

11
20



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
C U A U T I T L A N

**“Busqueda In Vitro de la Actividad en la
Formación de Rosetas EA (para RFC) y
EAC (para RC3) en Linfocitos, Monocitos
y Granulocitos de Sangre Periferica en
Personas Sanas“**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

RENE DAMIAN SANTOS

Director: Dr. Mario Gutiérrez Romero

Cuautitlán Izcalli Edo. de México

1987



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.

ABREVIATURAS

CFU= Unidad Formadora de Colonia.	Xi = Marca de Clase
IgG= Inmunoglobulina G	I.C. = Intervalo de Confianza
IgM= Inmunoglobulina M	S = Desviación Standart
IgA= Inmunoglobulina A	PBS= Solución Amortiguadora de Fosfato
IgE= Inmunoglobulina E	
IgGs = Plural de Inmunoglobulina G	
IgS = Inmunoglobulina de Superficie	
Ag = Antígeno	
Ab = Anticuerpo	
C3 = 3er. factor del complemento	
Fc = Fragmento Cristalizable	
PMN = Polimorfonucleares	
EDTA = Acido Etilen Diamino Tetracético	
Ig = Inmunoglobulina	
ADCC = Citotoxicidad Mediada por Células Dependiente de Anticuerpo	
Células NK = Células Asesinas Naturales	
Células K = Células Asesinas	
Rosetas E = Rosetas Eritrocíticas	
Rosetas EA = Rosetas Eritrocito-Anticuerpo	
Rosetas EAC = Rosetas Eritrocito-Anticuerpo-Complemento	
ml = mililitro	
\bar{X} = Media Aritmética	

INDICE

I. - INTRODUCCION.....	1
II. - RECONOCIMIENTO DE CELULAS QUE PARTICIPAN EN LA FAGOCITOSIS Y LA RESPUESTA INMUNE A TRAVES DE RECEPTORES Fc Y C3.....	3
- Linfocitos polimorfonucleares.....	4
- Fagocitos mononucleares.....	4
III. -FAGOCITOSIS INMUNOLOGICA.....	4
IV. - LINFOCITOS.....	6
- Linfocito T.....	7
-Linfocito B.....	8
-Monocitos.....	11
-Granulocitos.....	12
-Células NK.....	14
-Células K.....	15
V. -CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES....	16
- Receptores para la fracción Fc de la IgG.....	16
- Receptores para el C3 del complemento.....	18
VI. - METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE LOS RECEPTORES. 22	
- Identificación de receptores para el fragmento Fc de las IgGs..	22
- Identificación de receptores para el complemento.....	23
VII. -OBJETIVOS.....	26
VIII. -MATERIAL Y METODOS.....	27

- Obtención de muestras y separación de células.....	27
- Viabilidad celular.....	28
- Sensibilización de eritrocitos de carnero para la identificación del fragmento C3 del complemento (rosetas EAC).....	28
- Sensibilización de eritrocitos de bovino para la identificación del fragmento Fc de IgG (rosetas EA).....	29
- Determinación de rosetas EAC para evaluar el receptor para el fragmento C3 del complemento.....	29
- Determinación de rosetas EA para evaluar el receptor para el fragmento Fc de IgG.....	30
IX. -RESULTADOS.....	31
X. -DISCUSION.....	48
XI. -CONCLUSIONES.....	51
XII. - BIBLIOGRAFIA.....	52

INTRODUCCION

Todas las células de la sangre, incluyendo granulocitos, monocitos, células plasmáticas, linfocitos y fibroblastos de médula, parecen formarse en la propia médula ósea a partir de una célula precursora común llamada célula primitiva pluripotencial ó unidad formadora de colonia (CFU).

Se piensa que ésta célula puede duplicarse para mantener un conjunto constante de células primitivas y también es capaz de diferenciarse dependiendo del estímulo en linfoide y mieloide, ésta última a su vez es capaz de dar una serie específica de células hematopoyéticas, por ejemplo, eritroide, megacariocítica y granulocítica-macrófago.

Son muchos los datos que parecen demostrar que el linfocito "no es una célula terminal" irreversible como el granulocito, sino más bien una célula que conserva potencialidades para diferenciación ulterior. (2)

Inmunológicamente se reconocen el linfocito B y linfocito T, el primero origina la célula plasmática y es la destinada a formar anticuerpos e interviene en la Inmunidad Humoral, a los linfocitos T les corresponde la resistencia a las infecciones virales, rechazo de injerto, la hipersensibilidad retardada y la inmunidad contra el cancer. (3)

Los granulocitos, células fagocíticas y móviles, constituyen la principal defensa del cuerpo contra infecciones bacterianas por medio del mecanismo de fagocitosis.

Los monocitos son células fagocíticas probablemente relacionadas con los macrófagos de los tejidos, funcionan en la defensa corporal contra

las infecciones sobre todo en la formación de granulomas y en la eliminación de tejido lesionado, también interviene en reacciones inmunes, probablemente transformando el antígeno para activar una respuesta por el linfocito.

(1-5)

-RECONOCIMIENTO DE CELULAS QUE PARTICIPAN EN LA FAGOCITOSIS Y LA RESPUESTA INMUNE A TRAVES DE RECEPTORES Fc Y C3.

Por primera vez, hace un siglo se postuló que en los invertebrados las células amiboideas fagocitaban, lo cual constituye un mecanismo de defensa, se observó que las células denominadas macrófagos tenían la capacidad de ingerir y destruir a los microorganismos patógenos, resultando correcta la hipótesis de que los macrófagos y sus precursores, los monocitos de la sangre, han demostrado no sólo ser importantes durante la defensa contra los microorganismos, sino además son partes importantes en otros procesos inmunológicos, como es la sensibilización de linfocitos, la regulación de las respuestas de los linfocitos y la resistencia a las células tumorales, a este proceso se le denominó posteriormente FAGOCITOSIS. (5, 6, 7, 8)

Cuando se inician los mecanismos de defensa local, se ponen en juego eventos que están directamente relacionados con la actividad de dos tipos de células fagocíticas: a) leucocitos polimorfonucleares y b) fagocitos mononucleares, denominados ambos como "fagocitos profesionales", debido a que sus membranas citoplasmáticas tienen receptores especializados para la porción Fc de las moléculas de IgG3 e IgG1 y para el fragmento C3 activado del complemento. La presencia de estos receptores hace que aumente el proceso de fagocitosis, ayudando así a la ingestión de microorganismos que tienen IgG ó C3 activado sobre su membrana celular. (12, 43, 44)

Las células fagocíticas "no profesionales" ó facultativas incluyen a

las células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y otras células que ingieren microorganismos en condiciones especiales, pero no poseen receptores especializados de membrana para IgG ó C3. (5, 7)

a). - LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES. - Estas células pueden ser de 3 variedades; neutrofilos, eosinofilos y basofilos, siendo los primeros que intervienen principalmente en la fagocitosis, son las células que se encuentran en mayor cantidad en el torrente sanguíneo, tienen una vida media de aproximadamente 7 días en circulación, no se dividen, contienen gránulos de enzima hidrolíticas, tienen la facultad de poder emigrar a los sitios de inflamación y son de gran importancia durante las infecciones agudas.

(1, 2)

b). - FAGOCITOS MONONUCLEARES. - Estas células derivan de los promonocitos de la médula ósea y posteriormente se diferencian a monocitos, acumulándose también en los sitios de inflamación. (1, 2)

Estos 2 tipos de células son capaces de reconocer e ingerir partículas, dicho reconocimiento se lleva a cabo mediante la unión de éstas a compuestos solubles en el suero y posteriormente a receptores presentes en la membrana celular. La digestión es por la acción de enzimas hidrolíticas presentes en el citoplasma celular. (5, 6, 43)

FAGOCITOSIS INMUNOLOGICA

En general este proceso mediado por receptores para el fragmento Fc de IgG ó para el componente C3 del complemento, se lleva a cabo por los

fagocitos en 4 fases: quimioraxis, opzonización, ingestión y destrucción.

El fagocito puede reconocer partículas extrañas a él siempre que estén recubiertas por una molécula para la cual presenta un receptor llamándose a este recubrimiento OPSONIZACIÓN, una vez rodeado la partícula por la opsonina puede ser reconocida por los receptores de la superficie de la membrana, a la cual se une, llevándose a cabo un cierre de la membrana para dar lugar a la formación de una vesícula dentro del citoplasma celular, llamado fagosoma, (con la formación de ésta, gran parte de los receptores que actuaron en el reconocimiento regresan a la membrana plasmática, aproximadamente de 24 a 64 hrs mas tarde), estos fagosomas se fusionan con los lisosomas presentes para dar lugar a los fagolisosomas, dentro de los cuales la partícula ingerida es destruída al llevarse a cabo la hidrólisis enzimática, actuando además varios factores como son el pH debido a la producción de ácido láctico, enzimas proteolíticas e hidrolíticas, lisozimas, sustancias bacteriostáticas como la lactoferrinas y polipéptidos catiónicos, así como la mieloperoxidasa. (5, 6, 23, 43)

El constituyente termoestable es una inmunoglobulina de la clase IgG específicamente de la sub-clase IgG1 e IgG3, las porciones Fc de esta molécula son reconocidas por las células fagocíticas debido a que presentan en su membrana celular receptores específicos para el fragmento Fc de dicha IgG. Se sabe que aproximadamente de un 75 a un 90 % de los neutrófilos circulantes en sangre périca presentan éstos receptores, aunque la unión de los complejos Ag-Ab a dichas células, formadas por partículas cubiertas con

inmunoglobulinas depende de la integridad de la región Fc de tales moléculas. (5, 7, 11) Además de que éstos receptores pueden ser modificados durante la inflamación y en ciertos estados patológicos. (13, 44)

Por otro lado el factor de opsonización termolábil se atribuye principalmente a un fragmento del tercer componente del complemento (C3). El rompimiento del fragmento C3 como consecuencia de la activación de la vía del complemento, ya sea la clásica ó la alterna, produce dos fragmento C3a y C3b, siendo el más grande el C3b, e inmediatamente después de que es generado es capaz de fijarse a la superficie de las células u otras partículas como bacterias y hongos. (5, 11, 22, 44)

El fragmento C3b facilita que los leucocitos fagocíticos reconozcan a las partículas a la cuales se fija y sirve como mediador para la adherencia de las partículas a las células al unirse a los receptores específicos presentes en ellas. (11, 22)

LINFOCITOS

Son importantes estas células debido a su participación en la respuesta inmune, y las vías en las cuales pueden determinar las respuestas del huésped.

Al igual que para los macrófagos y PMN, las características de la superficie celular de los linfocitos determinan la vía por la cual son reconocidos materiales extraños y la vía en la que la respuesta inmune pueda responder de mejor manera a dichos materiales. (6, 11, 15)

Los linfocitos están compuestos por poblaciones heterogéneas de células y como consecuencia cada una de éstas poblaciones muestran funciones diferentes. En los humanos existen dos poblaciones de linfocitos en general: Linfocito T y Linfocito B. (1, 2, 6)

LINFOCITO T. - Son producidos en médula ósea y posteriormente pasan al timo, órgano en el cual adquieren las características superficiales de la célula, por lo que su función se hace diferente de los demás linfocitos, posteriormente pasan a los tejidos linfoides secundarios y se concentran en mayor cantidad en la región periarterial de la pulpa blanca del bazo. Están constituidas por 3 subpoblaciones: linfocito T supresor, linfocito T cooperador y linfocito T citotóxico. (1, 6, 42)

Los linfocitos T en general juegan un papel importante en las funciones de la respuesta inmune celular (hipersensibilidad), teniendo que ver con la respuesta inmune de organismos facultativos, tejido de órgano injertado ó ciertas acciones virales. (5, 6)

Una propiedad única de los linfocitos T humanos es la capacidad de formar rosetas con células rojas sanguíneas de carnero, dependiendo del método puede haber una gran variación en el porcentaje de linfocitos que forman rosetas; el aumento en el tiempo de incubación así como la disminución de la temperatura de incubación, el tratamiento con neuraminidasa aumenta el porcentaje de células formadoras de rosetas; la formación de rosetas con eritrocitos de carnero (rosetas E) requieren de iones bivalentes y pueden ser bloqueados por el uso de EDTA, también pueden ser bloqueados por enzimas proteolíticas.

ticas, drogas adrenérgicas y colinérgicas, corticoides y sueros antilinfocíticos. Se ha demostrado que sólo las células vivas forman rosetas E y que este receptor se forma a través de un proceso metabólico activo. (15, 20)

Wilson y col. en 1983, reportaron haber encontrado linfocito T con receptores para C3b los cuales fueron identificados por la fracción f(ab')₂ de conejo anti-C3b sensibilizados con isotiocianato de tetrametilrodamina y complejo con anti f(ab')₂ de conejo para teñir los linfocitos formadores de rosetas E. El 97 % de los linfocitos T que soportan receptores para la fracción C3b del complemento también fueron capaces de unir agregados IgG. lo cual indica la presencia de receptores Fc para IgG en éstas células.

Los linfocitos T que expresan los receptores C3b tuvieron un gran núcleo y citoplasma con rebordes finos basófilos. Esto indica que este receptor se encuentra presente en el linfocito con características determinadas. (16)

LINFOCITO B. - Son producidos en la médula ósea, posteriormente pasan a la bursa ó bolsa de Fabricio en aves ó de su equivalencia en los mamíferos, pueden diferenciarse eventualmente en células plasmáticas productoras de anticuerpos y responsables de la inmunidad humoral. Estas células son conocidas como linfocitos B (células bolsa dependiente ó célula médula ósea dependiente) siendo las células plasmáticas la forma extrema de la diferenciación, están relacionadas con la inmunidad humoral, ya que producen anticuerpos (ab) específicos que sirven como receptores para antígenos (Ag). (5, 6, 42)

Se ha demostrado que existen receptores específicos para la porción Fc de moléculas de IgG, tanto en los linfocitos B, como en los linfocitos T

así como en macrófagos, estos se han identificado por su capacidad de unión a la región Fc de moléculas de inmunoglobulinas agregadas ó que forman complejos con el antígeno (Ag). (11, 15, 44)

Además en ciertas subpoblaciones de linfocito B, T, monocitos y granulocitos existen moléculas receptoras capaces de unirse a determinado componente del complemento, en especial el C3b y C3d. (6, 11, 44)

A partir de estos estudios, se ha podido demostrar que la mayoría de los linfocitos B tienen un receptor para los complejos Ag-Ab ó inmunoglobulinas agregadas, este receptor es específico para un sitio de la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina, además se ha demostrado un receptor para el componente C3 del complemento (5, 42). Muchos linfocitos T de sangre periférica tienen la facultad de formar rosetas con eritrocitos de carnero, siendo utilizado este marcador para la identificación de linfocitos T, muchas de éstas células tienen también receptores de membrana para la porción Fc de IgG y de IgM. (10, 20, 42)

Los receptores Ag específicos de las células T y B son esenciales en la generación de la respuesta inmune específica y puede ser requerida para la distribución de Ag a través del huesped. (11)

Los linfocitos B y T pueden diferenciarse por su aspecto cuando se observan al microscopio electrónico, ya que las células T muestran una superficie lisa, mientras que las células B están cubiertas con microvellosidades, en el laboratorio las células T y B se identifican fácilmente por la presencia

ó ausencia de marcadores de superficie. (38)

Las células B se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas ligadas a la membrana (IgS), la cual se determina con antisuero heterólogo ó específico contra un tipo de cadena, marcadas con fluoresceína; por esta técnica 15 a 30% de las células de sangre periférica se han identificado como linfocito B. El uso de antisuero específico contra las inmunoglobulinas individuales ha proporcionado la posibilidad de identificar las clases de inmunoglobulinas de superficie que existen en los B, siendo que se expresan con mayor frecuencia en condiciones normales IgM, IgG e IgA, y en menor la IgD, las cuales son muy escasas. Existen diversos reportes respecto a la frecuencia con que se presentan estas inmunoglobulinas en los linfocitos B y en algunos casos se da la IgM como la más abundante, mientras que en otras se reporta la IgG. Las razones para estas discrepancias en los diferentes estudios no están claros aún, pero puede depender de la diferencia de los marcadores fluorescentes usados. (1, 5, 9, 11, 38)

El receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas es otro marcador de superficie de linfocito B, este receptor fue usado para diferenciar linfocito B de T, ya que se considera exclusivo de aquellos, pero en años recientes también se ha demostrado en una población considerable de linfocito T, así como en células no B no T. Se ha sugerido que la función de este receptor es participar en cierta forma de citotoxicidad mediada por linfocito B, (1, 4, 5, 9, 15, 17, 20, 31, 32, 35 -41), también se ha demostrado que un poco más de

la mitad de las células Ig^+ portan receptores de complemento, este receptor no es una sola especie molecular, y así se ha detectado receptor para C3b, C3bi, C3d, C4 y C1q, estos receptores son diferentes a los receptores para Fc(16), la función de este receptor en linfocitos B parece ser la de estimular la proliferación y diferenciación de esta célula plasmática. (1, 4, 5, 9, 16, 38, 41)

MONOCITOS

Esta célula es un leucocito fagocitario que se encuentra en la sangre de los vertebrados, se distingue fácilmente de otras células sanguíneas por ser la de mayor tamaño (17-20 μ) y posee un núcleo oval endido en su porción media, después de abandonar la sangre y entrar en los tejidos, los monocitos se transforman en macrófagos y se tornan fagocíticos. (1)

El sistema monocito-macrófago no es una célula en su etapa final y por lo tanto sus propiedades y funciones son más variadas y complejas que los demás fagocitos. El macrófago sobrevive más tiempo en los tejidos que los neutrófilos, es capaz de dividirse y transformarse, y puede ser estimulado para sintetizar diferentes enzimas y otras sustancias de acuerdo con las necesidades del momento. (1, 9, 11)

Es un hecho conocido desde hace tiempo que la ingestión de partículas por los fagocitos se incrementa por la presencia de factores séricos, anti - cuerpos específicos, anticuerpos naturales y quizás por otros factores .

Los monocitos tienen receptores en la membrana plásmática para el

reconocimiento de IgG₁ e IgG₃ y para el tercer componente del complemento, teniendo estos la función de participar en los procesos de fagocitosis. Además de tener una activa liberación de proteínas que están involucradas en los procesos inmunes. (1, 5, 11, 34)

Los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobinas presentes en los monocitos son de naturaleza glicoproteica con un peso molecular de 60,000 a 68,000. (11, 17)

GRANULOCITOS

Los eosinófilos circulantes comprenden de 2 a 5 % de los leucocitos de la sangre periférica poseen un diámetro de 12 μ y morfológicamente se caracterizan por sus gránulos que se tiñen de rojo amarillento con el colorante de Wright. Los gránulos eosinófilos son considerablemente más grande que los gránulos neutrófilos, están compuestos de una proteína básica que contiene zinc y peroxidasa, pero carecen de fosfatasa alcalina, lisosoma y proteínas bactericidas. la actividad principal de los eosinófilos es la defensa contra los parásitos, durante la cual aumentan sus receptores con el objeto de acelerar la destrucción del parásito. Los eosinófilos tienen potencia fagocitaria que ingiere complejo Ag-Ab y además desempeña un papel importante en los fenómenos alérgicos. (1, 5, 9) Los eosinófilos poseen receptores para Fc de IgG. (4)

Los basófilos se caracterizan por tener gránulos ovals electrodenos que contienen compuestos biológicamente activos incluyendo a la heparina y la histamina, los basófilos portan receptores que ligan la porción Fc de las

inmunoglobulinas IgE, hay de cien mil a un millón de sitios receptores por célula y es univalente (1), éstos receptores están relacionados con el desencadenamiento de la liberación de la histamina después de la interacción de las inmunoglobulinas con el antígeno específico, los basófilos son células blancas para la inmunoglobulina E en la anafilaxia y en los fenómenos alérgicos, estas células también poseen receptores para el tercer factor del complemento. (1, 5, 9)

Los neutrófilos son las células que se encuentran de un 60 a un 70% de los leucocitos circulantes en el humano, tienen un diámetro de 10 a 20 ~~μ~~ y su núcleo poseen de 3 a 5 lóbulos con hilo de cromatina. El neutrófilo maduro es primordialmente una célula fagocitaria con dos tipos de gránulos; los gránulos azurófilos contienen hidrolasas ácidas, peroxidasa y lisosomas, los gránulos específicos contienen lactoferrinas, algo de lisozimas y fosfatasa alcalina.

El neutrófilo es capaz de fijar e ingerir materiales apropiadamente opsonizados una vez localizado en los tejidos, en virtud de portar receptor para Fc y C3. Los neutrófilos son capaces de emigrar hacia el estímulo (QUIMIO-TAXIS) en presencia de numerosos factores quimiotácticos, incluyendo productos bacterianos, proteasas de los tejidos y componentes del complemento. (1, 2, 3, 5, 9)

Los neutrófilos poseen receptores para la inmunoglobulina G1, G2, G3, G4 y para la IgA, carecen de receptores para la inmunoglobulina M, D y E.

(4)

Los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas presentes en los neutrófilos son de naturaleza glicoproteica, con un peso molecular de 52,000 a 58,000 (11, 17). Los neutrófilos no únicamente reconocen partículas recubiertas con fragmento del complemento (C3) ó de IgG (Fc), ni el reconocimiento se lleva a cabo únicamente por los receptores de membrana estructuralmente específica, si no que además existen otros tipos no inmunológicos como son; receptores hormonales, factor estimulador de colonias, linfocinas (factor inhibidor de la migración), insulina, lactoferrinas, transferrinas, receptor para lipoproteínas, etc.

Por lo tanto, el término receptor puede significar la capacidad de los neutrófilos para reconocer y ser activados por una molécula en particular. (5)

De lo anterior podemos decir que los receptores que fijan la porción Fc de las inmunoglobulinas y el componente C3 del complemento dotan a los fagocitos de su capacidad para reconocer partículas opsonizadas, acelerando así la velocidad de captación de dichas partículas y por lo tanto el proceso de fagocitosis, esto se ha podido demostrar al poner en contacto neutrófilos con partículas inertes de latex de poliestireno, en ausencia total de opsoninas como C3b ó IgG. (5, 13)

CELULAS NK

Estas células carecen de inmunoglobulinas de superficie ó del receptor C3, poseen receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y contienen concentraciones extremadamente bajas de antígeno marcador de célula T, es-

tas células "asesinas naturales" (NK) se han encontrado en el bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y sangre, no muestran actividad fagocítica y no se adhieren a la lana ó al vidrio, es por eso que carecen de las características de los linfocitos T, los linfocitos B ó los macrófagos. Las células NK pueden distinguirse funcionalmente de las células K, ya que la actividad NK no depende de la presencia de actividad de anticuerpos y no es inhibida por la presencia de complejo antígeno-anticuerpo. Esta célula se caracteriza por su capacidad de lisar a una extensa variedad de tipos celulares especialmente linfomas y otras células tumorales inespecíficamente. (5, 24, 37)

CELULAS K

Las células K juegan un papel importante en la destrucción de células tumorales recubiertas con anticuerpo "in vivo". Estas células K son linfocitos que carecen de los marcadores característicos de los linfocitos T y B, se encuentran en tejidos linfoides y sangre, soportan receptores para Fc y actúan como células efectoras en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). La citotoxicidad requiere un contacto íntimo celular (efectora-célula blanco), esta interacción es facilitada por la unión de las células efectora a la porción Fc de la inmunoglobulina, la cual está adherida a las células blanco por su porción F(ab). El proceso lítico desencadenado puede ser bloqueado por la presencia de complejos inmunitarios, por agregados de inmunoglobulinas y por la proteína A unida a la porción Fc de la IgG específica. (5, 10, 37, 40, 41)

-CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS RECEPTORES-

(RECEPTORES PARA LA FRACCION Fc DE LA IgG)

Ha sido demostrado en diferentes células mononucleares incluyendo a los monocitos, macrófagos y linfocitos, de entre las células linfoides, las células B, las células T y una tercera clase de células que a menudo se les refiere como "células nulas" (19), la naturaleza del receptor para la porción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas no está entendido por completo pero parece ser una proteína ó glicoproteína que es resistente a la tripsina y sensible a las proteasas y distintas de las moléculas de inmunoglobulinas sintetizadas por las células plasmáticas. (11, 17, 31)

En la actualidad se reconocen por lo menos 4 clases de receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas. (5, 6)

a). - Un receptor sensible a las proteínas que es capaz de unirse a los monómeros de los complejos de IgG de ciertas subclases, en humano IgG1 e IgG3; en ratón IgG2a; en cobayos IgG2, los anticuerpos que fijan a este receptor son citofílicos, es decir, que se unen primero con el macrófago y posteriormente interactúan con el antígeno (Ag).

b). - Un receptor resistente a las proteínas que se fija y actúa como mediador de la fagocitosis de complejos Ag-Ab ó de agregados de subclases de inmunoglobulinas, en humano IgG2 e IgG4.

c). - Un receptor para la fracción Fc, resistente a las proteínas que se usa para IgG3 en ratón.

d). - Además los neutrófilos tienen un receptor que se une específicamente a la IgE. (5, 11, 22, 44)

El receptor Fc se ha demostrado en subpoblaciones de linfocito T (11, 37, 39, 40), una de sus funciones es la participación en cierta forma de citotoxicidad; en polimorfonucleares y macrófagos (1, 5, 11, 17, 31), en los que participan en los procesos de fagocitosis en células K (5, 35, 37, 40), responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos; y recientemente se identificó en células NK (5, 24), en las que produce un aumento de la citotoxicidad natural, se ha encontrado que la mayor parte de la citotoxicidad natural la poseen la células que portan el receptor Fc. (24)

Se han identificado diversos receptores para la porción Fc de las diferentes clases de IgG, en los distintos tipos de células.

En monocitos humanos, linfocitos B, linfocitos no-B y no-T, se han encontrado los receptores Fc, también en una subpoblación de linfocitos T, en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, la fagocitosis de partículas opsonizadas y en la regulación de la respuesta inmune, el receptor Fc parece tener un papel importante. (5, 31)

Se ha determinado el peso molecular de el receptor Fc en varios tipos celulares, en los monocitos tiene un peso molecular de 60,000 a 68,000, en linfocitos no-B de 52,000 a 58,000 y en los linfocitos B es de 43,000. (31)

También se han reportado haber determinado el número de receptores Fc en macrófagos siendo de 6.5×10^5 receptor por célula, de naturaleza proteica y con un peso molecular de 45,000 a 70,000. (17)

En el linfocito T y B, basófilo y célula cebada se ha determinado este tipo de receptor; se ha observado que los linfocitos T que soportan este receptor aumenta cuando se presentan condiciones de una elevación de IgE.

Otro receptor Fc_M se ha detectado en células T cooperadoras y el Fc_Y en células T supresoras. Igualmente, se ha determinado un pequeño grupo de linfocitos T que soportan receptores para Fc_Y y Fc_E . (32)

(RECEPTOR PARA EL C3 DEL COMPLEMENTO)

Los receptores del complemento son independientes de los receptores para el fragmento Fc de IgG, los receptores para el C3 son más efectivos para medir la fijación que para medir la ingestión (22), existen por lo menos 3 receptores del complemento sobre las células fagocíticas en el humano, cobayo y ratón.

- a). - Receptor específico para el fragmento C3d.
- b). - Receptor específico para el fragmento C3b.
- c). - Receptor quimiotáctico para los fagocitos mononucleares y probablemente para los granulocitos. (5)

Los receptores que se presentan para el complemento en los linfocitos son de 2 tipos, el C1 y el C2, el primero detecta la paret C4b y el segundo detecta el C3d, éstos dos tipos de receptores para el complemento son estructuralmente diferentes y se encuentran localizados por separado dentro de la membrana linfocitaria.

El receptor C1 está distribuido en los eritrocitos, granulocitos y

monocitos, el receptor C2 sólo en los monocitos. Los granulocitos y macrófagos poseen un tercer tipo de receptor de complemento el C3 que es diferente del receptor C2 del linfocito, los linfocitos B expresan los receptores C1 y C2, mientras que únicamente el receptor C1 se expresa en la tercera población de linfocitos, los linfocitos T supresores y T cooperadores parece ser que no expresan el receptor de complemento en su superficie, pero el receptor de complemento ha sido descrito en ciertos linfocitos que forman rosetas E.

Muchos investigadores han ensayado con el receptor de complemento utilizando eritrocitos de carnero recubiertos con Ab de la clase IgM de conejo contra eritrocitos de carnero y complemento no lítico de humano ó ratón, el suero fresco de ratón deficiente de C5 es la fuente más común de complemento para esta prueba, es importante que la IgM este purificada para sensibilizar a los eritrocitos, puesto que los eritrocitos cubiertos con anticuerpo (Ab) de la clase IgG pueden unirse a los receptores Fc de los linfocitos, los eritrocitos humanos no deben emplearse para preparar ensayo de (EAC), eritrocito-anticuerpo-complemento, debido a que existen la presencia del receptor de complemento C1 en su superficie. Cuando se emplean eritrocitos de carnero, la incubación se lleva a cabo a 37°C, para prevenir la formación de rosetas E con los linfocitos T, se deben utilizar controles de preparación de rosetas E y EA. (11, 12)

El peso molecular del receptor C3 es de 250,000, siendo de naturaleza proteica, ha sido demostrado en linfocitos T, linfocitos B, monocitos,

polimorfonucleares y en células K (1, 5, 11, 16, 33, 36, 39, 41)

La porción C3 se deposita en las células como C3b el cual subsecuentemente es transformado por el factor I para formar C3bi sin reducción del peso molecular, el C3bi se convierte a C3d por remoción enzimática del fragmento C3c. Los 3 fragmentos unidos a las células aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, el C3bi y el C3d aumentan la reacción mucho más fuertemente que el C3b(25). La existencia de receptores para éstos 3 fragmentos ha sido determinada en diferentes tipos celulares. El receptor C3b está presente en eritrocitos, linfocitos, polimorfonucleares y monocitos; y reacciona con la molécula intacta de C3b. El receptor C3d está presente sobre linfocitos pero no sobre polimorfonucleares ó monocitos; el receptor C3bi se encuentra sobre polimorfonucleares y monocitos humanos.

La distribución de los receptores C3b en los linfocitos de sangre periférica humana no es homogénea, ya que los linfocitos que presentan receptor C3b son distintos a los que presentan C3bi y/o C3d (25). Las células que presentan receptores C3bi y C3d parecen ser células T. (16, 25)

En macrófagos y polimorfonucleares intervienen en los procesos de fagocitosis, lo cual se ha comparado al observar que los antígenos son fagocitados más eficientemente en presencia de inmunoglobulinas y complemento. (1)

La función de este receptor es diferente en los diversos tipos de cé-

ulas; en células B se ha sugerido que este receptor tiene la función de estimular la proliferación y diferenciación de la misma, así como la de interactuar con los antígenos de superficie de células T (11). Recientemente se demostró que aproximadamente el 40% de las células efectoras que participan en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos tiene receptores para C3b (25), también en linfocitos T en los cuales el 97% de las células con receptores Fc tienen también receptores para C3b (de 14 a 18% de los linfocitos identificados como T). (16)

Las células que presentan receptores C3 inducen la liberación de linfotoxinas, lo que aumenta la citotoxicidad de los linfocitos por mejoramiento del contacto célula blanco-célula efectora. (16, 25)

Para ambos receptores (Fc y C3) se ha podido identificar que son moléculas glicoproteicas y que la parte proteica está embebida en la membrana plasmática, quedando hacia el exterior la parte glucosídica, siendo ésta la lleva el reconocimiento específico para las moléculas que serán fagocitadas. (17, 43)

-METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE LOS RECEPTORES-

Por medio de la técnica de formación de rosetas se descubrieron inicialmente 4 receptores de la membrana citoplasmática.

- a). - Un receptor para glóbulos rojos de carnero.
- b). - Un receptor para componentes del complemento (C3d y C3b).
- c). - Un receptor para inmunoglobulinas de superficie.
- d). - Un receptor para el fragmento Fc de moléculas de anticuerpo.

Mediante la técnica de rosetas ó mediante técnica de inmunofluorescencia se inició una gran cantidad de trabajos experimentales con el fin de definir clase y posteriormente subclase de linfocitos en sangre periférica y órganos linfoides. Teniendo como objetivo la búsqueda de alteraciones patológicas. (4, 10, 42)

-IDENTIFICACION DE RECEPTORES PARA EL FRAGMENTO Fc DE LAS IgGs-

Los métodos más comunes para la identificación de los receptores Fc para la IgG son la de formación de rosetas empleando un anticuerpo humano sensibilizado, de borrego ó complejo anticuerpo-eritrocito(EA) y técnicas inmunofluorescentes utilizando agregados de IgG caliente de naturaleza y origen humano. Los receptores para la IgG pueden también ser demostrados por una proteína A fluoresceinada del *Staphylococcus* ó por el uso de complejo de inmunoglobulinas anti peroxidasa peroxidasa. La literatura acerca de los receptores Fc de la IgG sugiere que no es una prueba sencilla siempre y cuando las condiciones sean óptimas para la demostración de todos los recep-

tores Fc de la IgG. (10, 11, 12, 15, 21, 24)

Los receptores Fc pueden ser demostrados utilizando diferentes clases de ligando y diferentes métodos de detección. La unión de complejos antígeno-anticuerpo y la IgG agregada a los receptores Fc tanto para los linfocitos B y T, han sido demostrado mediante la utilización de técnicas como autorradiografía ó de fluorescencia. El agregado de la IgG preferentemente se une a los receptores Fc presentes en las células B, otro método ampliamente utilizado para la detección del receptor Fc se fundamenta en la formación de rosetas "EA" (eritrocito-anticuerpo) con hematíes sensibilizados con anticuerpo IgG antieritrocíticos a concentraciones no aglutinantes.

Los hematíes de borrego han sido especialmente útiles debido a su pobre aglutinabilidad aún en presencia de cantidades relativamente grandes de anticuerpo.

La técnica de formación de rosetas ofrece una mayor ventaja comparada con otros métodos ya que las rosetas pueden ser fácilmente aisladas de las células no formadoras de rosetas en los gradientes de densidad. (5, 10, 12, 29, 32, 45, 47, 48)

-IDENTIFICACION DE RECEPTORES PARA EL COMPLEMENTO-

Muchas células poseen en su membrana receptores para determinado factor del complemento, en especial para el C3b, C4b, y quizás el C1q. Estos receptores pueden evidenciarse mediante la formación de rosetas "EAC" (eritrocito-anticuerpo-complemento) con hematíes recubiertos con anticuerpo

IgM antieritrocitario y complemento a concentraciones no hemolíticas.

Otra forma de identificar a los receptores del complemento ha incluido el uso de cámara de ZYMOSAN (un extracto polisacárido obtenido de la pared celular de las levaduras) cubierto con complemento de ratón ó humano. Las partículas de ZYMOSAN activan el sistema del complemento por la vía alterna, esto es generado a la porción C3b sobre su superficie.

Esta técnica tiene considerables ventajas sobre el ensayo clásico de rosetas EAC (eritrocito-anticuerpo-complemento). Grandes cantidades de partículas indicadoras pueden ser preparadas a su vez y guardarse a -70°C . Cualquier fuente de complemento que sea utilizada, es buena, puesto que el ZYMOSAN no lisa las células, el ZYMOSAN activa el sistema del complemento y de esta forma el anticuerpo ya no se utiliza; se recomienda la preparación de controles usando las preparaciones de rosetas E y EA, pero puede prescindirse de estos controles, ya que es muy confiable y el costo final de este ensayo es considerablemente muy bajo. Las partículas de ZYMOSAN cubiertas con complemento pueden estandarizarse mediante estudios seriados. La estandarización del reactivo EAC es difícil debido a la variabilidad biológica de las células eritrocíticas de las moléculas IgM, y del complemento.

Debido a que la partícula de ZYMOSAN se une al C3b es rápidamente degradada por las enzimas séricas, el complemento cubierto con eritrocitos ó las partículas de ZYMOSAN preparadas por incubación con suero total detecta principalmente al receptor C2, es posible asegurar la especificidad para el

receptor C1 por adición secuencial de los componentes humanos purificados en lugar de los eritrocitos de borrego sensibilizados con la IgM. (12, 16, 19, 29, 33, 49, 50)

OBJETIVOS

1. - Establecer los valores normales de las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos, en base a los receptores Fc y C3 de membrana.
2. - Utilizar éstos valores como referencia para futuras investigaciones de ciertos estados patológicos.

MATERIAL Y METODOS

- OBTENCION DE MUESTRAS Y SEPARACION DE CELULAS-

Se estudiaron 30 pacientes y a cada uno se le extrajeron de 8 a 10 ml de sangre venosa, mezclados con 0.1 ml de heparina, se agregó solución amortiguadora de fosfato (PBS) pH=7.2 de modo que el volumen de sangre quedó a dilución de 1:1.5, se agregaron aproximadamente 6 ml de sangre diluida en tubos que contenían 4 ml de FICOLL-HIPAQUE, procurando no romper la interfase, se centrifugaron a 1500 rpm/40 min. Se separaron con pipeta pasteur el anillo de linfocito-monocito, se lavaron con PBS pH=7.2, posteriormente se resuspendieron en un ml de PBS pH=7.2, para la separación de monocitos, aprovechando su capacidad de adherencia a la superficie de vidrio, la muestra se virió a una caja petri y se dejó por espacio de 30 min en estufa a 37°C, posteriormente se pasó a un tubo de ensaye, a la caja petri se le adicionó PBS pH=7.2 y se lavó perfectamente, vaciándose a tubos de ensaye los cuales fueron lavados 3 veces a 1500 rpm/10 min y resuspendiéndose en 1 ml de PBS pH=7.2.

Por un lado, de cada tubo se procedió a realizar cuenta viable celular, se ajustó la suspensión a una concentración de 4×10^6 células/ml en PBS pH=7.2.

Por otro lado se realizaron frotis y fueron teñidos con colorante de Wright, para observar la morfología celular tanto de linfocitos como de monocitos.

Para la separación de los granulocitos, éstos fueron separados de la parte superior del paquete eritrocitario; como se pasan eritrocitos, se proce-

dió a realizar shock hipotónico con agua destilada para lisar a los eritrocitos, se lavaron con PBS pH=7.2 durante 10 min a 1500 rpm, esta se realizó hasta que nos quedaron los granulocitos, posteriormente se lavaron 3 veces a 1500 rpm y en seguida se resuspendieron en 1 ml de PBS pH=7.2, se realizó una cuenta viable celular, la suspensión se ajustó a una concentración de 4×10^6 células/ml en PBS pH=7.2.

Se realizó un frotis y se procedió a hacer una tinción con colorante de Wright para observar la morfología de los granulocitos.

VIABILIDAD CELULAR

De cada una de las muestras se tomaron alícuotas y se llevó a cabo una dilución volumen a volumen con el colorante azul de tripan al 2 % (colorante supravital), las células muertas tomaron el colorante y las células vivas permanecieron incoloras.

La cuenta se realizó en 300 células, en un tiempo no mayor de 5 min.

-SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO PARA LA IDENTIFICACION DEL FRAGMENTO C3 DEL COMPLEMENTO. (ROSETAS EAC)

Por centrifugación son lavados 2 ml de sangre de carnero en PBS pH=7.2 durante 10 min a 1500 rpm, esto se realizó 3 veces ó bien hasta que el sobrenadante quede claro, ya lavados se prepara una suspensión al 2 % en PBS, se tomaron 5 ml de la suspensión al 2 % y se incubaron a 37°C durante 30 min con 5 ml de hemolisina 1:1200 (IgM de conejo anti-eritrocitos de carnero).

Después de la incubación, son lavados por centrifugación 3 veces con PBS a 1500 rpm/5min, se prepararon 5 ml de una dilución con PBS 1:50 de suero humano fresco (fuente de complemento), los cuales son añadidos y la suspensión se incubó 30 min a 37°C y posteriormente se sacan y son lavados con PBS 3 veces. De estos glóbulos rojos sensibilizados se preparó una dilución al 2 % y se guardaron a 4°C hasta su uso. (15, 30, 33, 45, 47)

- SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS DE BOVINO PARA LA IDENTIFICACION DEL FRAGMENTO Fc DE IgG. (ROSETAS EA)

Por centrifugación son lavados 2 ml de sangre de bovino con PBS 3 veces ó bien hasta que el sobrenadante quede claro, ya lavados se preparó una suspensión de eritrocitos al 2 % en PBS. Se preparó una dilución 1:100 de IgG (IgG de conejo anti-eritrocitos de bovino), se tomaron 5 ml de la suspensión al 2 % de eritrocitos de bovino y 5 ml de la dilución de IgG se mezclan y se incuban a 37°C durante 30 min, después de la incubación las células se lavaron 3 veces con PBS a 1500 rpm/5min, se ajusta a una concentración al 2 % y se guardaron a 4°C hasta su uso. (32, 37, 39, 45, 47)

- DETERMINACION DE ROSETAS EAC PARA EVALUAR EL RECEPTOR PARA EL FRAGMENTO C3 DEL COMPLEMENTO.

Se tomaron 0.25 ml de la suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina y complemento, se adicionan a 0.25 ml de la suspensión de 4×10^6 células/ml de (linfocitos, monocitos y granulocitos) respectivamente y son mezcladas. La suspensión es centrifugada a 1500 rpm/1 min.

Posteriormente los tubos son incubados a 4°C durante una hora, finalmente las células son resuspendidas con agitación suave y se procede a realizar una cuenta de 200 células en el hematocitómetro, aceptando como rosetas aquellas células que se unan a más de 3 glóbulos rojos adheridos a su membrana. (16, 30, 33, 45, 47)

-DETERMINACION DE ROSETAS EA PARA EVALUAR EL RECEPTOR PARA EL FRAGMENTO Fc DE IgG.

Se tomaron 0.25 ml de la suspensión de eritrocitos de bovino sensibilizados con IgG, son adicionados a 0.25 ml de la suspensión de 4×10^6 células/ml de (linfocitos, monocitos y granulocitos) respectivamente y son mezcladas. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm/1 min, posteriormente los tubos son incubados a 4°C durante una hora, finalmente las células son resuspendidas con agitación suave y se procede a realizar una cuenta de 200 células en el hematocitómetro, aceptando como rosetas aquellas células que se unan a mas de 3 glóbulos rojos adheridos a su membrana. (32, 44, 45, 47)

RESULTADOS

En el presente estudio de 30 personas sanas, se trató de observar el comportamiento de las diferentes variedades de leucocitos con respecto a la formación de rosetas EA (que detectan receptores para Fc) y rosetas EAC (que detectan receptores para C3).

El comportamiento de los linfocitos para rosetas EA, (gráfica Num. 1, frecuencia contra marca de clase Xi), donde apreciamos una marca de clase (Xi) de 36.5 con una frecuencia de 8, también se observó una frecuencia de 6 con marca de clase (Xi) de 38.7, donde una de éstas marcas de clase (Xi) la podemos comparar en el cuadro Num. 1 con respecto a la \bar{X} de 38.7 esto nos indica que las mayores frecuencia en que podemos encontrar rosetas EA en linfocitos es de un 36.5 a un 38.7 %. En el cuadro Num. 1 podemos apreciar el intervalo de confianza (I.C.) el cual va de 38.0 a un 39.4, lo cual cae en la máxima frecuencia en que podemos encontrar rosetas EA de linfocitos.

En el cuadro Num. 1 se muestra la diferencia de la \bar{X} (38.7, 29.2, 90.6) de linfocitos, monocitos y granulocitos respectivamente para la formación de rosetas EA, lo cual nos indica que tienen valores altamente significativos a niveles de $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.01$, con respecto a la media general en las 3 pruebas (52.8).

En la gráfica Num. 4 podemos observar 2 picos máximos de frecuencia con marca de clase (Xi) de 26.5 y 29.8 respectivamente para linfocitos en formación de rosetas EAC, lo cual nos indica que hay 2 frecuencia de 9 y 8

donde podemos encontrar el mayor porcentaje de rosetas, si ésto lo comparamos con el cuadro Num. 1 con \bar{X} de 28.9 y el intervalo de confianza (I.C.) de 28.2 a 29.5, podemos apreciar que las frecuencias caen dentro del I.C. al igual que la \bar{X} . Se realizó la prueba de t de student para ver si los valores son significativos, en la hoja de cálculo 1 y 4 planteamos las siguientes hipótesis de que las $M = M_L$ ó $M \neq M$, aceptando la segunda hipótesis donde la $M \neq M_L$ lo cual indica que son altamente significativos a nivel de $\alpha=0.01$ (2.75).

En la gráfica Num. 2 de monocitos para rosetas EA podemos apreciar un máximo pico de frecuencia 13 con marca de clase Xi de 29.9 en donde encontramos el mayor porcentaje de formación de rosetas EA para los monocitos, comparando con el cuadro Num. 1 la \bar{X} (29.2) y el intervalo de confianza (I.C.) de 28.7 a 29.7 lo cual la máxima frecuencia cae tanto en la \bar{X} como en el I.C., también en el cuadro Num. 1 se observa la diferencia de las medias para las 3 poblaciones de células en la formación de rosetas EA donde los valores son altamente significativos a niveles de $\alpha=0.05$ y $\alpha=0.01$ con respecto a la media general de las 3 pruebas (52.8).

Con respecto a los monocitos en la formación de rosetas EAC, ésto no se pudo graficar por presentar un rango pequeño de 25 a 27 % en la formación de rosetas EAC teniendo una \bar{X} de 26.5 donde se puede apreciar en el cuadro Num. 1, al realizar la prueba de t de student para ver si los valores son significativos en la hoja de cálculo 2 y 5 planteamos la siguiente hipótesis de que $M = M_m$ ó $M \neq M_m$ la cual se acepta la segunda hipótesis donde la $M \neq M_m$, indicándonos ésto que son altamente significativos a nivel $\alpha=0.01$ (2.75)

El comportamiento de los granulocitos lo podemos observar en la gráfica Num. 3 de formación de rosetas EA, aquí se aprecian 2 picos máximos de frecuencia que es de 10 con marca de clase (Xi) de 89.2 y 92.6, lo cual comparando con la \bar{X} de 90.6 y el intervalo de confianza (I.C.) de 89.9 a 91.3, en el cuadro Num. 1 se aprecia que éstos valores caen en el rango, esto nos indica que la mayor frecuencia en que podemos encontrar rosetas EA para los granulocitos es de 89.2 y 92.6, donde se hacen la comparación en el cuadro Num. 1, en el mismo cuadro se observa la diferencia de las medias para las 3 poblaciones de células en la formación de rosetas EA, donde los valores son altamente significativos a niveles de $\alpha=0.01$ y $\alpha=0.05$ con respecto a la media general de las 3 pruebas (52.8).

En la gráfica Num. 5 de granulocitos, para la formación de rosetas EAC, observamos una máxima frecuencia de 10 con marca de clase (Xi) de 78.7, donde se observa en el cuadro Num. 1 la \bar{X} de 78.4 y el intervalo de confianza (I.C.) es de 77.7 a 79.0, haciendo ésta comparación podemos decir que con ésa frecuencia máxima podemos encontrar rosetas EAC en granulocitos.

En el cuadro Num. 1 podemos observar la diferencia de la \bar{X} (28.9, 26.5, 78.4) de linfocitos, monocitos y granulocitos respectivamente para la formación de rosetas EAC, nos indica que tienen valores altamente significativos a niveles de $\alpha=0.05$ y $\alpha=0.01$ con respecto a la media general de las 3 pruebas (44.9).

Al realizar la prueba de t de student se observa que los valores son altamente significativos a nivel de $\alpha = 0.01$ (2.7), en la hoja de cálculos 3 y 6 se plantean las siguientes hipótesis de que $M = M_0$ ó $M \neq M_0$, por lo que se acepta la segunda hipótesis.

En el cuadro Num. 2 al obtener los valores de correlación (r) observamos que hay una relación bastante marcada entre las 2 pruebas de rosetas EA y EAC donde los valores son altamente significativos a nivel de $\alpha = 0.05$ para los linfocitos en rosetas EA y EAC, a $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.01$ son altamente significativos a éstos niveles, los monocitos y granulocitos en la formación de rosetas EA y EAC.

La correlación (r) que se encontró es bastante significativa, esto lo podemos observar en el cuadro Num. 1, haciendo la comparación entre la \bar{X} de c/u con la \bar{X} general, de igual forma con la desviación standard (S), de las pruebas de rosetas EA y EAC.

CUADRO # 1
VALORES DE ROSETAS EA Y EAC EN LEUCOCITOS DE
SANGRE PERIFERICA DE 30 INDIVIDUOS SANOS.

	ROSETAS EA			ROSETAS EAC		
	LIN.	MON.	GRAN.	LIN.	MON.	GRAN.
\bar{X}	+ 38.7	+ 29.2	+ 90.6	+ 28.9	+ 26.5	+ 78.4
S	1.86	1.39	1.92	1.8	0.77	1.61
I.C.	38.0 a 39.4	28.7 a 29.7	89.9 a 91.3	28.2 a 29.5	26.2 a 26.7	77.7 a 79.0

+ Estos valores son altamente significativos a nivel $\alpha=0.05$ y $\alpha=0.01$ (2.04 y 2.75) con respecto a la media general de las tres pruebas. (52.8) para EA y (44.6) para EAC.

X media aritmética.

S desviación standart.

I.C. intervalo de confianza a $\alpha=0.05$

$$\bar{X} + t_{\alpha/2} S/\sqrt{n} > \mu > \bar{X} - t_{\alpha/2} S/\sqrt{n}$$

CUADRO # 2

VALORES DE CORRELACION (r) ENTRE LAS DIFERENTES PRUEBAS.

		ROSETAS EA			ROSETAS EAC				
		LINF.	MONOC.	GRANUL.	LINF.	MONOC.	GRANUL.		
ROSETAS EA	LINF.	-	-0.22	-0.147	+	0.451	0.011	0.122	
	MON.	-0.22	-	0.008	-	-0.102	++	0.831	0.320
	GRAN.	-0.147	0.008	-	-	-0.056	++	0.792	0.0045
ROSETAS EAC	LINF.	+	0.451	-0.102	-0.056	-	0.018	0.115	
	MON.	0.011	++	0.831	++	0.792	0.018	-	0.190
	GRAN.	0.122	0.320	0.0045	0.115	0.190	0.115	0.190	-

+ estos valores son altamente significativos a un nivel de $\alpha = 0.05$

++ estos valores son altamente significativos a un nivel de $\alpha = 0.05$

y $\alpha = 0.01$.

C A L C U L O #1

- Prueba de t de student para rosetas EA (receptor Fc) en linfocitos.

Planteando la hipótesis.

Ho: $\mu = \mu_0$ Corresponden a la misma población.

Ha: $\mu \neq \mu_0$ Corresponden a diferentes poblaciones.

$$\bar{M} = \frac{X1 + X2 + X3}{3}$$

$$\bar{M} = \frac{38.7 + 29.2 + 90.6}{3} = 52.8$$

$$t = \frac{X1 - \bar{M}}{S/\sqrt{n-1}}$$

$$t = \frac{38.7 - 52.8}{1.86/\sqrt{29}} = -40.9$$

Ha: 52.8 \neq -40.9

Rechazando la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población y aceptando que las medias corresponden a diferentes poblaciones donde son altamente significativas a nivel $\alpha=0.01$ (2.57)

C A L C U L O # 2

- Prueba de t de student para rosetas EA (receptor Fc) en monocitos.

Planteando la hipótesis

Ho: $M = M_m$ Corresponden a la misma población.

Ha: $M \neq M_m$ Corresponden a diferentes poblaciones.

$$M = \frac{X_l + X_m + X_g}{3}$$

$$M = \frac{38.7 + 29.2 + 90.6}{3} = 52.8$$

$$t = \frac{X_m - M}{S \sqrt{n-1}}$$

$$t = \frac{29.2 - 52.8}{1.39 \sqrt{29}} = -91.5$$

Ha: $52.8 \neq -91.5$

Rechazando la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población y aceptando que las medias corresponden a diferentes poblaciones donde son altamente significativas a nivel $\alpha = 0.01$ (2.75)

CALCULO # 3

- Prueba de t de student para rosetas EA (receptor Fc) en granulos.

Planteando la hipótesis.

Ho: $\mu = \mu_0$ Corresponden a la misma población.

Ha: $\mu \neq \mu_0$ Corresponden a diferentes poblaciones.

$$\bar{M} = \frac{X_1 + X_m + X_g}{3}$$

$$\bar{M} = \frac{38.7 + 29.2 + 90.6}{3} = 52.8$$

$$t = \frac{X_g - \bar{M}}{S/\sqrt{n-1}}$$

$$t = \frac{90.6 - 52.8}{1.92/\sqrt{29}} = 106.3$$

Ha: $52.8 \neq 106.3$

Rechazando la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población y aceptando que las medias corresponden a diferentes poblaciones donde son altamente significativas a nivel $\alpha = 0.01$ (2.75)

C A L C U L O # 4

- Prueba de t de student para rosetas EAC (receptor C3) en linfocitos.

Planteando la hipótesis.

Ilo: $M = M_c$ Corresponden a la misma población.

Ila: $M \neq M_c$ Corresponden a diferentes poblaciones.

$$M = \frac{Xl + Xm + Xg}{3}$$

$$M = \frac{28.9 + 26.5 + 78.4}{3} = 44.6$$

$$t = \frac{Xl - M}{S/\sqrt{n-1}}$$

$$t = \frac{28.9 - 44.6}{1.8/\sqrt{29}} = -46.9$$

$$Ha: 44.6 \neq -46.9$$

Rechazamos la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población y aceptando que las medias corresponden a diferentes poblaciones donde son altamente significativas a nivel $\alpha = 0.01$ (2.75)

C A L C U L O # 5

- Prueba de t de student para rosetas EAC (receptor C3) en monocitos.

Panteando la hipótesis.

Ho: $M = M_m$ Corresponden a la misma población.

Ha: $M \neq M_m$ Corresponden a diferentes poblaciones.

$$M = \frac{Xl + X_m + Xg}{3}$$

$$M = \frac{28.9 + 26.5 + 78.4}{3} = 44.6$$

$$t = \frac{X_m - M}{S/\sqrt{n-1}}$$

$$t = \frac{26.5 - 44.6}{0.77/\sqrt{29}} = -126.4$$

$$Ha: 44.6 \neq -126.4$$

Rechazando la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población y aceptando que las medias corresponden a diferentes poblaciones donde son altamente significativas a nivel $\alpha = 0.01$ (2.75)

CALCULO # 6

- Prueba de t de student para rosetas EAC (receptor C3) en granulos.
citos.

Planteando la hipótesis.

Ho: $\mu = \mu_0$ Corresponden a la misma población.

Ha: $\mu \neq \mu_0$ Corresponden a diferentes poblaciones.

$$\bar{M} = \frac{X_1 + X_m + X_g}{3}$$

$$\bar{M} = \frac{28.9 + 26.5 + 78.4}{3} = 44.6$$

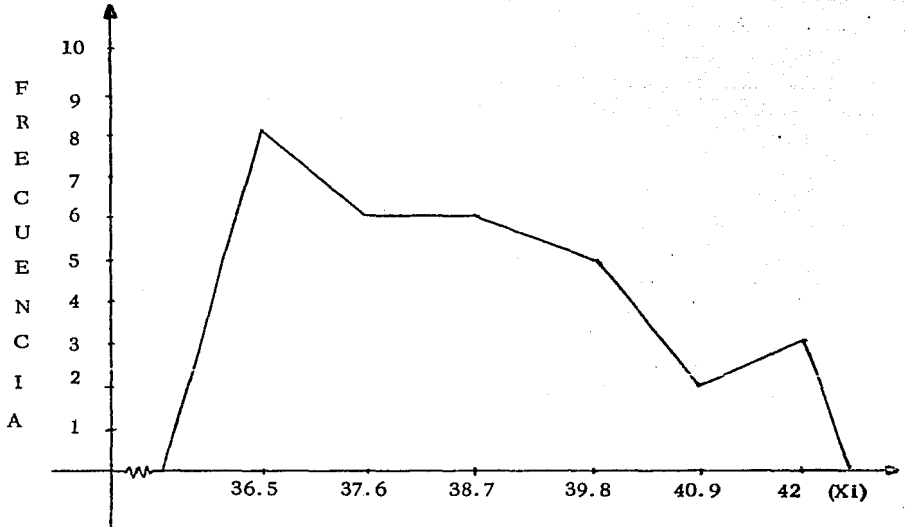
$$t = \frac{X_g - \bar{M}}{S\sqrt{n-1}}$$

$$t = \frac{78.4 - 44.6}{1.61/\sqrt{29}} = 112.9$$

Ha: $44.6 \neq 112.9$

Rechazando la hipótesis de que las medias corresponden a la misma población y aceptando que las medias corresponden a diferentes poblaciones, donde son altamente significativas a nivel $\alpha = 0.01$ (2.75)

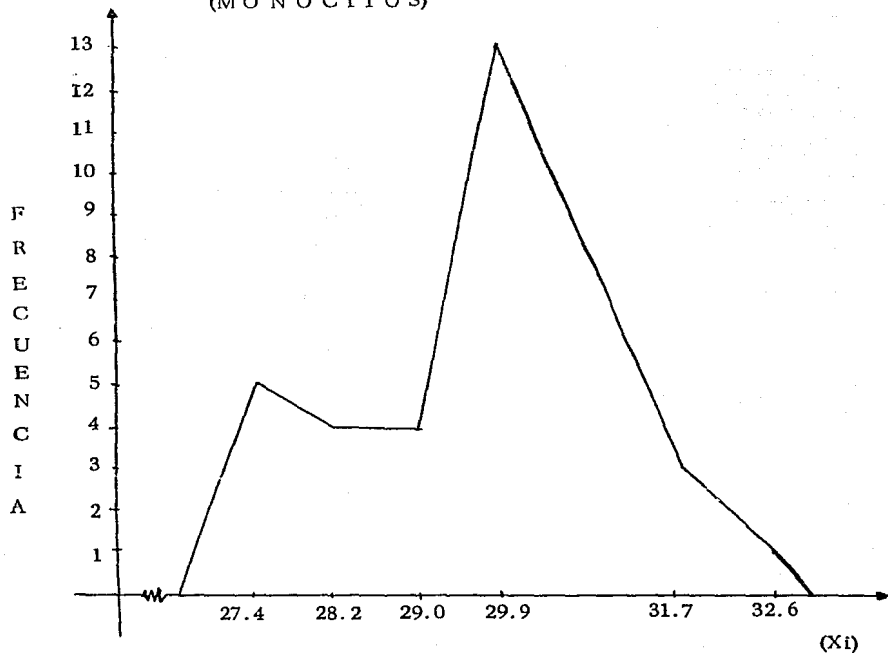
GRAFICA # 1 (ROSETAS EA)
(L I N F O C I T O S)



<u>CLASE</u>	<u>(Xi)</u>	<u>F</u>
36.0 - 37.0	36.5	8
37.1 - 38.1	37.6	6
38.2 - 39.2	38.7	6
39.3 - 40.3	39.8	5
40.4 - 41.4	40.9	2
41.5 - 42.5	42.0	3

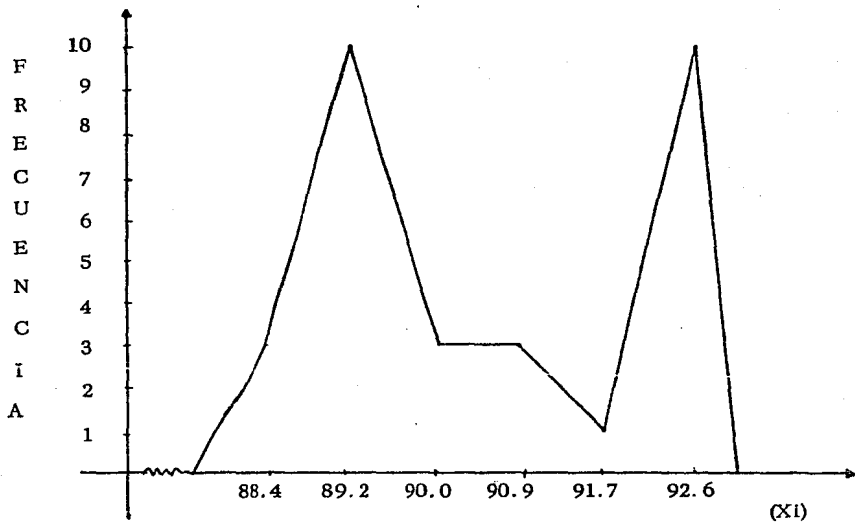
GRAFICA # 2 (ROSETAS EA)

(MONOCITOS)



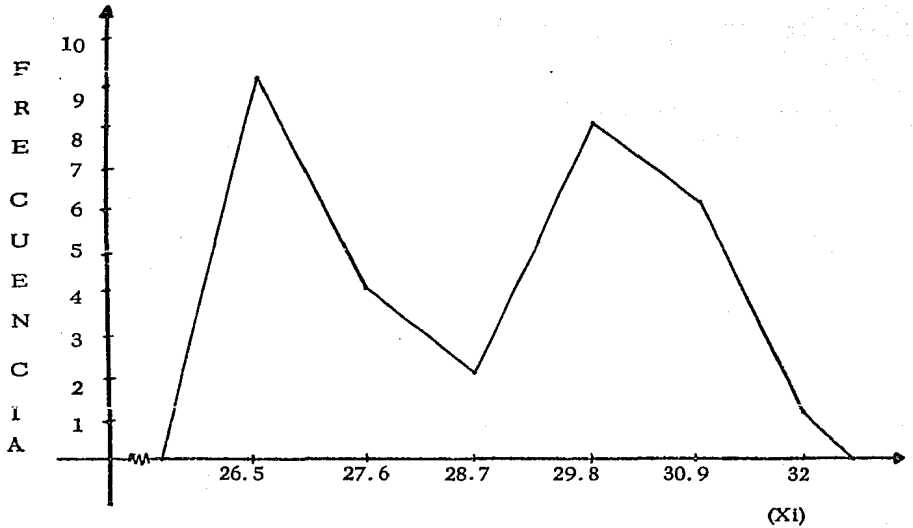
<u>CLASE</u>	(Xi)	F
27.0 - 27.83	27.4	5
27.84 - 28.67	28.2	4
28.68 - 29.51	29.0	4
29.52 - 30.35	29.9	13
30.36 - 31.19	31.7	3
31.20 - 32.03	32.6	1

GRAFICA #3 (ROSETAS EA)
(GRANULOCITOS)



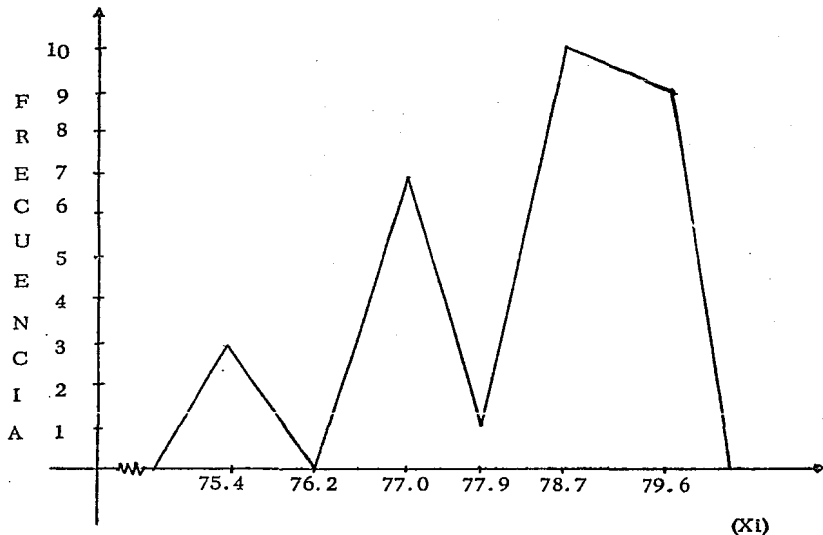
<u>C L A S E</u>	(Xi)	F
88.0 - 88.83	88.4	3
88.84 - 89.67	89.2	10
89.68 - 90.51	90.0	3
90.52 - 91.31	90.9	3
91.32 - 92.19	91.7	1
92.20 - 93.03	92.6	10

GRAFICA # 4 (ROSETAS EAC)
(LINFOCITOS)



<u>CLASE</u>	(Xi)	F
26.0 - 27.0	26.5	9
27.1 - 28.1	27.6	4
28.2 - 29.2	28.7	2
29.3 - 30.3	29.8	8
30.4 - 31.4	30.9	6
31.5 - 32.5	32.0	1

GRAFICA # 5 (ROSETAS EAC)
(GRANULOCITOS)



<u>CLASE</u>	(XI)	F
75.00 - 75.83	75.4	3
75.84 - 76.67	76.2	0
76.68 - 77.51	77.0	7
77.52 - 78.35	77.9	1
78.36 - 79.19	78.7	10
79.20 - 80.03	79.6	9

DISCUSION

En este trabajo se trataron de demostrar los valores normales de receptores Fc y C3 de cada una de las variedades de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos), por el método de formación de rosetas EA y EAC respectivamente, comparando cada una de las células por el método de rosetas EA, como es el caso de la \bar{X} y la S se encuentran diferencias estadísticas, de igual forma se observa la diferencia estadística para el caso de rosetas EAC.

Las células que portan receptores Fc y C3 juegan un papel importante en el proceso de citotoxicidad que interviene en la destrucción de células tumorales, así tenemos que, los linfocitos T, linfocitos B, células K, macrófagos y células NK destruyen e impiden la proliferación de células cancerosas. (1, 5, 9, 11)

Los granulocitos, monocitos y linfocitos de la sangre periférica muestran los receptores que se expresan desde su formación en la médula ósea, para los primeros no se ha aclarado si tiene la capacidad de recuperarlos, cuando son afectados, ya que presentan aún actividad metabólica, mientras que en linfocitos y monocitos, estos receptores si son recuperables. (6, 9)

La expresión de éstos receptores Fc y C3 en la superficie de los leucocitos pueden ser demostrado por la formación de rosetas EA y EAC como lo han puesto de manifiesto otros autores. (13, 15, 44)

Se ha observado que los receptores Fc y C3 pueden ser dañados por agentes físicos como la radiación (18), esta tiene un efecto muy parecido al

de algunos medicamentos antineoplásicos como los alquilantes. (5, 12)

La función fagocitaria para destruir sustancias extrañas se magnifican por la presencia de receptores a Fc de inmunoglobulinas y C3 de complemento, en la superficie de las células fagocíticas (5, 6, 8), éstos receptores han sido identificados actualmente como glicoproteínas embebidas en la parte proteica de la membrana plasmática (16, 17, 49), sin ser exclusivos de las células fagocíticas, ya que también se han encontrado en linfocitos B y T, no-T y no-B (11, 15, 44). Su expresión depende del estímulo que tenga la célula, desde su formación en la médula ósea, in-vitro se ha demostrado que los cultivos de médula ósea estimulados con fitohemaglutinina ó concanavalina A pueden desarrollar el receptor para Fc y C3 (42), ó bien con estimulantes específicos como son los que se encuentran en el medio condicionado de pulmón endotóxico, para activar la formación de receptor para C3 (FIRC3, factor inductor a la formación del receptor para C3) y para Fc (FIRFc, factor inductor para la formación del receptor a Fc). (18, 19)

Los resultados obtenidos en éste estudio mostraron el porcentaje de células formadoras de rosetas EA (para Fc) y EAC (para C3b) para linfocitos, monocitos y granulocitos respectivamente que son (38.7; 29.2; 90.6) y (28.9; 26.5; 78.4), con un intervalo de confianza de (38.0 a 39.4, 28.7 a 29.7 y de 89.9 a 91.3) para rosetas EA y el intervalo de confianza de (28.2 a 29.5, 26.2 a 26.7 y de 77.7 a 79.0) para rosetas EAC a nivel de $\alpha=0.05$, por lo que estos valores son altamente significativos.

Se ha reportado (28) la existencia de un factor inmunosupresor libe-

rado por los linfocitos T supresores, el cual bloquea el rechazo de un tumor en ratones inmunizados. Así mismo se ha demostrado que los complejos antígeno-anticuerpo pueden estimular células supresoras e inhibir la citotoxicidad dependiente de anticuerpo.

Por lo tanto, el bloqueo ó supresión de las células citotóxicas puede ser producida por complejos antígeno-anticuerpo, por factores inmunosupresores, ó por la interacción simultánea de células efectoras con células supresoras, ó por los distintos procesos activados en conjunto.

Estos resultados obtenidos pueden ser de gran utilidad ya que se obtuvieron valores normales de rosetas EA (que detectan receptores Fc) y rosetas EAC (que detectan receptores C3) de cada una de las células, linfocitos, monocitos y granulocitos, abren una puerta de interés y aunque no son concluyentes indican que se debe estudiar mas a fondo al respecto.

C O N C L U S I O N E S

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo llegamos a concluir que:

1. - Todos los leucocitos tienen la capacidad de formar rosetas EA (receptores Fc) y EAC (receptores C3).
2. - En la sangre de personas sanas la formación de rosetas EA, fue de (\bar{X} , linfocitos 38.7, monocitos 29.2 y granulocitos 90.6) a $\alpha=0.05$ y $\alpha=0.01$, EAC, fue de (\bar{X} , linfocitos 28.9, monocitos 26.5 y granulocitos 78.4)
3. - La separación de la población de leucocitos por gradiente de concentración con FICOLL-HIPAQUE es fácil para las poblaciones de linfocitos y granulocitos.
4. - Sin embargo los monocitos se separaron por adherencia al vidrio, lo que dificulta su estudio como célula libre.
5. - La población de granulocitos demostró formar mayor cantidad de rosetas EA ($\bar{X}=90.6$) y EAC ($\bar{X}=78.4$).
6. - Tanto linfocitos totales ($\bar{X}=38.7$, $\bar{X}=28.9$) como monocitos ($\bar{X}=29.2$, $\bar{X}=26.5$), mostraron menor capacidad para formar rosetas EA y EAC respectivamente, en mayor cantidad los granulocitos ($\bar{X}=90.6$, $\bar{X}=78.4$), de rosetas EA y EAC respectivamente, hecho que tuvo significancia estadística ($\alpha=0.01$ y $\alpha=0.05$).
7. - En el estudio se pudo demostrar que la correlación (r) entre las 2 pruebas es bastante buena.

BIBLIOGRAFIA

1. - Wintrobe, M.M. : Clinical Hematology 7th. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, Pa. 1976. p.p. 221-267, 408-415.
2. - Leavell, B.S., Thorup, O.A.: Hematología Clínica 4a. Ed. Interamericana, Mexico, 1978. p.p. 1-13, 290-300, 473.
3. - Bach, J.F., Lesavre, Ph.: Immunología Ed. Masson, Barcelona 1981 p.p. 11-15, 48.
4. - Rojas, M.W.: Immunología 6a. Ed. Fondo Educativo Interamericano, Mexico, p.p. 225, 230, 258.
5. - Stites, D.P., Fudenberg, H.H.: Immunología Básica y Aplicada Ed. El Manual Moderno, 1983. p.p. 17-19, 90-98, 273-274.
6. - Roitt, I.M.: Essential Immunology, 5a. Ed. jims; Barcelona 1973. p.p. 101-130.
7. - Davidsohn, I., Bernard, H.J.: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. Ed. Salvat; Barcelona; 1979. p.p. 257-270.
8. - Davis, B.D., Culbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W. B., McCarty, M.: Tratado de Microbiología. 2a. Ed. Salvat. Barcelona 1979; p.p. 480-489.
9. - Gordon, B.L.: Lo Esencial de la Inmunología. Ed. El Manual Moderno S.A. México. 1982. p.p. 6-26.
10. - Moretta, A., Mingari, M.C., Corte, G., Moretta, L.: Receptors for Immunoglobulins and Activation Markers on Human T Lymphocytes. Clinics in Hematol. 1982; 11;697-709.

11. - Rowlands, D.T., Daniele, R.P.: Surface Receptors in the Immune Response. *Physiol. In Medicine*. 1975;293;26-32.
12. - Maheu, M., Baker, M.A., Falk, J.A., Taub, R.N.: Immunologic Diagnosis and Monitoring of Human Acute Leukemias. *American Association of Pathol.* 1981;103;139-158.
13. - Hofmeister, B.G., Carrera, C.J., Barret, S.J.: Neutrophil Surface Markers in Patients With Acute Leukemia. *Blood*. 1981;57;372-374.
14. - Preisler, H.D.: Prediction of Response to Chemotherapy in Acute Myelocytic Leukemia. *Blood*. 1980;56;361-367.
15. - Jondal, M., Holm, G., Wigzell, H.: Surface Markers on Human T and B Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1972;136;207-215.
16. - Wilson, J.C., Tedder, T.F., Fearon, D.T.: Characterization of Human T Lymphocytes that Express the C3b Receptor. *J. Immunol.* 1983; 131;684-689.
17. - Katsuro, Y., Kaoru, O., Yoshitomi, A.: Structural Studies of Fc Receptors. *J. Immunol.* 1978;122;366-373.
18. - Weiss, S.B., Nieto, R.P., Diaz, P.R., Gutiérrez, R.M.: Efecto de la Radiación Ionizante sobre la Inducción a la Proliferación Celular y a la Aparición de Receptores Fc en Células de la Médula Osea. *Rev. Mex. Radiol.* 1983;37;139-142.
19. - Calcagno, M., Rios, B., Fragoso, A., Arciga, A.M., Cabrera, G., Torres, R., Weiss, S.B.: Evidence of a Factor that Induces C3 Receptor on Bo-

- ne Marrow Cells. *Blood*. 1983;61;403-407.
20. - Barriga, C., Peña, J.: Receptores de Linfocitos T que Forman Rosetas E y su Mecanismo de Síntesis. *Sangre*. 1979;24;129-134.
21. - Picheler, W.J., Broders, S.: Fc-IgM and Receptor on Human Circulating B Lymphocytes. *Blood*. 1978;121;887-890.
22. - Panayi, G.S.: Substrates for Phagocytes in Joints. *Scand J. Rheumatol. Suppl.* 1981;40;32-36.
23. - Leijh, P.C.J., Furth, R.: Extracelular Stimulation of Phagocytes by Plasma Proteins for Optimal Intracellular Killing of Micro-Organisms. *Scand J. Rheumatol.* 1981;40;62-64.
24. - Herberman, B., Bartran, S., Stephen, H.J., Nunnm., Holden, T., West, H.W.: Fc Receptors on Mouse Effector Cells Mediating Natural Cytotoxicity Against Tumor Cells. *J. Immunol.* 1977;119;322-325.
25. - Perlmann, H., Perlmann, P., Schreiber, R., Muller, E.H.: Interaction of Target Cell-Bound C3b1 and C3d with Human Lymphocyte Receptor. *J. Exp. Med.* 1981;153;1592-1603.
26. - Steinhaver, H.E., Doyle, T.A., Reed, J., Kadish, S.A.: Defective Natural Killer Cell Effector Cells But Decreased Recycling Capacity in Patients with Advanced Disease. *J. Immunol.* 1982;129;2255-2259.
27. - Fernandez-Cruz, E., Gilman, C.S., Feldman, D.J.: Altered Levels of Mononuclear Leukocytes in Tumor-Bearing Rats; Decrease of Helper T Lymphocytes and Increase of Suppressor Cells. *J. Immunol.* 1982;124;1324-1328.

28. - Greene, I.M., Fujimoto, S., Sehon, A.H.: Regulation of the Immune Response to Tumor Antigens. Characterization of Thymic Suppressor Factor(s) Produced by Tumor by Tumor-Bearing Hosts.
J. Immunol. 1977;119:757-763.
29. - Noltenius, H.W.: Fc and Complement Receptors on Malignant Tumor Cells. Cancer. 1981;48:1761-1767.
30. - Birkeland, S.A.: Influence of Irradiation on the Capacity of Human T and F Lymphocytes to form E and HEAC Rosettes.
Transplantation. 1980;29:23-27.
31. -Cohen, L., Sharps., Kulczcki, A.: Human Monocytes B Lymphocytes and Non-B Lymphocytes Edch have Structurally Unique Fc Receptors.
J. Immunol. 1983;131:378-383.
32. - Yodoi, J., Ishizaka, K.: Lymphocytes Bearing Fc Receptors for IgG, 1. - Presence of Human and Rat T Lymphocytes with Fc Receptor.
J. Immunol. 1979;122:2577-2583.
33. -Bianco, C., Patrick, R., Nussenzweig, V.: A Population of Lymphocytes Bearing a Membrane Receptor Antigen-Antibody Complement Complexes.
1. -Separation and Characterization.
J. Exp. Med. 1970;132:702-720.
34. -North, R.J.: The Concept of the Activated Macrophage.
J. Immunol. 1978;121:806-809.
35. -Froland, S.S.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Human Fc-Receptor Bearing Lymphocytes.

INSERM. 1976;57;191-196.

36. -Bertoglio, J., Dore, J.F.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Humains: Identification de Sous-Populations de Lymphocytes Humains Par Certains Marqueurs de Surface.

INSERM. 1976;57;89-95.

37. -Tournier, C., Bach, J.F.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Humains: Les Techniques des Rosettes E, EAC, et EA Chez L'Homme.

INSERM. 1976;57;105-112.

38. -Pepys, M.B.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Humains: Characterization and Enumeration of Lymphocytes Populations in Whole Peripheral Blood. Application to B Cells.

INSERM. 1976;57;141-151.

39. -Samarut, C., Brochier, J., Revillard, J.P.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Humains: Identification des Cellules A Recepteur Fc par une Methode de Rosettes EA.

INSERM. 1976;57;197-201.

40. -Gordier, G., Samarut, C.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Humains: Identification et Proprietes des Cellules a Recepteurs de Haute Avidite Pour le Fragment Fc des IgG.

INSERM. 1976;57;203-207.

41. -Perlmann, H., Wahlin, B., Perlmann, P.: Techniques de Separation et D'Identification des Lymphocytes Humains: 1. -Detection of Antibody Depen-

dent Lymphocytes Effector Cell(K-Cells) in Human Blood by a Plaque Assay. 2. -Depletion of C3-Receptor Lymphocytes by an EAC-Rosette Depletion Technique.
INSERM. 1976;57;231-234.

42. -Siegal, F.P.: Cellular Differentiation Markers in Lymphoproliferative Diseases.
Mount Sinai School of Medicine. London. 1978;13;79-89.
43. - Roos, D.: Molecular Avents During Phagocyte Stimulation.
Scand. J. Rheumatogy. 1981;40;46-52.
44. - Bowman, W.P., Melvins., Maver, A.M.: Cell Markers in Lymphomas and Leukemias. Year Book Medical Publish. inc. 1980;25;391-425.
45. - Winchester, R.J., Hoffman, T., Ferrarini, N., Ross, G.D., & Kunkel, H.G.: Comparison of Various Tests for Receptors on Different Human Lymphocytes Sub-Population.
Clin. Exp. Immunol. 1976;37;126-133.
46. - Owen, F.L., Fanger, M.W.: Studies on the Human T Lymphocyte Population. III. -Synthesis and Release of Lymphocyte Receptor for Sheep Red Blood Cells by Stimulated Human T Lymphoblasts.
J. Immunol. 1975;115;765-770.
47. - Pandolfi, F., Kurnick, J.T., Nilsson, K., Forsbeck, K. & Wigzell, H.: Rosette Formation with Goat Erythrocytes: A Marker for Human T Lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 1978;32;504-509.
48. - Anderson, C.L., Grey, H.M.: Solubilization and Partial Characterization

of Cell Membrane Fc Receptor.

J. Immunol. 1977;118;819-824.

49. -Ross, G.D., Polley, M.J.: Specificity of Human Lymphocyte Complement Receptor.

J. Exp. Med. 1975;141;1163-1180.

50. -Eden, A., Miller, G.W., Nussenzweig, V.: Human Lymphocytes Bear Membrane Receptors for C3b and C3d.

J. Clin. Inves. 1973;52;3239-3242.

51. -Remington, R.D., Schork, M.A.: Estadística Biométrica y Sanitaria.

Ed. Prentice/Hall Internacional. Madrid 1977.