupresor del SAL se logra mediante la depresión selectiva de linfocitos T circulantes. Así el tratamiento con SAL tiene los siguientes efectos: 1) deprime selectivamente las células de los nódulos linfáticos y del bazo, -- órganos en donde se localizan células timo-dependientes, 2) -- produce una depresión selectiva similar a la anterior, de lin

focitos en ductos linfoides torácicos (23).

La destrucción o inactivación selectiva de células T --- usando el SAL puede realizarse a través de tres mecanismos: - 1) por la susceptibilidad de los linfocitos circulantes al --- SAL, 2) por la baja velocidad de renovación de otras células linfoides o 3) por la especificidad inmunológica hacia las células T inherentes a la preparación del SAL. Esta última posibilidad se sugiere por el hecho de que la presencia de anticuerpos indeseables (por ejemplo contra eritrocitos, plaquetas, proteínas séricas, o células B) son removidos mediante absorciones apropiadas en el proceso de purificación del SAL (23).

En el hombre, la reacción del injerto contra el huésped (IVH) es uno de los principales problemas que se presentan después de un trasplante de médula ósea. Los estudios previos en animales, han indicado que el SAL puede prevenir esta actividad. Se ha observado que al pretratar una médula ósea donadora con SAL se puede prevenir el rechazo del injerto contra el huésped aún habiendo incompatibilidad en el HLA (18). La inoculación de globulina antilinfocítica o SAL puede retrasar el rechazo de trasplantes incompatibles por varios meses (21). Estas observaciones sugieren que si se eliminan las células T maduras de la médula ósea se podría prevenir o dis-

minuir la intensidad del IVH en el paciente transplantado de médula ósea (38). Después de suspender el tratamiento con SAL, las células T circulantes son rápidamente restauradas, y los trasplantes pueden prolongarse por largos períodos de tiempo con un tratamiento adicional de drogas inmunosupresoras (38).

Por otro lado investigadores como Amare, M. A. (1), Monaco, A. P. (23), Stuart, R. K. (29), Kirkpatrick, D. (21) y Camitta, B. (5), han evaluado el tratamiento inmunosupresor en pacientes con anemia aplásica, padecimiento en el que hay una alteración hematológica caracterizada por anemia, neutropenia y trombocitopenia en sangre periférica con médula ósea hipocelular (14). El defecto probablemente se encuentre en la célula primitiva (stem cell), la cual quizá solo está disminuída en número, o bien presenta alteración en su reproducción o interferencia en el mecanismo de diferenciación a las distintas células hematológicas, el caso típico de anemia aplásica muestra marcada pancitopenia en sangre periférica y médula ósea, aunque persista un reducido cúmulo de tejido hematopoyético, ya que la aplasia total es incompatible con la vida. Esta patología puede ser congénita o adquirida (14).

El tratamiento de esta entidad con el SAL o la globulina

antitimocito a producido resultados alentadores en estudios preliminares, dado que en algunos casos se habla incluso de una recuperación total (5,7,21), así mismo, cuando en este padecimiento existe la evidencia de hiperactividad de células T supresoras el tratamiento con estos antisueros puede ofrecer un mejor pronóstico en el trasplante de médula ósea ---- (1).

Actualmente existen programas de trasplantes cardiacos donde se utiliza el SAL o la globulina antitimocito para mantener el injerto, o durante las crisis iniciales del rechazo y con ello deprimir las células T circulantes del receptor -- (26). Su empleo como agente inmunosupresor también se ha indicado en pacientes sometidos a trasplantes de corazón, - hígado, riñón, piel y médula ósea (23,36).

II OBJETIVOS

En el presente estudio, realizado en el Hospital General del Centro Médico la Raza, damos los primeros pasos para llevar a cabo la obtención de un suero antilinfocito T de humano en conejos, con el fin primordial de ayudar a evitar el rechazo de halotransplantes de médula ósea, en el tratamiento de la anemia aplásica, padecimiento en el que datos indirectos indican que es más frecuente en ciertos países de Latinoamérica incluyendo entre otros el nuestro. (14).

Para lograr tal propósito se fijaron los siguientes objetivos:

- 1.- Obtención de linfocitos T.
- 2.- Evaluación de la pureza de los linfocitos.
- 3.- Preservación del antígeno (linfocitos T).
- 4.- Obtención del suero.
- 5.- Analisis del suero obtenido.

III MATERIALES Y METODOS

1) Preparación de soluciones.

1.1 Solución de Hanks.

Preparado comercial pH 7.4, que contiene NaCl, KH_2PO_4 , - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glucosa, CaCl_2 , rojo de fenol. Amortiguador-Tris.

1.2 Azul Tripán 0.25% en solución Hanks.

1.3 Solución amortiguador - tris NH_4Cl .

Se preparó mezclando una solución de amortiguador-tris 2.06%, pH 7.2-7.4, con una solución de cloruro de amonio al - 0.83%.

1.4 Ficoll hypaque.

Esta solución se preparó mezclando ficoll 9% e hypaque al 34%, en una proporción de 1:10.

1.5 MEM (Medio Mínimo Escencial EAGLE).

Preparado comercial que contiene aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas.

1.6 Medio 199.

Preparado comercial que contiene aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas.

2) Criterio de Viabilidad.

Se colocaron células con azul de tripan al 0.25% se dejó actuar de 3 a 4 minutos y se realizó el conteo de las células coloreadas de azul por exclusión del colorante (células muertas), sobre una cámara de Neubauer.

3) Obtención del antígeno.

3.1 Timocitos.

Los timos se obtuvieron de autopsias de niños menores de cuatro años procurando que el desceso hubiera ocurrido con — seis horas.

El timo se cortó, maceró y tamizó a través de una malla número cincuenta de acero inoxidable, la suspensión obtenida se estratificó en gradiente de ficoll-hypaque densidad de — 1.076-1.078 en relación 3:1, se centrifugó (Centrifuga Damos FEC División, IEC PR-J) por treinta minutos a 1500 revoluciones por minuto a una temperatura de 10-12°C. Se obtuvieron — timocitos de la interfase lavándose con solución de Hanks libre de Ca^{++} y Mg^{++} realizándose el conteo de células (36).

3.2 Linfocitos.

Se partió de muestras de sangre venosa mayores a 10 ml. de donadores sanos utilizando 10 microlitros de heparina por 1 ml. de sangre total. Se lavó la muestra tres veces con solución de Hanks a 500 rpm por 10 minutos y se diluyó con un volumen igual de esta misma solución. La muestra diluída se estratificó en un gradiente de ficoll-hypaque de la interfase se obtuvieron los linfocitos, que se lavaron tres veces con solución de Hanks a 1000 rpm, y posteriormente fueron resuspendidos en medio de cultivo MEM y contados.

4) Purificación de linfocitos.

4.1 Formación de rosetas.

4.1.1. Sensibilización de eritrocitos con complemento y hemolisina.

Los eritrocitos se lavaron de 3 a 4 veces con solución de Hanks, se ajustaron al 5%, 24 ml. de eritrocitos ajustados se sensibilizaron con 0.1 ml. de hemolisina, se incubaron a 37°C/1 hr. transcurrido este tiempo se lavaron tres veces. Posteriormente se les adicionó complemento de humano (diluído 1:100) en proporción 1:1 y se llevó a incubación a ———

37°C/20min. se volvieron a lavar y finalmente se ajustaron al 1%.

4.1.2. Sensibilización de eritrocitos con neuraminidasa.

A 5 ml. de eritrocitos de carnero lavados y ajustados al 5% se les adicionó 0.5ml. de neuraminidasa (1U/ml) y se incubaron a 37°C/60min. con agitación frecuente, después del tiempo de incubación se lavaron tres veces con solución de Hanks y finalmente se ajustaron al 1%.

4.1.3. Rosetas E y EAC (doble gradiente).

Se separaron y se ajustaron los linfocitos a una concentración de 4×10^6 cel/ml. se llevó a cabo la formación de rosetas E. Se incubaron volúmenes iguales de linfocitos y de eritrocitos pretratados con neuraminidasa al 1% (12); se centrifugó ligeramente e incubó 15 minutos a 37°C y 2 horas en hielo. Los botones obtenidos se resuspendieron suavemente se colocaron en gradiente de ficoll-hypaque para recuperar las células formadoras de rosetas E. Los botones obtenidos se resuspendieron vigorosamente y los eritrocitos de carnero fueron lizados con una solución amortiguadora-tris de NH_4Cl (12).

Las células obtenidas se ajustaron de 4×10^6 cel/ml.

Se incubaron 0.25 ml. de esta suspensión con 0.25 ml. de eritrocitos de carnero al 1% (sensibilizados con hemolisina y complemento de humano) a 37°C por 15 minutos.

Posteriormente se efectuó un nuevo gradiente con ficoll-hypaque recuperando los linfocitos T puros de la interfase. - Se lavaron, contaron y se determinó su viabilidad.

4.2. Columna de Nylon.

Para esto se utilizaron columnas de plástico de aproximadamente 9.5cm. de largo y 0.6cm. de diámetro y fibra de nylon previamente tratada de la siguiente manera; se lavó con HCl 1N tres veces, de igual forma con NaOH 1 N. La alcalinidad del nylon fué eliminada lavándose con agua destilada, las veces necesarias hasta que el pH del último lavado fuera igual al del agua. Las columnas fueron incubadas con medio MEM a 37°C por treinta minutos en estufa de incubación (National - Welnick Company), previamente a su uso. Las células ajustadas a 150×10^6 Cel/ml. fueron depositadas en las columnas e incubadas por 45 minutos a 37°C conteniendo suero fetal de ternera al 5%. Los linfocitos T se recuperaron del eluido, los B se obtuvieron lavando la columna y presionándola vigorosamente, agregando al mismo tiempo medio MEM a 4°C con suero fetal de ternera al 0.5% (2,15,16,31).

5) Criopreservación de células.

Las células lavadas y ajustadas de $2a6 \times 10^6$ cel/ml. en medio MEM se congelaron mediante el siguiente proceso; La suspensión de linfocitos mantenida en baño de hielo fué mezclada con un volumen igual de medio MEM, conteniendo 20% de dimetil sulfóxido (Sigma) y suero fetal de ternera al 5%. Posteriormente se congeló hasta menos 70°C (Congelador Revco) (17,12,20,26).

6) Descongelación.

La descongelación se llevó a cabo gradualmente hasta alcanzar la temperatura ambiente, la suspensión celular fué diluída 1:10 con medio MEM. Las células se lavaron dos veces con solución de Hanks, determinando su viabilidad y ajustando 5×10^6 cel/ml. (17,12).

7) Prueba para determinar la pureza de los linfocitos.

7.1 Rosetas E.

La suspensión de células se evaluó después de ser descongeladas. Las células T fueron identificadas por la capacidad

de formar rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero.

El procedimiento para lograr la formación de rosetas E - es el que a continuación se describe:

A 0.25 ml. de linfocitos T ajustados de 4×10^6 cel/ml. en solución de Hanks, se le adicionó 0.25 ml. de eritrocitos de carnero al 1%.

Después de una incubación a 37°C por 15 minutos y centrifugación ligera, los tubos se incubaron durante dos horas en hielo. Las células se resuspendieron suavemente y se contó el número de rosetas formadas. Se colocó entre cubre y porta objetos una gota de la suspensión celular, se dejó sedimentar por 1 a 2 minutos y se leyó en microscopio óptico. Se contaron hasta 200 células considerando rosetas y no rosetas bajo el criterio de que cada célula se considera formadora de rosetas si tenía al menos 3 eritrocitos pegados a la célula (12).

7.2 Rosetas EAC.

Para esta prueba los eritrocitos ajustados en solución de Hanks al 1% fueron sensibilizados con hemolisina y complemento humano.

A 0.25 ml. de linfocitos ajustados de 4×10^6 cel/ml. - se les adicionó 0.25 ml. de eritrocitos al 1% con complemento

de humano y hemolisina, la suspensión se incubó a 37°C por quince minutos. Las rosetas se contaron como se mencionó anteriormente (12).

7.3 Microcitotoxicidad, mediada por anticuerpos.

Para esta prueba se empleó la técnica de Terasaki modificada (32), se usó suero antiglobulina humana para la prueba de Coombs (Ortho Diagnostica Lote 1124816) y S&L control de suero positivo para pruebas de citotoxicidad (Behringmerks - AG, Marburg lote 029703D).

Se prepararon placas de microcitotoxicidad, las cuales contienen 72 excavaciones en 12 hileras con seis pozos cada una fig. 1.

Las placas fueron cubiertas con aceite mineral para evitar la desecación de los reactivos aplicados subsecuentemente.

A cada una de las excavaciones se les adicionó 1 microlitro de linfocitos ajustados 2×10^6 cel./ml. y en cada hilera se aplicó los reactivos enmarcados en la tabla I.

Los resultados se evaluaron al microscopio por el criterio de exclusion de azul de tripan como se puede observar en la tabla II.

PLACA DE MICROFITOTOXICIDAD

		número de pozos.					
hileras	A	B	C	D	E	F	
1	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	
11	0	0	0	0	0	0	
12	0	0	0	0	0	0	

FIGURA 1. Representa una placa de microcitotoxicidad la cual -- consta de 72 pozos, en hileras -- de seis pozos cada una.

TABLA I. PLACA DE MICROCITOTOXICIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS PARA DETERMINAR PUREZA DE LINPOCITOS.

Nº Hileras	Células	MEM C/Suero 50%	Coombs	SAL	Complemento	Azul Tripán.
1 y 7	1 μ l	2 μ l	-	-	-	10 μ l
2 y 8	1 μ l	-	-	-	5 μ l	10 μ l
3 y 9	1 μ l	-	2 μ l	-	-	10 μ l
4 y 10	1 μ l	-	-	2 μ l	-	10 μ l
5 y 11	1 μ l	-	2 μ l	-	5 μ l	10 μ l
6 y 12	1 μ l	-	-	2 μ l	5 μ l	10 μ l

Incubar 1 hora 37°C

Incubar 30 min. 37°C

Incubar la min. a temperatura ambiente.

En esta tabla se representan las cantidades y reactivos utilizados para la prueba de microcitotoxicidad mediada por anticuerpos, así como los tiempos de incubación.

TABLA II. INTERPRETACION DE LAS PLACAS DE MICROCITOTOXICIDAD

0 - 10	% de mortalidad		1
11 - 20	%	"	2
21 - 40	%	"	4
41 - 80	%	"	6
81 - 100	%	"	8

En esta tabla se enmarcaron los parámetros tomados, para la interpretación de las placas de microcitotoxicidad.

8) Inmunización de animales.

Dos conejos de 2.5 kilos y seis meses de edad recibieron tres inyecciones subcutáneas de 10^9 linfocitos, con un intervalo de catorce días entre cada inyección. La primera inmunización fué con adyuvante completo de Freund, y las dos inmunizaciones posteriores fueron con adyuvante incompleto.

Después de cada inmunización se evaluó el suero de ambos conejos mediante pruebas de fijación de complemento, linfomicrocitotoxicidad e inhibición de la formación de rosetas espontáneas (9).

Una semana después de completar la inmunización el antisuero fué obtenido por punción cardiaca. El suero de ambos animales se mezcló e inactivó a 56°C por una hora (8,19).

9) Valoración de la especificidad del antisuero obtenido y título.

9.1 Fijación de complemento.

En esta prueba, se utilizó como control el suero de los dos conejos antes de ser inmunizados, (X y Z) el suero después de la segunda inmunización y la gamaglobulina hiperinmune (suero purificado).

La fijación de complemento ocurre durante la interacción del antígeno y del anticuerpo. Por lo tanto, el consumo de complemento in-vitro puede ser usado como una prueba para identificar y medir anticuerpos. La prueba depende de un sistema de reacciones en dos etapas. En la etapa inicial, el antígeno y el anticuerpo reaccionan en presencia de una cantidad conocida de complemento y el complemento es consumido. En la segunda etapa, la actividad hemolítica del complemento es medida para determinar la cantidad de complemento fijado y, por lo tanto, el título de anticuerpos. Los resultados se expresan como la dilución más alta del suero que muestra fijación.

9.2 Microcitotoxicidad mediada por anticuerpos.

Se llevó a cabo la técnica de Terasaki, mencionada en el inciso 7.3 y en ésta, las placas fueron montadas según la tabla No. III.

9.3 Inhibición en la formación de rosetas E.

Esta determinación se realizó siguiendo básicamente la técnica de rosetas E con las modificaciones que se indican a continuación: Se ajustó una suspensión de linfocitos totales $4-5 \times 10^6$ cel/ml. en medio 199 adicionado con 50% de suero -

TABLE III. PLACA DE MICROFITOTOXICIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS; EVALUACION DEL DEL SUERO OBTENIDO.

Nº Hileras	Células	MEM C/Suero 50%	Suero	SAL	Complemento	Azul Tripan.
1 y 7	1 μ l	2 μ l	-	-	-	10 μ l
2 y 8	1 μ l	-	-	-	5 μ l	10 μ l
3 y 9	1 μ l	-	2 μ l	-	-	10 μ l
4 y 10	1 μ l	-	-	2 μ l	-	10 μ l
5 y 11	1 μ l	-	2 μ l	-	5 μ l	10 μ l
6 y 12	1 μ l	-	-	2 μ l	5 μ l	10 μ l

Incubar 1 hora 37°C

Incubar 30 min. 37°C

Incubar 10 min. a temperatura ambiente.

En esta tabla se representan las cantidades y reactivos utilizados para la prueba de microcitotoxicidad mediada por anticuerpos, así como los tiempos de incubación.

fetal de ternera, se utilizaron 20 μ l. para cada una de las pruebas, más 100 μ l. de suero (anticuerpos contra linfocitos) incubando por 16 hrs. a 4°C. Después de la incubación se lavó la suspensión y se le adicionaron 20 μ l. de eritrocitos de carnero, se incubó dos horas en hielo, después se centrifugaron a 1000 rpm por dos minutos, se resuspendieron suavemente y se contaron.

Esta prueba se llevó a cabo con linfocitos viables (96, 98%). Para cada uno de los sueros se elaboraron cinco pruebas. Los resultados se reportan como porciento de inhibición en la formación de rosetas (3).

10) Análisis estadístico.

El estudio estadístico realizado en este trabajo fué mediante la distribución t de Student y la distribución F, en ambos casos se utilizó el nivel de significación de $\alpha = 5\%$, --- (30).

IV RESULTADOS

Obtención y purificación del antígeno.

Para la obtención del antígeno, se llevaron a cabo tres etapas, el de la obtención de timocitos (proceso 3.1) así - como el de linfocitos (procesos 4.1 y 4.2); los valores encontrados para cada caso se encuentran en las tablas IV, V y VI.

En el caso de los timocitos (tabla IV) encontramos que la cantidad y viabilidad al final de cada timo procesado fué, en términos generales, muy bajo considerando la cantidad requerida para cada inmunización. Por esto se trató de obtener la mayor separación de linfocitos T a partir de sangre periférica; en éste caso se efectuó la formación de rosetas E y EAC (tabla V), o sea el doble gradiente y la separación mediante columnas de nylon (tabla VI).

Tabla IV. Lotes de células obtenidas a partir de timo.

^a lote	timocitos	Viabilidad
A1	1.6×10^6 cel/ml	20%
A2	2.6×10^6 cel/ml	60%
A3	1.8×10^6 cel/ml	80%
A4	5.0×10^6 cel/ml	40%
A5	2.7×10^6 cel/ml	61%

^a criterio al azar.

En esta tabla se representa la cantidad de células y viabilidad de éstas obtenidas a partir del proceso 3.1

Tabla V. Lotes de linfocitos obtenidos por Rosetas

lote	linfocitos	viabilidad
1	4.3×10^6 cel/ml	60%
2	6×10^6 cel/ml	80%
3	3.7×10^6 cel/ml	80%
4	19.5×10^6 cel/ml	90%
5	3.7×10^6 cel/ml	90%
6	13.0×10^6 cel/ml	80%
7	15.1×10^6 cel/ml	90%

a criterio al azar.

Representación de la cantidad de células obtenidas a partir de la purificación por formación de rosetas (doble gradiente) proceso -- 4.1

Tabla VI. Linfocitos T obtenidos por columnas de nylon

lote	linfocitos	viabilidad
A	627 x 10 ⁶ cel/ml	93%
B	874 x 10 ⁶ cel/ml	92%
C	1287 x 10 ⁶ cel/ml	89%
D	14220 x 10 ⁶ cel/ml	96%
E	328 x 10 ⁶ cel/ml	87%
F	705 x 10 ⁶ cel/ml	94%
G	1608 x 10 ⁶ cel/ml	94%
H	1623 x 10 ⁶ cel/ml	88%
I	1611 x 10 ⁶ cel/ml	92%
J	1674 x 10 ⁶ cel/ml	88%
K	202 x 10 ⁶ cel/ml	92%
L	1023 x 10 ⁶ cel/ml	93%
M	705 x 10 ⁶ cel/ml	96%
N	608 x 10 ⁶ cel/ml	94%
Ñ	623 x 10 ⁶ cel/ml	88%
O	1611 x 10 ⁶ cel/ml	92%

Aquí se representa la cantidad de linfocitos y viabilidad de éstos obtenidos a partir del proceso 4.2

Pruebas para determinar la pureza de los linfocitos.

La pureza de los linfocitos obtenidos por los métodos 4.1 y 4.2, se valoró en las poblaciones respectivas, probando su capacidad de formar rosetas E (tablas VII y VIII) y rosetas EAC (tablas IX y X), se montaron también placas de microcitotoxicidad de los lotes obtenidos por el proceso 4.1 y 4.2.

Estas pruebas se llevaron a cabo ajustando en cada caso a la cantidad de células mencionada en la metodología.

Para cada lote de linfocitos se realizaron rosetas E, EAC y placas de microcitotoxicidad (procesos 7.1, 7.2 y 7.3 respectivamente). Los valores control reportados en las rosetas se efectuaron con linfocitos totales.

Los lotes se trataron por triplicado y están representados en las tablas como, número de pruebas 1, 2 y 3.

Placas de Microcitotoxicidad.

Se probaron los lotes obtenidos por el proceso 4.1 y proceso 4.2, en cada caso se valoró la viabilidad y se ajustaron los linfocitos a 4×10^6 cel/ml. Los resultados se representan en las tablas XI y XII

Tabla VII. Formación de rosetas E para determinar pureza de linfocitos.

	número de pruebas			\bar{x}
	1	2	3	
Control	80	83	78	80
lote				
1	85	85	80	83
2	87	80	80	82
3	86	85	86	86
4	80	85	85	83
5	85	90	90	88
6	88	87	88	88
7	85	85	86	85

En esta tabla se representan los resultados en % obtenidos en la prueba de formación de rosetas E para los lotes de linfocitos purificados por el proceso 4.1

Tabla VIII. Formación de rosetas E para determinar pureza de linfocitos.

	número de pruebas			\bar{X}
	1	2	3	
Control	77	80	80	79
lote				
A	79	83	86	83
B	82	81	84	82
C	82	81	82	82
D	85	80	80	82
E	81	82	85	83
F	80	83	86	83
G	84	83	86	84
H	87	83	86	85
I	86	80	84	83
J	84	82	85	84
K	87	87	87	85
L	79	82	78	80
M	81	87	84	84
N	79	81	80	80
N	84	83	83	83
O	82	81	80	81

En esta tabla se representan los resultados en % de las pruebas de formación de rosetas E, para los lotes de linfocitos obtenidos por el proceso 4.2

Tabla IX. Formación de rosetas EAC para determinar pureza de linfocitos.

	número de pruebas			\bar{X}
	1	2	3	
Control	30	28	31	30
lote				
1	12	10	12	11
2	11	11	12	11
3	12	11	13	12
4	13	14	11	12
5	15	15	14	15
6	10	10	14	11
7	12	12	12	12

En esta tabla se representan los resultados en % obtenidos en la prueba de formación de rosetas EAC para los lotes de linfocitos purificados por el proceso 4.1

Tabla X. Formación de rosetas EAC para determinar pureza de linfocitos.

	número de pruebas			\bar{X}
	1	2	3	
Control	28	28	30	29
lote				
A	22	14	20	19
B	18	11	13	14
C	10	12	10	11
D	16	12	11	13
E	10	14	20	15
F	10	9	9	9
G	13	10	8	10
H	9	10	10	10
I	11	12	9	11
J	10	8	8	9
K	15	12	11	13
L	11	8	13	11
M	15	12	11	13
N	14	10	11	12
N	11	12	15	13
O	12	10	11	11

En esta tabla se representan los resultados en % obtenidos en la prueba de formación de rosetas EAC para los lotes de linfocitos purificados por el proceso 4.2

Tabla XI. Resultados obtenidos en las pruebas de microcitotoxicidad mediada por anticuerpos.

\bar{X} de la mortalidad de células N° de Hileras						
Lote	1 y 7	2 y 8	3 y 9	4 y 10	5 y 11	6 y 12
A	1	1	2	1	4	8
B	1	1	1	1	4	8
C	1	1	1	1	4	8
D	1	1	1	1	4	8
E	1	1	2	1	4	8
F	1	1	2	1	4	8
G	1	1	2	1	4	8
H	1	1	2	1	4	8
I	1	1	2	1	4	8
J	1	1	1	1	4	8
K	1	1	1	1	4	8
L	1	1	1	1	4	8
M	1	1	1	1	4	8
N	1	1	1	1	4	8
N	1	1	1	1	4	8
O	1	1	2	1	4	8

En esta tabla se representa la media de los resultados obtenidos, en la determinación de pureza de los linfocitos purificados por el proceso 4.2. Como ya se mencionó en la tabla I para cada lote se realizaron 12 pruebas. - La interpretación de los resultados se realizó como se indica en la tabla II.

Tabla XII. Resultados obtenidos en las pruebas de microcito-
toxicidad mediada por anticuerpos, para determi-
nar pureza de linfocitos T.

\bar{X} de la mortalidad de células						
Nº de Hileras						
Lote	1 y 7	2 y 8	3 y 9	4 y 10	5 y 11	6 y 12
1	1	1	1	1	2	7
2	1	1	1	1	2	8
3	1	1	1	1	2	8
4	1	1	1	1	2	8
5	1	1	1	1	2	8
6	1	1	1	1	2	8
7	1	1	1	1	2	8

En esta tabla se representa la media de los resultados obtenidos, en la determinación de pureza de linfocitos purificados por el proceso 4.1. Como ya se mencionó en la tabla I para cada lote se realizaron 12 pruebas. La interpretación de los resultados se realizó como se indica en la tabla II.

Descongelación de células.

Los linfocitos humanos pueden ser criopreservados para llevar a cabo pruebas de inmunidad celular in-vitro. Para lograr esto es muy importante la concentración del agente criopreservante (DMSO dimetil sulfoxido), temperatura y la velocidad de dilución. Los estudios reportados en la literatura indican que la función de los linfocitos es mantenida durante la criopreservación (20,35).

En nuestro estudio es de gran importancia la criopreservación de los linfocitos, para reducir la producción de anticuerpos contaminantes.

A continuación anotamos los datos encontrados de los linfocitos una vez descongelados. Se reporta el número de lote, la cantidad y la viabilidad de los mismos tabla XIII.

Los datos de esta tabla fueron obtenidos después de efectuar varios procesos de descongelación, encontrando como óptimo, en las condiciones de nuestro laboratorio el que aquí hemos descrito.

Tabla XIII. Descongelación de células.

Lote	Linfocitos en cel/ml.	Viabilidad porcentual.
A	11.4×10^6	82
B	6.2×10^6	83
C	6.5×10^6	80
D	6.4×10^6	88
E	6.8×10^6	83
F	7.7×10^6	88
G	6.8×10^6	87
H	6.8×10^6	80
I	4.7×10^6	88
J	2.8×10^6	86
K	7.6×10^6	88
L	6.2×10^6	85
M	6.2×10^6	88
N	7.6×10^6	83
N	10.4×10^6	80
O	6.5×10^6	88

En esta tabla se reporta el número de lote, la cantidad de linfocitos y la viabilidad de los mismos una vez descongelados.

Valoración del suero obtenido.

A lo largo del protocolo de inmunización y al término -- del mismo se efectuaron procesos de fijación de complemento - microcitotoxicidad e inhibición de rosetas E para valorar la producción de anticuerpos.

Fijación de complemento (9.1).

Esta prueba se llevó a cabo para los sueros de los conejos antes de ser inmunizados (conejos X y Z), y finalmente de la gama globulina purificada. Los resultados pueden verse en la tabla XIV.

Microcitotoxicidad mediada por anticuerpos (proceso 9.2).

En ésta se probaron los sueros antes de inmunizar (X y Z), después de la inmunización inicial (X_1 y Z_1), de la -- segunda inmunización (X_2 y Z_2) y del suero purificado del -- cual se montaron 24 pruebas.

En cada caso se ajustaron las células de 2 a 4×10^6 --- cel/ml. y su viabilidad fué mayor al 95%. Los resultados pue den verse en la tabla XV.

Tabla XIV. Resultados obtenidos en la prueba de Fijación de Complemento

Suero	Título del suero
X	0
Z	0
X ₁	1:40
Z ₁	1:40
X ₂	1:160
Z ₂	1:320
Gamma globulina purificada	1:640
Título de la hemolisina	1:10
Título del complemento	1:30

En esta tabla se reporta los resultados de la prueba de fijación de complemento, para los sueros obtenidos durante el proceso de inmunización. Así como el título de la Gamma Globulina purificada y la concentración de hemolisina y complemento utilizados en la prueba.

Tabla XV. Valoración de los sueros obtenidos durante el proceso de inmunización; por microcitotoxicidad mediada por anticuerpos.

\bar{X} de la mortalidad de células N° de Hileras						
Suero	1 y 7	2 y 8	3 y 9	4 y 10	5 y 11	6 y 12
X	1	1	1	1	4	8
Z	1	1	1	1	1	8
X ₁	1	1	1	1	2	8
Z ₁	1	1	1	1	5	8
X ₂	1	1	1	1	7	8
Z ₂	1	1	1	1	8	7
Gamma globulina purificada	1	1	1	1	8	8

En esta tabla se reporta la media de los resultados obtenidos en la prueba de microcitotoxicidad mediada por anticuerpos, para los sueros obtenidos durante el proceso de inmunización. Por cada suero se realizaron 12 pruebas. Para la gamma globulina hiperinmune purificada 24 pruebas. La interpretación de los resultados se realizó como se indica en la tabla II.

Por los resultados obtenidos en las rosetas E y EAC se puede decir que con cualquier de los dos procesos usados el grado de pureza (linfocitos T libres de B) es practicamente similar, sin embargo se hace notar que a partir del proceso 4.1(tabla V) la cantidad final de linfocitos es significativamente menor a la encontrada en el proceso 4.2 (tabla VI).

En el caso de la placas montadas se encontraron valores indicativos de que la obtención con mayor grado de pureza de linfocitos T, es mediante el proceso 4.1; a este respecto señalamos tener mayor confiabilidad en los datos de rosetas E y EAC dado que en estos últimos el conteo efectuado es más riguroso.

Inhibición de rosetas E (9.3).

Esta prueba se realizó con los sueros de los conejos X y Z sin inmunizar (sueros testigos), con los sueros obtenidos de la primera inmunización (X_1 y Z_1), con los de la segunda inmunización (X_2 y Z_2) y finalmente con el suero purificado (gamma globulina hiperinmune purificada, de ambos conejos) de éste último se realizaron 16 pruebas.

En el caso del control para los sueros X y Z de los conejos sin inmunizar, se incubaron los linfocitos con suero nor-

mal de humano; para el control de los sueros de las inmunizaciones posteriores y de la gamma globulina hiperinmune purificada, se incubaron con el suero testigo. Los resultados se muestran en las tablas XVI, XVII, XVIII y XIX.

Tabla XVI. Prueba de inhibición en la formación de Rosetas E

	Número de pruebas					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
Control	78	78	76	80	82	79
Suero X	74	72	69	79	81	75
Suero Z	75	62	78	80	82	75

Resultados obtenidos en la prueba de la inhibición en la formación de rosetas E en %, para los sueros - X y Z.

Tabla XVII. Prueba de inhibición en la formación de Rosetas E.

	Número de pruebas					\bar{x}
	1	2	3	4	5	
Control	82	80	83	79	80	80
Suero X ₁	70	72	70	68	68	70
Suero Z ₁	65	67	68	60	64	65

Resultados obtenidos en la prueba de inhibición en la formación de rosetas E en %, para los sueros obtenidos después de la primera inmunización.

Tabla XVIII. Prueba de inhibición de la formación de Rosetas E.

	Número de pruebas					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
Control	82	80	78	80	81	80
Suero X ₂	0	2	2	0	0	1
Suero Z ₂	0	0	0	0	1	0

Resultados obtenidos en la prueba de inhibición en la formación de Rosetas E en %, para los sueros obtenidos después de la segunda inmunización.

Tabla XIX. Prueba de inhibición de la formación de Rosetas E

	Número de pruebas					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
Control	80	79	81	83	80	81
Gamma	0	0	0	0	0	
globulina.	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	

Resultados obtenidos en la prueba de inhibición en la formación de rosetas E en %, para la Gamma Globulina Hiperimmune purificada.

V DISCUSION.

Para la preparación del SAL se partió de la obtención -- del antígeno a partir de tres procesos distintos (3.1,4.1, - 4.2) cuyos resultados se representan en las tablas IV, V, VI.

Analizando los datos de éstas podemos ver que en cuanto a cantidad hay una marcada variabilidad de proceso a proceso, así como diferencias significativas en la viabilidad. En el caso de las células obtenidas a partir de timo (Tabla IV) - hay un bajo rendimiento de células y de viabilidad entre lote y lote, lo cual posiblemente se debió a que la recepción de - timos después de la defunción nunca fué en un lapso de tiempo estándar así mismo, no descartamos la posibilidad debida a - pérdidas durante el procesamiento del órgano.

Por la serie de problemas presentados hasta este momento y por la baja disponibilidad del timo, se buscó la posibili-- dad de obtener el antígeno por otros métodos, encontrándose - que se podía obtener a partir de sangre periférica.

Los métodos encontrados para la purificación de linfocitos T fueron mediante doble gradiente, y por columnas de ---- nylon (16,15) reportándose el primero como óptimo por el --

grado de pureza que de él se obtiene.

En cuanto a los resultados reportados en la tabla V, encontramos una alta viabilidad y un bajo rendimiento de linfocitos, esto último considerándose la cantidad necesaria de células para llevar a cabo el proceso de inmunización. Durante la obtención del antígeno por este proceso, se requirió de material cuyo costo excedía las posibilidades del laboratorio; así mismo, no había disponibilidad de los reactivos en el país.

Se procedió a trabajar con la metodología de las columnas de nylon. Los resultados obtenidos en cuanto a cantidad, viabilidad y tiempo de procesamiento fueron satisfactorios en comparación con los anteriores, además de costeable en el laboratorio.

De acuerdo al análisis estadístico de los resultados obtenidos por los procesos 4.1 y 4.2 (tablas V y VI) podemos ver que hay una diferencia significativa, en cuanto a la cantidad de linfocitos obtenidos. Utilizando la distribución F, con $\alpha = 5\%$ encontramos que el proceso 4.2 da un mayor rendimiento en cuanto a la cantidad de células (tabla VI). Para corroborar estos resultados se realizó otro tratamiento estadístico, mediante la distribución t Student ($\alpha = 5\%$) obteniéndose resultados similares.

Para los resultados de viabilidad obtenidos en cada proceso se efectuaron análisis estadísticos similares, para saber si había alguna diferencia significativa de viabilidad de un proceso a otro, al final de su tratamiento encontramos que mediante el proceso 4.2, la viabilidad de las células es mayor que en el 4.1 (tablas V y VI).

El paso siguiente fué comprobar la pureza de los linfocitos obtenidos, para ello se efectuaron pruebas de formación de rosetas E y EAC, y placas de microcitotoxicidad cuyos resultados se reportan en las tablas VII, VIII, IX, X, XI, y XII.

Para las rosetas E no encontramos, mediante el correspondiente tratamiento estadístico (distribución F con $\alpha = 5\%$), ninguna variación cuantitativa en la formación de rosetas de proceso a proceso, ni de lote a lote.

En relación a la prueba de formación de rosetas EAC, encontramos que hay diferencias entre los dos procesos en cuanto a la formación de las mismas. Al tratar estadísticamente y por separado a cada proceso las rosetas obtenidas de las células purificadas por columna de nylon, si presentaron variabilidad en cuanto a la formación de dichas rosetas de lote a lote, a diferencia de los linfocitos obtenidos por el proceso de doble gradiente.

conocer la respuesta de los animales hacia el antígeno, se procedió a valorar la presencia de anticuerpos en las sangrías previas a las inmunizaciones inicial y subsecuente. Para ésto se hicieron pruebas de fijación de complemento, inhibición de la formación de rosetas E, y se montaron placas de microcitotoxicidad.

Los resultados de la prueba de fijación de complemento (tabla XIV) son indicativos de un aumento gradual de la presencia de anticuerpos. Así mismo pueden apreciarse similares resultados con las placas de microcitotoxicidad (tabla XV) en donde la mortalidad de las células va en aumento conforme se prosiguió con las inmunizaciones.

Durante la prueba de la inhibición en la formación de rosetas E, se presentó una disminución en la formación de las mismas conforme se siguió con el protocolo de inmunización (Tablas XVI, XVII, XVIII y XIX).

Todas estas pruebas dieron por separado resultados confirmativos de la producción de anticuerpos contra linfocitos.

VI CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos, las conclusiones a que se llegaron en este trabajo fueron las siguientes:

- 1.- El método de purificación de linfocitos por doble gradiente de densidad resultó mejor que el de columna de nylon.
- 2.- El proceso de criopreservación de linfocitos utilizado resultó ser óptimo.
- 3.- El suero antilinfocito T no resultó ser tan específico como se esperaba.

VII BIBLIOGRAFIA.

1.- Amare, M., Abdou, N.L., Robinson, G. M. 1978. Aplastic - anemia associated with bone marrow supressor T-cell hyperactivity: successful treatment with antithymocyte globulin. Am. J. Hematol. 5 (1): 25-32.

2.- Bentwich, Z., Douglas, Skutelsky, E., and Kunkel, H.G. -- 1973 Sheep red cell binding to human lymphocytes treated with neuraminidase; enhacement of T cell binding and identification of a subpopulation of B cells. The Journal of Experimental Medicine. 137: 1532-1537.

3.- Bieber, C.P., Howard, F.D., Pennock, J. 1981. Preparation, characterization, and primate testing of monoclonal antithymocyte globulin. Transplantation. 31 (4): 283-288.

4.- Brown A. Barbara. 1976. Técnicas de laboratorio en hematología. Editorial Elicien. p9-10.

5.- Camitta, B., O'Reilly, R.J., Sensenbrenner, L., Rapoport, J., Champlin, R. 1982. Severe aplastic anemia: a controlled - trial of antilymphocyte globulin therapy. Blood. 60 (1): - 165a.

6.- Cremer Gavey. 1977. Methods in Immunology.
Editorial W.A. Benjamin, INC. p20-22, 218-219. 18, 36-39.

7.- Champlin, R., Wiston, J., Feig, S.A., and Gale, R.P. 1983. -- Antithymocyte globulin treatment for aplastic: a controlled - randomized trial and comparison with marrow transplantation. Transplantation proceedings. XV (1): 595-598.

8.- Davis, C.R., Sidney R.C., J.A.M.D., Mannick, M.D. 1969. Preparation and in vitro assay of effective and ineffective - antilymphocyte sera. Surgery. 66 (1): 58-64.

9.- Dubernard, J.M., Rifle, G., Bonneau, M., Touraine, J.L., Revillard, P.J., Traeger, J. 1974. Antimacaque Thymocyte glo bulins. Transplantation. 18 (1): 71-73.

10.- Farreras P. Valenti y Ciril Rozman. 1972. Medicina interna. Editorial Marin S. A., Tomo II p 1150.

11.- Foon, A. K., Fitchen, H.J., Billing, J.C. 1980. An Anti-thymocyte serum noncytotoxic to myeloid progenitor cells: candidate serum for prevention of graft-versus-host disease in bone marrow transplantation. Clinical immunology and immunopathology. 16: 416-422.

12.- Friedman Herman, Rose N. R. 1976. Manual of clinical Immunology. Edited by American Society for Microbiology. p 82-83, 142, 143, 833-840.

13.- Fudenberg H. Hugh, Cadwell Joseph, Stites P. Daniel, Wells Vivian. 1982. Inmunología Clínica. Editorial el Manual Moderno, Tercera edición. p 824.

14.- González Romero Constance. 1982. Tratado de Medicina Práctica. Primera serie. Editado por Cristina Oyhanarte O. 474-479.

15.- Gorodezky Clara, Castro Escobar Lilia. 1982. Manual de práctica del Primer Curso Teórico-práctico de Actualización en Histocompatibilidad. SSA Laboratorio de Investigaciones - del ISET.

16.- Handwerker, S. B., Schwartz, H. R. 1974. Separation of murine lymphoid cells using nylon wool columns. Transplantation. 18 (6): 544-548.

17.- Harada, M., Chizuko, I., and Kenichi, H. 1978. Viability of T lymphocytes survived in frozen-thawed human bone marrow. Transplantation. 25 (4): 204-207.

18.- Harada, M., Galer, P. R. 1982. Evaluation of antithymocyte globulin for human bone marrow transplantation. Transplantation. 33 (6): 625-630.

19.- Isakovic, K., Mitrovic, K., Markovic, B.M., Rajcevic, M. and Jankovic, B.D. 1975. Preparation of Specific antithymocyte and anti-bursocyte sera in rabbits. Journal of Immunological Methods. 7: 359-370.

20.- Jewett, M., Gupta, S., Hansen, J. A., Cunningham, S. R., Siegal, F. P., Dupont. 1976, The use of cryopreserved lymphocytes for longitudinal studies of immune function and enumeration of subpopulation. Clin. exp. Immunol. 25: 449-454.

21.- Kirkpatrick, D., Dinsmore, R., Kapoor, N., Gulati, S., - Flomemberg, N., Condie, R., O'Reilly, R. 1982. Initial ----- trials of Minnesota antithymocyte globulin in the treatment of severe aplastic anemia. Blood. 60 (1): 169a.

22.- McDermott, R.P., and Stacey, M.C. 1981. Further characterization of the human autologous mixed leukocyte reaction. Journal of Immunology. 126 (2): 729-733.

23.- Monaco, A.P., Campion, J.P., and Kapnick, S.J. 1977. --- Antilymphocyte globulins. Transplantation Proceedings. IX (1): 1007-1017.

24.- Mookerjee, B.K., Azzolina, L., and Poulter, L. 1974. In teraction antithymocyte serum with cells system hematopoietic Journal of Immunology. 11 (2): 822-829.

25.- Pellegrino, M.A., Belvedere, M., Pellegrino, G.A., ---
Ferrone, S. 1978. B Peripheral lymphocytes express more HLA
antigens than T peripheral lymphocytes. Transplantation. 25
(2): 93-95.

26.- Ritts, R.E., Leduc, P.V., Ruiz, A.A., Jacobsen D.A., ---
Bradley, A.L. Preparation and studies on mayo clinic rabbit
anti-human thymocyte gamma globulin (RATG).

27.- Simpson, E., Taleshi, M. 1979. Physiological function -
of major histocompatibility complex macromolecules. Transplan-
tion. 27 (5): 295-297.

28.- Smith, R.W., James, N.W. 1974. Potencia inmunosupresiva
del suero antilinfocito, a la actividad contra antigenos espe-
cíficos de linfocitos tímicos humanos. Transplantation. 17 -
(5): 503-507.

29.- Stuart, R.K., Sensenbrenner, L.L., and Santos, G.W. 1982.
Severe aplastic anemia (SAA): comparison of bone marrow ---
transplantation with antilymphocyte globulin (ALG). Blood
60 (1): 173a.

- 30.- Taro Yamane. Estadística.
1982. Editorial Karla. Tercera edición. p 771.
- 31.- Terasaki Paul I.
Profesor of surgery UCLA tissue Typing Lab. 1000 Veteran Ave.
- 32.- Terasaki, P.I., McClelland, D., Park, M.S., and McCurdy, B. 1973. Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. Manual of tissue typing techniques. p 54-61.
- 33.- Thomas, M.J., Carver, F.M., Haisch, C.E., Fahrenbruch, - G., Deepe, R.M., and Thomas, F.T. 1982. Suppressor cells in rhesus monkeys treated with antithymocyte globulin. Trans---plantation. 34 (2): 83-89.
- 34.- Uittenbogart C.H., Robinson, J.B., Malekzadeh, M.H., --- Pennisi J.A. 1979. Use of antithymocyte globulin (dose by - rosette protocol) in pediatric renal allograft recipients. Transplantation. 28 (4): 291-293.

35.- Watson James D. 1978. Biología Molecular del Gen.
Editorial Fondo Educativo Interamericano. Tercera edición
p 739.

36.- Weiner Roys. 1976. Cryopreservation of lymphocytes for
use in vitro assays of cellular immunity. Journal of immuno-
logical Methods. 10 : 49-60.

37.- Wechter, W.J., Nelson, J.J., Ferper, J. R., Parcels, J.
A., Satch, S. P., and Howard Ko. 1979. Manufacture of Antithy-
mocyte globulin for clinical trials. Transplantation. 28 (4):
303-307.

38.- Zola H. 1977. Preparation of antisera with specificity
for human T lymphocytes. Transplantation. 23 (3):222-229.