



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"**

**VALORACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR  
MEDIO DE LA CUANTIFICACION DE POBLACIONES  
LINFOIDES Y DE COMPLEJOS INMUNES, EN  
RATAS INTOXICADAS CON DDT Y TOXAFENO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MARGARITA MARICELA MENDOZA REGALADO**



**México, D. F.**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

<u>CAPITULO I</u>	Páginas
-Introducción . . . . .	1
<u>CAPITULO II</u>	
-Resumen . . . . .	26
-Fundamentación de la elección del tema . . . . .	27
-Planteamiento del problema . . . . .	28
-Objetivos . . . . .	29
-Hipótesis . . . . .	30
<u>CAPITULO III</u>	
-Material . . . . .	31
-Equipo v v . . . . .	32
-Reactivos . . . . .	33
+Métodos y Procedimientos	
-Marcaje de ratas v . . . . .	36
-Preparación de los agentes DDT y Toxafeno . . . . .	36
-Aplicación de los insecticidas . . . . .	38
+Formación de Rosetas	
-Inmunización de Ratas para obtener IgG e IgM anti-G.R.C. . . . .	38
-Obtención de IgM por cromatografía en columna . . . . .	39
-Titulación de hemolisina (IgM) por hemaglutinación . . . . .	44

-Obtención de IgG empleando DEAE Celulosa . . . . .	45
-Precipitación de IgG(conejo) con sulfato de amonio concentrado al 40 y 33% . . . . .	46
-Procedimiento para sensibilizar eritrocitos de carnero . . . . .	48
-Rosetas FC y Rosetas C3b . . . . .	49
+Determinación de Complejos inmunes por precipita- ción con polietilen glicol(PEG) y consumo de — complemento .	
-Preparación de Gamma Globulina de rata agregada por calor	
-Determinación de Proteínas por el método de Lowry . . . . .	52
-Complejos Inmunes (técnica) . . . . .	53
+Titulación del complemento en unidades 50% hemolíticas	
-Procedimiento . . . . .	55
<u>CAPITULO IV</u>	
-Resultados y Gráficas . . . . .	57
<u>CAPITULO V</u>	
-Discusión de Resultados . . . . .	78
<u>CAPITULO VI</u>	
-Conclusiones . . . . .	80
<u>BIBLIOGRAFIA</u> . . . . .	82

**C A P I T U L O I**

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

La inmunidad se refiere a la capacidad de - que disfruta un organismo , para no ser afectado - fácilmente por los agentes perjudiciales del medio- ambiente. Esta capacidad se encuentra dentro de él- mismo(3).

Existen dos mecanismos principales de inmu- nidad que son: a) la inmunidad no específica o --- nativa y b) la inmunidad específica o adquirida. - La inmunidad nativa se refiere a la resistencia nor- mal que presenta un organismo, hacia los microorga- nismos y sus toxinas. La inmunidad específica tie- ne una función inmuno-protectora hacia el hospedero es específicamente adquirida a través de la experien- cia personal y la exposición a agentes perjudiciales para ese organismo.

El establecimiento de la respuesta inmune --- requiere de la intervención de varios tipos celu- lares que colaboran entre sí (4). Para el inicio de- la respuesta es necesaria alguna modificación en la estructura o presentación del antígeno, que es --- efectuada por los macrófagos (1,2).

Estos han sido estudiados, y se han determi- nado algunas propiedades y características propias, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- a) Adherencia al vidrio y al plástico (5)
- b) Separación de los diferentes tipos de macrófagos

por su funcionalidad(5).

- c) Fagocitosis específica y no específica (1). —
- d) Presencia en su superficie de receptores Fc —  
(6,7,8,9,10).

La presencia de los receptores sobre la superficie de los macrófagos ha sido demostrada por la formación de rosetas.

Se han realizado estudios en los cuales se observa que ciertas sustancias y factores inhiben la formación de rosetas en monocitos humanos, entre los que se encuentran:

-2-desoxiglucosa

-azida de sodio e incubación a 4°C.

-temperatura de 4°C inhibición total ( pero no pérdida de viabilidad ni adherencia)

-colchicina a altas concentraciones , disminuye la adherencia de monocitos e inhibe la formación de rosetas

-Iones de Mg se requieren para promover la adherencia

-Iones de Mg y Ca son necesarios para una mejor formación de rosetas.

-la temperatura es un factor muy importante ya que a 37°C se ve aumentado el número de rosetas, en comparación con el número formado a temperatura ambiente.

Efectos similares de temperatura, Mg pero no calcio se requieren para formar rosetas EAC en células peritoneales de ratón.

Sin embargo, existen evidencias que indican —

que no siempre la formación de rosetas es afectada de igual manera en los macrófagos, y en las demás células que poseen los receptores Fc y C3b. Tampoco son comparables los resultados obtenidos con macrófagos que provienen de diferentes lugares del organismo, ni con macrófagos de diferentes especies animales.

Los ensayos con rosetas han facilitado el estudio de los receptores de superficie, particularmente aplicado a polimorfonucleares. Aunque se conoce poco sobre el mecanismo exacto acerca de la unión de la superficie del receptor a un antígeno se proponen 2 modelos (14) para el enlace Fc de las IgG estimuladas.

a) Modelo del receptor migrador. --El enlace de la porción Fc a la inmunoglobulina IgG estimula la migración de receptores al área de ataque. Así la concentración local de receptores se incrementa y marca un enlace adicional más probable (figura 1).

b) Modelo del receptor estático. --La porción Fc de IgG son destinadas a una simple entidad molecular con múltiples sitios. Los enlaces inducen a cambios intramoleculares estéricos que facilitan el enlace subsiguiente de la porción Fc a IgG. (figura 2).

Por lo tanto la formación de rosetas depende no solamente del enlace de los receptores a las inmunoglobulinas, sino que se requieren células metabólicamente activas, una citoestructura intacta,

y condiciones adecuadas de acuerdo a la especie con que se trabaje.

Particularmente el método de rosetas EA y EAC - empleado en este trabajo es más sencillo en comparación con otros, tal es el caso del radioinmuno ensayo - (5).

Las rosetas se pueden formar en tubo y en preparaciones fijas, en este trabajo se prefirió el método de rosetas en preparaciones permanentes debido a que presenta las siguientes ventajas: (16)

- permite eliminar completamente las células no adherentes
- permite repetir la observación las veces que sea necesario
- permite una clara distinción entre las células libres y las formadoras de rosetas.

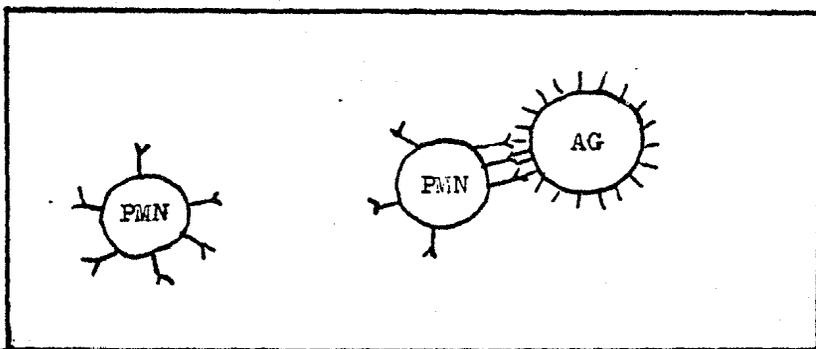


figura 1

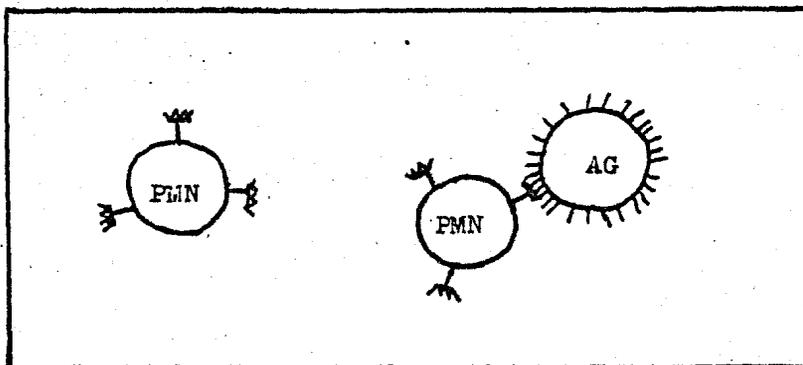


figura 2

PMN = Polimorfonuclear

AG = Antigens

## COMPLEJOS INMUNES (31)

Un gran número de variables pueden contribuir a la formación de complejos inmunes circulantes. — Existe una amplia variedad de antígenos, en su mayoría extrínsecos (productos de virus, bacterias, parásitos, mohos y alimentos ingeridos), pero algunos intrínsecos (tales como DNA, RNA, inmunoglobulinas y otras proteínas propias), que pueden formar complejos inmunes. Teóricamente los complejos inmunes pueden ser producidos por todas las clases de inmunoglobulinas, entre las que se encuentran IgM, IgG, IgA — e IgE (32).

Los complejos inmunes se fijan a complemento, de ésta manera se determina la clase de inmunoglobulinas involucradas, el tamaño de el complejo depende de factores como: antígeno-anticuerpo, radioafinidad de anticuerpo enlazante o si hay interacción secundaria con factores reumatoides o inmunoconglutinininas.

Los complejos inmunes son formados tomando en cuenta el antígeno responsable, la clase de inmunoglobulina, capacidad de enlace a complemento, antígeno-anticuerpo (radio). Todas estas características pueden ser importantes en la localización de complejos en un órgano, los factores que influyen en el depósito tisular dependen más de la cantidad formada de la eficiencia de eliminación por el sistema retículoendotelial y del volumen de sangre circulante de un órgano por unidad de tiempo (31).

Un modelo hipotético de la inducción no específica de complejos inmunes es ilustrada en la figura(3).

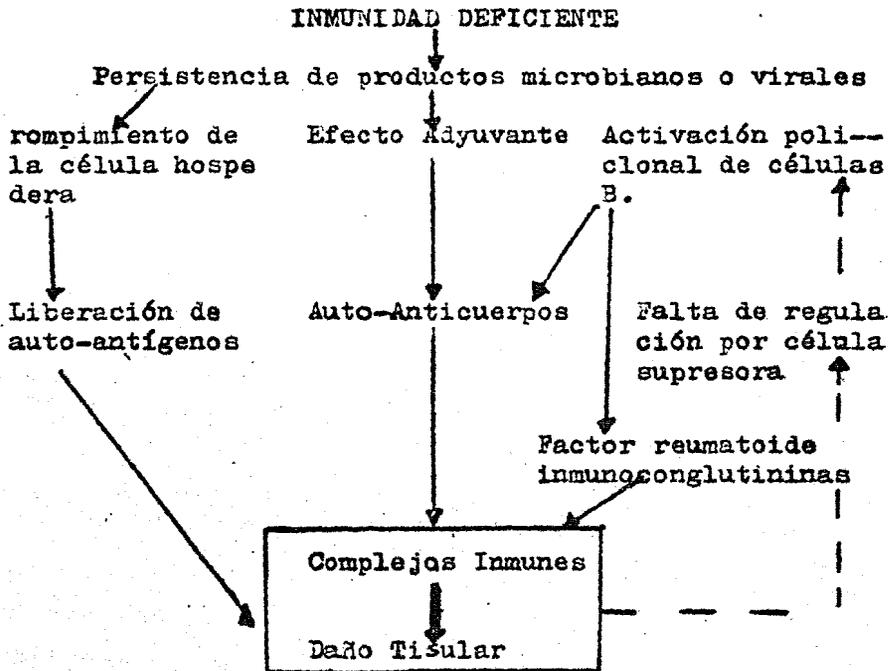


figura 3

Se propone una deficiencia inmunitaria como fundamento iniciador, el cual permite persistencia de antígenos dentro de la circulación y tejidos principales, además un debilitamiento en el mecanismo de control de la célula supresora.

Altos niveles de complejos inmunes circulantes han sido reportados (33) en una amplia variedad de enfermedades, lupus eritematoso sistémico, varias formas de glomerulonefritis, artritis reumatoide,

enfermedades crónicas inflamatorias de intestino, y muchas infecciones bacterianas, virales y parasitarias (33). Sin embargo los complejos inmunes también aparecen en el suero de personas sanas, particularmente después de comer alimentos.

Por lo tanto la presencia de complejos inmunes en la circulación no significa necesariamente que son los responsables de la enfermedad. No todos los complejos inmunes son dañinos, son importantes para los mecanismos normales, ejemplo. los complejos inmunes de IgA formados después de comer alimentos (34). Existen evidencias, que indican que ellos son importantes en la regulación inmune, presentan una función moduladora entre linfocitos TyB (35).

Los complejos inmunes se han detectado por diversos métodos los cuales se resumen a continuación : (31)

Principios para la detección de complejos inmunes

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| Morfología                 | - Microscopia electrónica   |
| Separación por tamaño      | -Ultracentrifugación<br>-Cromatografía en gel   |
| Propiedades fisicoquímicas | -Crioprecipitación<br>-Precipitación con polietilenglicol   |
| Enlace a Antiglobulina     | -Factor reumatoide monoclonal<br>-Factor reumatoide policlonal<br>-Anticuerpos IgM<br>-Anti-Anticuerpos |

Enlace a Complemento	-Actividad anticomplementaria -Clq -Conglutinina
Receptor Enlazante a Célula	-Células Raji (IgG, Fc, (C3b, Clq) ) -Macrófagos (IgG, Fc, C3b) -Polimorfonucleares (IgG, Fc, C3b) -Linfocitos B ( IgG, Fc, C3b ó d ) -Células K ( IgG, Fc) -Plaquetas (IgG, Fc).

PRINCIPIO DEL ENSAYO CON POLIETILEN GLICOL ( PEG )  
Y CONSUMO DE COMPLEMENTO (23).

Paso 1.-separación de las proteínas de bajo peso — molecular de las proteínas de alto peso — molecular, incluyendo los complejos antígeno anticuerpo, por precipitación con PEG-6000 - a 4°C.

Paso 2.-después de centrifugación, los complejos — inmunes son redisueltos y se adiciona com — plemento hemolítico.

Paso 3.-el complemento es activado y consumido de — pendiendo de la concentración de complejos inmunes presentes.

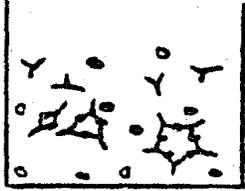
Paso 4.-se adicionan eritrocitos de carnero sensi — bilizados con hemolisina.

Paso 5.-un número finito de eritrocitos es lisado — por el complemento residual.

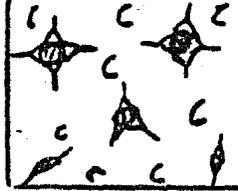
Paso 6.-existe una relación inversa entre la cantidad de hemoglobina liberada y la cantidad de — complejos inmunes presentes .

Diagrama del proceso:

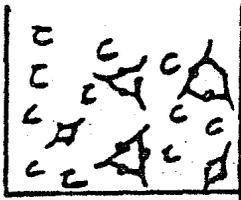
1)



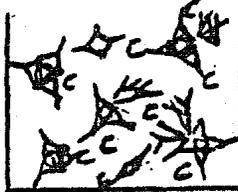
4)



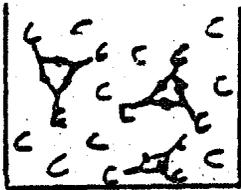
2)



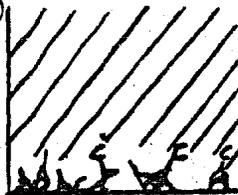
5)



3)



6)



Y=anticuerpo

●=antígeno

○=proteínas del suero

## EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

El término COMPLEMENTO se refiere a un grupo complejo de enzimas en el suero sanguíneo normal, que trabajan junto con los anticuerpos y otros factores, juegan un papel importante como mediadores en las respuestas inmunes y alérgicas. Las reacciones en las que el complemento participa tienen lugar en el suero sanguíneo y en otros líquidos corporales, por lo cual son consideradas reacciones humorales.

El descubrimiento del complemento se llevó a cabo entre 1880 y 1890, de los estudios realizados para observar la capacidad del suero sanguíneo para matar microorganismos. En el descubrimiento de los anticuerpos se encontró que su capacidad para matar bacterias dependía de la colaboración de otros constituyentes del suero: "ALEXIN o COMPLEMENTO". El nombre tiene la intención de indicar que el agente ayuda al anticuerpo a cumplir o realizar sus funciones defensivas. Ahora se reconoce que las células son atacadas por el complemento y que la función del anticuerpo es identificar a la célula invasora como un cuerpo extraño y activar el ataque del complemento.

Cuando el complemento es activado por el anticuerpo se presenta una seria amenaza, no sólo por la invasión de microorganismos, sino también de que las células propias pueden ser susceptibles de ataque. Esta autodestrucción es minimizada por el hecho

de que los anticuerpos fijan el complemento en la superficie de la célula invasora. Así tenemos que los anticuerpos tienen 3 funciones:

- 1.-reconocer al invasor extraño
- 2.-la activación del sistema de complemento
- 3.-fijación del complemento en la superficie de las células invasoras.

Por su parte el sistema de complemento debe llenar tres requisitos:

- 1.-debe tener una unidad de reconocimiento de lo propio, así como poder responder a las moléculas de anticuerpo que han detectado al invasor extraño.
- 2.-debe tener un sitio de recepción para la combinación y que ensamble en la superficie de la célula extraña cuando ha sido activado.
- 3.-orden para minimizar el daño a lo propio y la actividad debe ser limitada en tiempo.

Esta limitación es llevada a cabo en parte por, - la degeneración de la actividad del complemento y en parte por la interferencia de inhibidores y enzimas destructivas.

Cuando el sistema inmune actúa en actitud antagonista en contra de un microorganismo el resultado es de protección, pero cuando es en contra de células propias, el resultado es un quebrantamiento de los sistemas del cuerpo. Estos quebrantamientos es lo que se conoce como alergias o reacciones de hipersensibilidad.

## Las proteínas del complemento

Hay 11 proteínas en el sistema del complemento y se designan por la letra C y por un número que va del 1 al 9. La proteína C1 es un ensamblaje de subunidades designadas como C1q, C1r, C1s.

De los estudios de Irwin H. Lepow de la Universidad de Connecticut se conoce que las subunidades son mantenidas juntas por otro tipo de enlaces que no son las uniones covalentes usuales, y que el ión  $Ca^{++}$  es necesario para mantener el ensamblaje intacto. El ensamblaje entero se cree que consiste en una molécula de la subunidad C1q, dos moléculas C1r, y cuatro de C1s.

Los números asignados para las proteínas de complemento reflejan la secuencia en la que ellos comienzan a activarse, con excepción de la C4 que reacciona después de C1 y antes de C2.

Las proteínas del complemento ahan sido separadas en forma pura. La concentración de cada una en el suero sanguíneo humano se ha determinado gracias a la movilidad electroforética y con su peso molecular. La molécula de C1q contiene un aminoácido inusual, hidroxiprolina. También contiene una gran cantidad de glicina y cantidades sustanciales de carbohidratos, (probablemente galactosa y glucosa), lo cual sugiere una composición similar a la del colágeno, que es la principal proteína del tejido conectivo. En la explicación de las funciones respectivas de las 11 proteínas en el sistema de complemento es conveniente dividir la discusión en-

tres partes: Reconocimiento, Activación enzimática y el ataque por factores de complemento que resultan con la destrucción de la célula.

#### RECONOCIMIENTO.

La unidad de reconocimiento del sistema de complemento es la molécula Clq la cual tiene la capacidad de recombinarse con un segmento de la molécula de inmunoglobulina, la cual enlaza a la molécula del antígeno ( figura A ).

Los anticuerpos en el momento en que se combinan con el antígeno cambian, y este es el responsable de la conversión del factor complemento C1 de una enzima inactiva a activa. El sitio activo de la enzima es sobre la C1s (designada barrera de activación). Esto indica que la subunidad C1r tiene un papel como agente intermedio entre Clq y C1s en el proceso de activación. — C1s es una enzima.

#### ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

El segundo período involucra a los factores de complemento C4, C2 y C3. Su activación es iniciada — por la enzima C1s que activa al componente C4, el cual llega y se pone en contacto con la subunidad C1s (fig. B y C), C4 se rompe en dos partes C4a y C4b, éste último se fija a la superficie de la membrana celular (D).— El siguiente paso involucra la adsorción de C2 al — componente C4b, esta adsorción es promovida por sales de  $Mg^{++}$  (figura E). La siguiente adsorción de la molécula C2 es a partir de C1s vecina, C2 se divide en 2 y el fragmento C2a combinado con C4b forma una enzima —

que divide a C3 en dos fragmentos (figura F), uno C3a es liberado y juega un papel como dedizador de la inflamación. El fragmento C3b queda ligado, parte de él a la superficie de la célula, jugando un papel importante como promovedor de la fagocitosis. La otra parte — de C3b se fija a la enzima C4b2a (figura G), formando una nueva enzima que tiene la capacidad de dividir a C5 (figura H). La enzima C4b,2a es bastante estable a 0°C, su vida media es cerca de 10 hrs a 37 °C. Pierde su actividad y el fragmento C2 que contribuye al sitio enzimático también es liberado de la enzima C4b,2a,3b. Este decaimiento del proceso puede ser visto como uno de los factores que limitan la capacidad de el sistema de complemento al ataque de la célula huésped. El componente C5 es activado a través de la enzima C4b,2a,3b y es dividido (figura H) en C5a que es liberado y tiene un papel como mediador en la inflamación. El fragmento C5b permanece sobre la enzima C4b,2a,3b para activar — la fijación de los componentes C6 y C7 (figura I). El complejo C5b,6,7 se fija a la superficie de la célula en un nuevo sitio (figura J), liberando a la enzima C4b,2a,3b.

#### ATAQUE CELULAR

La secuencia al ataque celular es iniciada con la participación de C5, una vez formado el complejo C5b,6,7 se combina C8 primero con la subunidad C5b del complejo C5b,6,7, y entonces se une C9.

Los componentes del complejo C5b,6,7,8,9 se con-

gregan semejando un camino, como una pequeña abertura a través de la membrana permitiendó que nuevos iones- puedan pasar (figura K).

La adición de C9, facilita el agrandamiento de la abertura y la rapidez de la corriente de agua aumenta, los iones de la célula también causando hinchamiento - y rompimiento celular.

FIGURAS QUE ESQUEMATIZAN LA SECUENCIA DEL /  
COMPLEMENTO

Figura A

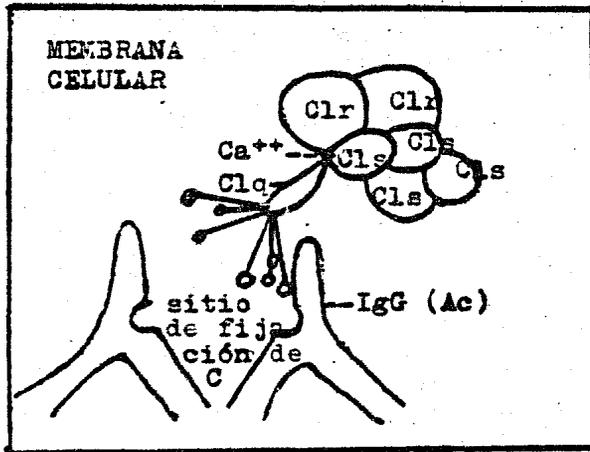




Figura H

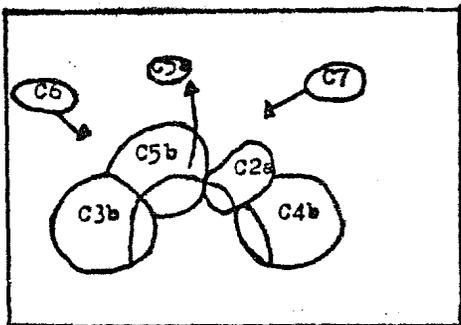


Figura J

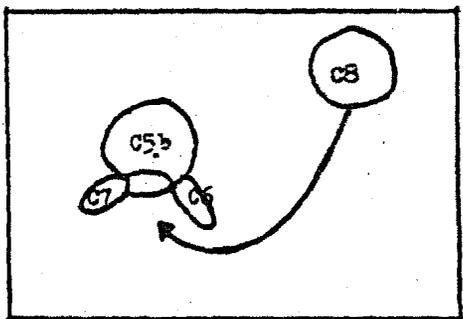


Figura L

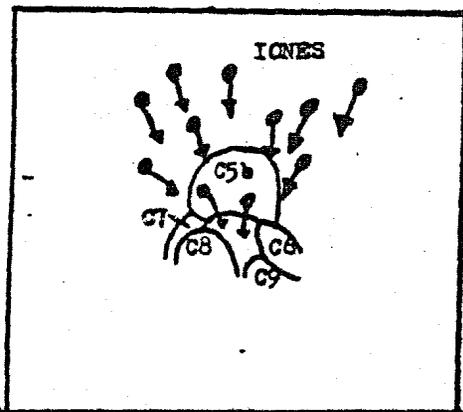


Figura I

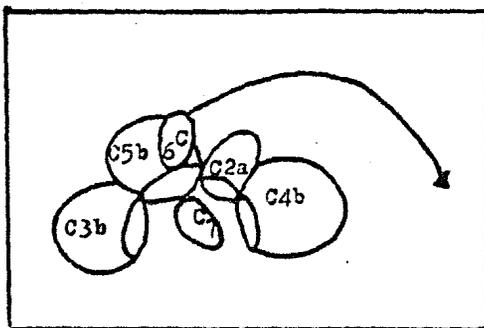
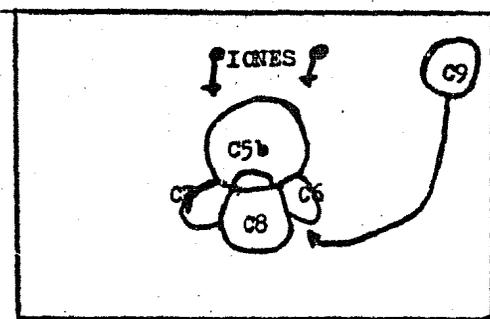


Figura K



## LA VIA ALTERNA O PROPERDINA

Es activada por polisacáridos y por agregados -- de IgA. Consiste de 5 proteínas distintas: el factor-iniciador (IF), proactivador(PA), tercer componente - de complemento (C3), proactivador convertasa (Pase) y properdina.

La vía alterna de activación de complemento se - define como aquella que comprende las proteínas del - plasma, después de un evento disparador. Interactúa de forma específica C3, y C5 convertasa sin la partici - pación de los componentes C1, C2, y C4 de la vía clá-- sica.

Las actividades biológicas en las cuales inter-- viene la via properdina son;

- a)defensa humoral contra bacterias
- b)inactivación de virus suceptibles
- c)lisis de eritrocitos de pacientes con hemoglobinu-- ria nocturnal
- d) muerte del protozoario Toxoplasma Gondii.

### MECANISMO DE ACCIÓN

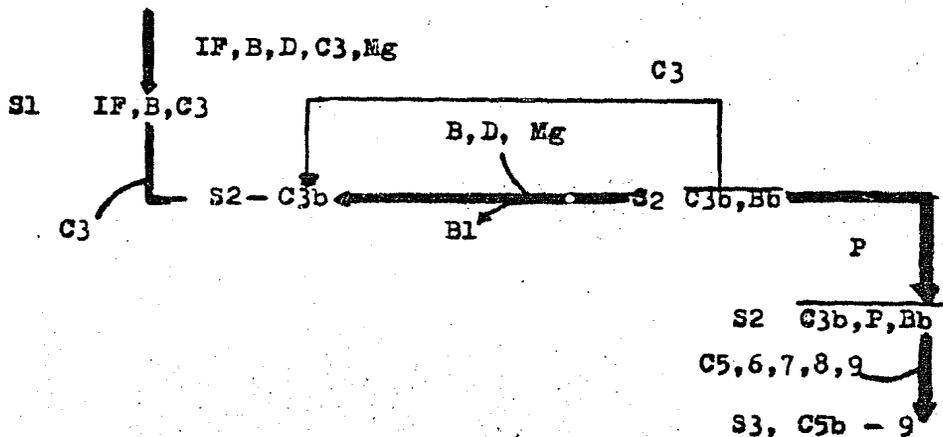
Aparentemente hay una síntesis constante de C3b - en cantidades muy pequeñas en la circulación. La enzima que causa esta producción no se ha identificado, sin - embargo se sospecha de un complejo laxo de C3 nativo - y el factor B así como enzimas de la coagulación o de - los sistemas fibrinolíticos, o enzimas tisulares.

La mayor parte del C3b de nueva síntesis permanece en la fase líquida, pero cierta cantidad se fija a diversas superficies celulares.

Existe un equilibrio entre el C3b generado e inactivado, el cual se rompe por la introducción de activadores. El C3b depositado sobre los activadores es protegido de la destrucción que realizan el inactivador de C3b y el acelerador del inactivador de C3b. Este C3b protegido unido a la membrana, interactúa con los factores B y D formando una enzima C3bBb, esta es capaz de fragmentar cantidades muy grandes de C3. Un volumen considerable de este C3b recientemente sintetizado llega a la superficie del activador, interactúa con factores B y D adicionales y forma más C3bBb. Las moléculas de la enzima C3bBb se hacen funcionalmente más eficaces en presencia de properdina, la cual se fija al complejo y lo estabiliza mediante disminución espontánea del factor B.

Muchas de las moléculas de C3b sintetizadas por las enzimas unidas a la superficie C3bBb ó C3b, P, Bb se fijan a la superficie de la partícula activadora y en estrecho contacto con estas enzimas. Esto conduce a la formación de las enzimas modificadas C3bnBb ó C3bn, P, Bb, las cuales son capaces de desdoblar a C5 y de iniciar el mecanismo de ataque a la membrana (figura 4).

Substancia activadora



S = partícula activada

l = factor iniciador

C3= tercer componente de complemento

B ó PA = proactivador

D ó PAs= proactivador convertasa

P = properdina

C3bINA ó KAF = C3b inactivador

A-C3bINA ó BLH = C3b acelerador del inactivador

Figura 4

## LOS INSECTICIDAS

El uso de los insecticidas se ha incrementado -- en los últimos años, en relación al incremento de la población, la necesidad de alimentos, la protección de la salud (enfermedades transmitidas por insectos) y la conservación de áreas verdes (24). Sin embargo -- se ha abusado de su utilización. El uso de insecticidas involucra problemas inherentes como:

-efectos atribuibles a los residuos tanto en el área -- donde se aplican como a una distancia considerable de dicho sitio.

-problema de acumulación biológica a través de la ca -- dena alimenticia (25).

DDT

Químicamente es: Diclodifeniltricloroetano ó ---  
1,1,1,-tricloro-2,2-bis(clorofeniletano).



Fué sintetizado en 1874 por Othmar Zeidler , pero no -- se le reconoció como insecticida hasta 1939 por Paul -- Hermann Müller (26).

### Propiedades:

Cristales incoloros o polvos blancos, inodoro - o con olor ligeramente aromático, insoluble en agua, - soluble en acetona, etér, benceno, tetracloruro de - carbono, Keroseno, dioxano, piridina, muy liposoluble (27).

### Toxicidad:

En mamíferos es moderadamente tóxico cuando se - ingiere por vía oral. DL50 en ratas Winstar por ésta - vía 200 mg/Kg

La toxicidad en pájaros es más baja que en ma - míferos, es tóxico para peces, algunas especies son - incapaces de sobrevivir en medios que contengan 0.01 ppm de DDT. Siendo mayor la toxicidad en peces a tem - peratura baja (26). En humanos causa toxicidad a --- dosis de 16-28 mg/Kg presentando vómitos inmediatos y convulsiones (28).

### Metabolismo:

El DDT sufre biotransformación por enzimas que - se encuentran en la fracción microsomal del hígado de mamíferos, como por bacterias del medio ambiente.

### Usos:

Se emplea para plantaciones de algodón, del tabaco, - contra plagas de alimentos, contra insectos transmis - ores de enfermedad , en el hogar.

## TOXAFENO

Es una mezcla compleja de derivados clorados del canfeno, contiene de 67 a 69 % de cloro, y al parecer está formada por lo menos de 177 compuestos— su formula condensada es  $C_{10}H_{10}Cl_8$ (24)

### Propiedades:

Sólido céreo, de color ambár con débil olor a cloro y alcánfor, p.f.=65-90°C, densidad 1.66(27°C ). Soluble en disolventes orgánicos comunes, muy liposoluble en agua solo a la concentración de 3 ppm. Es estable en solución, los alcális, la luz solar y temperatura mayor de 155°C, producen dechlorinación(27).

### Toxicidad:

En animales es más tóxico que el DDT (29). DL50 en ratas vía oral 160-120 mg/Kg, altamente tóxico para perras ( DL50=50 mg/Kg ),(24). Administrando toxafeno por vía oral a ratas y a ratones preñados (30) durante el período de la organogénesis se observó una toxicidad fetal a las dosis de 15.25 y 35 mg/Kg, también se observó una disminución del peso de las madres en relación directa con el nivel de dosis.

### Metabolismo:

El toxafeno se metaboliza en el organismo de ratas y se excreta en heces y orina, en general sufre dechlorinación.

### Usos:

Insecticida para lechugas y coles en los primeros momentos del crecimiento.

C A P I T U L O 11

## R E S U M E N

En el presente trabajo se realizó una intoxicación crónica, durante 122 días con los insecticidas DDT y Toxafeno, se utilizaron 72 ratas macho cepa winstar, administrandoles diariamente dosis previamente calculadas de acuerdo a su peso, el cual fué verificado cada 4 días, llevando así un control de éste.

La administración se realizó por medio de una sonda gástrica. Se realizaron 4 determinaciones:

- a los 68 días de administrar Toxafeno
- a los 112 días de administrar DDT
- a los 116 días de administrar Toxafeno
- a los 122 días de administrar DDT.

Las determinaciones fueron:

- rosetas EA (receptor Fc) y EAC (receptor C3b)
- titulación de complemento en unidades 50% hemolíticas
- determinación de complejos inmunes.

## FUNDAMENTACIÓN DE LA ELECCIÓN DEL TEMA

Sabemos del uso indiscriminado en el país, de los pesticidas, y también que las plagas se vuelven cada vez más resistentes a éstos, en consecuencia cada vez se incrementa más la dosis mínima de insecticida tolerada por el hombre, lo cual repercute en la salud del personal encargado de la aplicación de insecticidas, ya que a estas personas no se les proporciona la debida protección .

Conocemos el uso del DDT y Toxafeno como insecticidas, principalmente el DDT en el hogar y el Toxafeno a nivel agrícola. Se han realizado estudios (18,22) en los cuales se han encontrado que estos insecticidas:

- a) se acumulan en los tejidos del organismo expuesto a ellos, principalmente en la porción lipídica(17)
- b) producen daño hepático (24)
- c) posiblemente pueden ser inductores de cáncer y de algunas mutaciones.(19,20,21) .

Sin embargo no se han realizado estudios a nivel inmunológico, por lo cual el presente trabajo está enfocado a demostrar la influencia tóxica de estos 2 insecticidas sobre la respuesta inmune, basandose en los estudios anteriormente realizados.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El toxafeno y DDT se han utilizado por mucho tiempo sin que hayan presentado problemas serios en la población general. Sin embargo se ha demostrado que producen daño hepático y que es más hepatotóxico el Toxafeno que el DDT (24).

Sabemos del uso indiscriminado en el país y la poca protección que hay para el personal encargado de su aplicación en el campo. Probablemente con la demostración del daño producido a nivel inmunológico, las precauciones se extremen al aplicar dichos insecticidas.

## O B J E T I V O S

### OBJETIVOS GENERALES:

- Poner de manifiesto que la toxicidad inducida por los insecticidas Toxafeno y DDT, tiene implicaciones — inmunológicas.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS :

- Cuantificar poblaciones linfoides por el método de — rosetas EA y EAC
- Determinación de complejos inmunes por precipitación — con polietilen glicol y consumo de complemento.
- Titulación de complemento en unidades 50% hemolíticas.

## H I P O T E S I S

La intoxicación inducida por DDT y Toxafeno altera la respuesta inmune, por lo que se espera encontrar:

- modificaciones en las poblaciones linfoides
- un aumento en la formación de complejos --  
inmunes.
- disminución en la actividad hemolítica del  
complemento.

C A P I T U L O III

## PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIAL

- pipetas de 1.5 y 10 ml.
- pipetas Pasteur
- tubos de esnsye de 13X100 mm.
- probetas de 50 y 100 ml y 1000 ml.
- cámaras de Newbauer
- pipetas para globulos blancos
- boquillas
- flask 25 cm<sup>2</sup> 30 ml . Lux Scientific Corporation  
(cajitas para cultivo de tejidos, estériles)
- cubre hematímetros
- estuche de disección
- gradillas
- jaulas para ratas
- matraces Erlenmeyer de 1 lt, 500 ml y 250 ml.
- vidrios de reloj
- varilla de vidrio
- papel watman # 1
- platos microtituladores Cat. No 1-220-24 B Cooke  
Lab. Products.
- embudo buchner
- vasos de precipitado de 500, 250 y 1000 ml.
- equipo para microtitulación
- bolsa para dialisis

## EQUIPO

- incubadora Precision Circulating System-253
- centrífuga Mod. J-12 5000 rpm "Sol-Bal" Aparatos Científicos
- vortex
- relog
- bomba de vacío, welch doble sello, Modelo 1410 serie 1234
- microscopio Zeiss West Germany
- espectrofotómetro FM 2 D.L. Zeiss Industrias Carl — Zeiss de México S.A.
- piano, Laboratory Counter Clay Adams Parsippany, N.J. O.7054. división of Becton, Dickinson and Company
- báscula analítica METTER
- potenciómetro
- colector de fracciones 2112 Redirac Fraction Collector LKB Bromma
- refrigerador
- agitador magnético.

## REACTIVOS

-Sephadex g-200 tamaño de partícula 10-40  $\mu$  Lab. Sigma

-DDT Q.P. Geigy

-Toxafeno Q.P. Fertimex S.A.

-DEAE Celulosa

-aceite de cártamo

-Regulador de trietanolamina (TBS) Stock 10X

NaCl ----- 75 g  
MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O----- 1.0 g  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O----- 0.22 g  
Trietanolamina -- 28.0 ml  
agua destilada--- 800 ml

disolver, ajustar el pH con HCL 1.0 N a pH=4 y llevar a 1000 ml.

Solución de trabajo: diluir 1:10 con agua destilada y --  
adicionar gelatina a una concentra  
ción final de 0.05%.

-Preparación del May-Greenwald

diluir por lo menos 100 mg del polvo en 50 ml de al --  
cohol metílico puro. Dejesse reposar una semana antes --  
de usarla.

-Regulador de EDTA 0.2 M pH=7.2

diluir 74.4 g de EDTA disódico en agua destilada y ---  
aforar a 1000 ml.

-Regulador de fosfatos 0.1 M pH=7.0

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O ----- 8.4601 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 5.49 g

disolver en agua destilada y leer el pH, aforar a 1 lt.

-Regulador de boratos 0.125 M pH=8.4

6.18 g de ác. bórico

9.53 g de tetraborato disódico

4.38 g de NaCl

1.0 g de NaN<sub>3</sub> en 1 lt. de agua destilada.

-Regulador salino de fosfatos (PBS) pH=7.4 0.15 M

NaCl -----80g/ lt

KCL ----- 2g/lt

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -----11.5 g/lt

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 2 g/lt

disolver en 1 lt. de agua destilada, es conveniente -  
llevado a una dilución por diez para almacenar y di -  
luir como se requiera.

-Solución salina amortiguada pH 7.4 (SSA)

Sol. A

NaCl ----- 8.0 g

KCL ----- 0.4 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O----- 0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 0.045 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 0.060 g

disolver en 500 ml de agua destilada

Sol. B

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O----- 0.147 g

disolver en 500 ml de agua destilada

Sol. C

glucosa -----1.0 g

disolver en 10 ml de agua destilada y mezclar con ---  
1 lt. de partes iguales de las soluciones A+B.

Sol D

rojo de fenol ----- 0.002 g

disolver en 10 ml de agua destilada y añadir a la ---  
mezcla A+B+C.

Sol. E

tris ----- 19.1 g

disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar a pH=7.4  
si es necesario con ácido clorhídrico, aforar a 1000 ml  
con agua destilada.

Solución de trabajo: mezclar volúmenes iguales de  
la solución E y de la Mezcla A+B+C+D, reajustar el pH-  
a 7.4 si es necesario.

-Polietilen glicol al 11.25% (11.25 g de PEG en 100 ml-  
de regulador de boratos).

-Polietilen glicol al 2.5 % ( 2.5 g PEG en 100 ml de -  
regulador de boratos).

- Dextran azul al 1% en agua destilada
- ácido bórico al 2 % ( 1 lt).
- HCL 1.0 N.
- sulfato de amonio (solución concentrada)
- solución salina de NaCl al 0.2%, 1.6%, 0.85%.
- solución salina 0.15 M
- carbonato de sodio al 2% en agua destilada
- NaOH 0.1 N
- tartrato de sodio o Potasio al 0.02% en agua destilada
- CuSO<sub>4</sub> al 0.5%
- colorante Giemsa diluído 1:10 (500 ml).

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- 72 Ratas macho, cepa Winstar
- eritrocitos de carnero en solución Alsever
- IgM e IgG de Conejo

## MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

### MARCAJE DE RATAS

Se tiene un lote de 72 ratas macho cepa Winstar , las cuales son identificadas en cada jaula de la siguiente manera:

Animales	Marca
1	— cabeza
2	— mano derecha
3	— mano izquierda
4	— pata derecha
5	— pata izquierda
6	— lomo
7	— cola
8	— nada

Distribución de las jaulas:

Normales	# de jaula
	1,4,7
toxafeno	2,5,8
DDT	3,6,9

### PREPARACIÓN DE LOS AGENTES DDT y TOXAFENO EN SOLUCIÓN

Se preparan 2 soluciones en aceite de cártamo , - una Toxafeno (8.25 mg/ml) y otra de DDT (15 mg/ml), - estos mg equivalen al 15% de la DL50, de cada uno de los insecticidas, empleando para el cálculo el peso máximo aproximado de las ratas (500 g), con el fin de aplicar dosis no mayores de un mililitro.

Calculos:

Toxafeno DL50 = 110 mg/Kg

Toxafeno en solución de xilol al 90%

el 15% de la DL 50 se calculó así:

$(110 \text{ mg})(0.5)=16.5 \text{ mg de Toxafeno/Kg}$

el peso máximo aproximado de las ratas es 500 g -  
ó 0.5 Kg , para preparar un litro de solución tenemos:

$(16.5 \text{ mg/Kg})(0.5 \text{ Kg})=8.25 \text{ mg/ml}$

para un litro necesitamos 8.25 g/lt, a un 90%, pero  
se requiere una solución al 100%, entonces:

8.25 g -----90%

X = g ----- 100%      X= 9.1 g/lt ó 9.1 mg/lt de -  
Toxafeno

Por lo tanto se necesitan 9.1 g de Toxafeno para  
un litro de aceite de cártamo.

DDT

DL50 = 200 mg/Kg

El 15% de esta dosis se calculó así:

$(200 \text{ mg})(0.15) = 30 \text{ mg/Kg}$

El peso máximo de las ratas es 500 g.

Para preparar un litro de solución tenemos:

$(30 \text{ mg/Kg})(0.5 \text{ Kg})=15 \text{ mg de DDT}$

Por lo tanto , tenemos que para 1 lt. se nece ---  
sitan 15 g de DDT.

## APLICACION DE LOS INSECTICIDAS

Se les aplicó diariamente la dosis correspondiente de acuerdo al peso del animal por sonda gástrica, introduciendo la sonda por el esófago. El peso de los animales se registró cada 4 días, y antes de ser sacrificadas también se pesaron.

Para cada determinación se emplearon lotes de 5 ratas normales y 5 intoxicadas, sólo la última determinación se efectuó con un lote de 7 ratas intoxicadas.

### FORMACION DE ROSETAS

#### INMUNIZACION DE RATAS PARA OBTENER IgG E IGM ANTI-GRC (36).

Se inmunizó con 0.5 ml de GRC al 10% por via intravenosa a 8 ratas, siguiendo el siguiente esquema :

Inyección	Tiempo (día) 0	Dosis
1		0.5 ml GRC
2	2	
3	4	0.3 ml
4	6	0.3 ml
5	8	0.3 ml
6	10	0.5 ml
7	12	0.5 ml
8	14	
9	16	
sangrado	22	sangrar a blanco

Nota: los globulos rojos de carnero se prepararon a 1 mg/peso/ml.

Una vez transcurrido el tiempo, las ratas fueron sangradas a blanco, por incisión axilar, obteniendose el suero, se determinó el título de hemaglutinación. Posteriormente se procedió a obtener la IgG e IGM.

## OBTENCIÓN DE IGM POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA OBTENER IGM de Conejo(3)

1)a un litro de ácido bórico(al2%), adicionar gota a gota con agitación 50 ml de suero, el cual se ha clarificado previamente y liberado de lípidos de la siguiente manera:

-centrifugar a 1000 rpm/30 min. para eliminar lípidos, se forma un disco en la parte alta del tubo, el cual es eliminado, y de inmediato se filtra el suero por un embudo y un papel filtro Watman # 1.

2)deje la mezcla de suero-ácido bórico a temperatura ambiente por 30 min. ( con agitación).

3)centrifugar a 2000 rpm/5 min. a temp. ambiente.

4)guardar el sobrenadante, dejando invertidos los tubos sobre un papel filtro para que permita el drenado del líquido residual.

5)adicione 1 ml de amortiguador de fosfatos a 1 tubo y combine los sedimentos de los tubos con otro ml, realice lo mismo dando otra lavada,(en los sedimentos esta IGM).

6)montar una columna de Sephadex G-200 y correr la columna con amortiguador PBS pH= 7.4 0.15 M.

NOTA: Partículas mayores de PM=200 000 salen primero de la columna de Sephadex G-200, y las partículas menores pasan a absorverse en los poros del Sephadex, por lo tanto tardarán más en salir de la columna.

## PREPARACIÓN DE LA COLUMNA

- 1) pesar 17 g (peso seco) de Sephadex G-200
- 2) en un matraz erlenmeyer de 1 lt. agregar 750 ml de PBS, y el Sephadex previamente pesado.
- 3) colocar el matraz dentro de un baño de agua hirviendo durante 5 hrs , agitando continuamente (esto -- provee suficiente gel embebido para una columna de 100X2.5 cm).
- 4) pasadas 5 horas enfriar a temperatura ambiente y -- limpiar de partículas finas el Sephadex, de la -- siguiente manera:
  - a)dejar sedimentar el gel durante 30 min
  - b)tirar el sobrenadante y resuspender el sedimento -- en 500 ml de PBS pH=7.4 0.15 M
  - c)repetir los pasos a y b 3 veces
  - d) la última vez, después del paso b se resuspende en el volumen original (750 ml de PBS).
- 5) vertir el gel dentro de la columna a lo largo de -- una varilla de vidrio para evitar burbujas de aire, cuidar que la columna este vertical y no se mueva. -- vertir todo el gel dentro de la columna.
- 6) permitir el asentamiento del gel en la columna,( 5 hrs aproximadamente).
- 7) una vez que el gel ha sido asentado colocar el -- adaptador de flujo.
- 8) empaquetar la columna por corrimiento de 2 volúmenes de PBS por la columna. La velocidad del flujo debere ser cercana a. 20 ml/h.

- 9) ya empaquetada la columna colocar sobre la superficie una red de nylon que la cubra perfectamente, seguida de PBS.
- 10) evitar dejar secar la superficie de la columna, y antes de que esto suceda, aplicar 2 ml de dextran azul al 1% para conocer el volumen vacío.
- 11) una vez que conocemos el volumen vacío, y sin dejar secar la superficie de la columna, aplicar la muestra.

#### APLICACIÓN DE LA MUESTRA

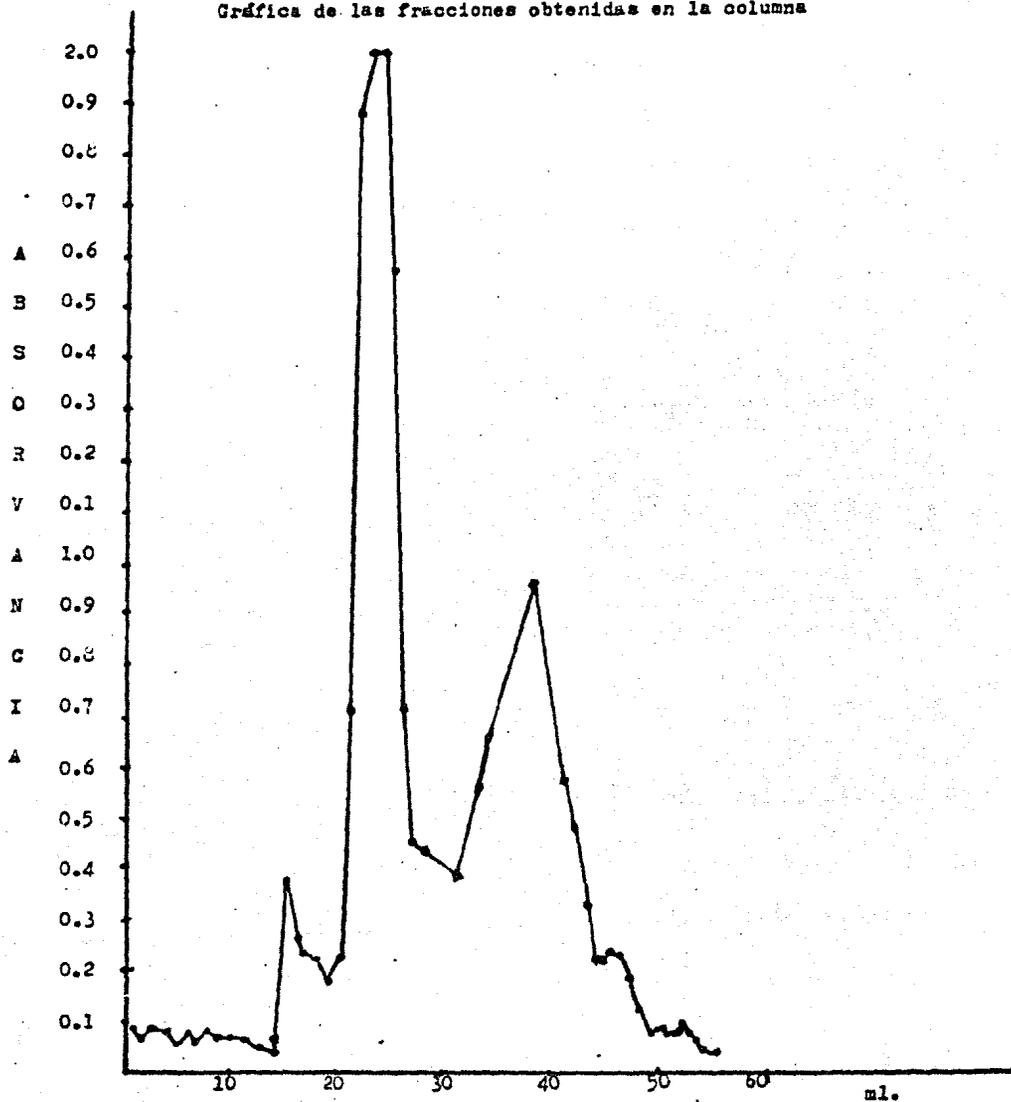
- 1) Aplicar 3 ml de muestra (IgM conejo anti GRC) con una pipeta Pasteur larga, evitando alterar la superficie de la columna, ya que esto causa distorsión de las bandas y por lo tanto una mala separación.
- 2) dejar correr la columna a razón de 30 gotas/ min.
- 3) coleccionar las fracciones, en cada tubo, aproximadamente 1.5 ml.
- 4) posteriormente leer en el espectrofotómetro a 280 nm cada tubo, y realizar la gráfica absorbancia VS-ml.

Valores obtenidos en el espectrofotómetro a 280 nm.  
(ajustar a cero con PBS ).

Tubo#	lectura	Tubo #	Lectura	Tubo #	lectura
1.-	0.081	21.-	0.70	41.-	0.557
2.-	0.068	22.-	1.89	42.-	0.484
3.-	0.075	23.-	mayor de 2	43.-	0.322
4.-	0.062	24.-	mayor de 2	44.-	0.228
5.-	0.063	25.-	1.583	45.-	0.235
6.-	0.067	26.-	0.715	46.-	0.222
7.-	0.053	27.-	0.454	47.-	0.180
8.-	0.068	28.-	0.431	48.-	0.117
9.-	0.055	29.-	-----	49.-	0.074
10.-	0.057	30.-	-----	50.-	0.081
11.-	0.054	31.-	0.382	51.-	0.074
12.-	0.050	32.-	0.446	52.-	0.079
13.-	0.045	33.-	0.551	53.-	0.055
14.-	0.040	34.-	0.663	54.-	0.046
15.-	0.038	35.-	0.548	55.-	0.046
16.-	0.26	36.-	0.661	56.-	0.124
17.-	0.22	37.-	0.808	57.-	0.033
18.-	0.20	38.-	0.961	58.-	0.034
19.-	0.17	39.-	0.643		
20.-	0.22	40.-	0.468		

NOTA: cada tubo contiene 1.5 ml.

Gráfica de las fracciones obtenidas en la columna



( cada tubo contiene 1.5 ml )

## TITULACIÓN DE HEMOLISINA (IgM) POR HEMAGLUTINACIÓN

Una vez realizadas las lecturas en los tubos, (fracciones de la columna) se procede a titular la hemolisina, tomando como muestra problema, los tubos 22, 23, 24, 25, 26.

- 1) colocar una gota de PBS pH=7.4, 0.15 M (gota de 500  $\mu$ l) en cada orificio de la placa.
- 2) introducir un grillo en el primer tubo problema, y realizar 12 movimientos circulares, sacar el grillo del tubo e introducirlo en los siguientes orificios de la placa, realizando en cada orificio, 12 movimientos semi-circulares, dejando el último como testigo.
- 3) realizar lo mismo para todos los demás tubos.
- 4) luego agregar una gota de GRC al 1%.
- 5) incubar 1 hora a 37°C y leer las diluciones.
- 6) en este caso las diluciones fueron: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16
- 7) resultados:

tubos	actividad de anticuerpo
22	No hay
23	1:4
24	1:8
25	1:8
26	1:4

- 8) se mezclaron los tubos 23, 24, 25 obteniéndose una actividad de anticuerpo de 1:16, y un volumen de 4.5 ml.
- 9) a la mezcla se le añadió azida de sodio 0.01 M = 0.035595 g/4.5 ml peso/vol. como preventivo, y se almacenó en el congelador perfectamente tapado.

### OBTENCIÓN DE IgG EMPLEANDO DEAE CELULOSA (3)

- 1) pesar 20 g de DEAE celulosa
- 2) adicionar 400 ml de buffer de fosfato 0.01 M pH=8 a la DEAE celulosa.
- 3) ajustar el pH a 8 con HCL 1.0 N (se adicionan 9 ml - para ajustar el pH).
- 4) una vez ajustada la mezcla a pH=8 se agita y se deja sedimentar 30 min., se remueve el sobrenadante (las partículas finas ) y se elimina.
- 5) resuspender la celulosa en suficiente amortiguador - para llevar un volumen adecuado, donde se pueda repetir el ciclo 2 veces más.
- 6) vacear la celulosa en un embudo buchner, que tiene 2 capas de papel Watman # 1, "seque" durante 30 seg. dejando una pasta húmeda de celulosa
- 7) pese la celulosa en un vaso de precipitado; para 10ml de suero usar 50 g de peso húmedo de celulosa. En éste caso, utilicé 100 g peso húmedo de celulosa.
- 8) mezcle 20 ml de suero con 60 ml de agua destilada a 4°C , mantenga esta mezcla a 4°C, y para equilibrar la temperatura agite cada 20 min. durante 1 hr.
- 9) vacie la mezcla sobre un buchner y lave la celulosa - rápidamente con 3 volúmenes de 20 ml de amortiguador de fosfato pH=8 0.01 M
- 10) los mililitros obtenidos se van a precipitar con -- sulfato de amonio al 33 y 40%.

PRECIPITACIÓN DE IgG (CONEJO) CON SULFATO DE AMONIO -  
CONCENTRADO AL 33% Y AL 40%.

- 1) en una bureta de 50 ml se coloca la mezcla que contiene IgG obtenida del procedimiento con DEAE celulosa (142 ml)
- 2) en un vaso de precipitados de 500 ml se colocan 56.8ml de sulfato de amonio saturado (con el propósito de obtener una concentración final de amonio al 40%).
- 3) con la bureta agregar poco a poco los 142 ml de suero, manteniendo una agitación constante durante todo el proceso.
- 4) se continua agitando durante 15 min, después de terminada la adición del suero.
- 5) centrifugar la suspensión durante 15 min. a 3 000rpm-
- 6) el precipitado obtenido se resuspende en solución salina 0.85% hasta alcanzar el volumen original de suero.
- 7) se repiten los pasos anteriores (1,2,3,4,5) una vez más
- 8) el sedimento de la última centrifugación se resuspende de nuevo al volumen original de suero, y ahora en el paso 2 en vez de colocar en el vaso de precipitados 56.8 ml de sulfato de amonio, colocamos 75 ml, para obtener así una solución de 33% de sulfato de amonio.
- 9) se repiten los pasos 3,4, después de resuspende el sedimento en 15 ml de solución salina y se coloca la suspensión en una bolsa de diálisis.
- 10) introducir la bolsa de dialisis en 4 litros de solución salina al 0.85%, manteniendo agitación constante durante los 3 días que dura éste proceso, cambiando la

solución salina diario .

11)terminada la dialisis vacear ( con pipeta Pasteur ) el contenido de la bolsa en un frasco perfectamente — limpio y seco, agregar entonces azida de sodio a una — concentración de 0.01 M ( 0.03955 g/5 ml ).

1)tapar perfectamente el frasco y guardar en congela-- dor.

13)realizar una hemaglutinación, de la misma manera — que se realizó con la IgM de conejo.

PROCEDIMIENTO PARA SENSIBILIZAR ERITROCITOS DE CARNERO

- RECEPTOR FC -

A 0.2 ml de paquete celular (eritrocitos), se ---  
adicionan 4 ml de SSA (que tiene una unidad subagluti-  
nante de IgG de conejo), mezclar e incubar a 37°C du ---  
rante 30 min., lavar 3 veces con SSA y resuspender al -  
1% en SSA (volumen final 20 ml).

Cálculo:

IgG conejo 1:1600 (título original)

se emplea  $IgG \ 1 + 1599 = 0.01 + 15$  reduciendo más ---  
las cantidades tenemos:  $0.005 \mu l (IgG) + 8 \text{ ml (SSA)}$   
= SSA con 1 unidad subaglutinante.

- RECEPTOR C3b -

A 0.2 ml de paquete celular ( eritrocitos), se ---  
adicionan 4 ml de SSA (que tiene una unidad subagluti-  
nante de IgM de conejo), mezclar e incubar a 37°C ---  
durante 30 min., lavar 3 veces con SSA y resuspender ▽  
en 4 ml de SSA . Añadir 2 ml de suero fresco de rata,-  
diluido 1:40 en SSA y ajustar la suspensión al 1% ---  
(volumen final 20 ml).

Cálculo:

IgM conejo 1:32 (título original)

$0.2 \text{ ml (IgM)} + 6.4 \text{ ml (SSA)} = \text{SSA con 1 unidad sub-}$   
aglutinante ▽

Complemento diluido:

$0.1 \text{ ml ( suero frsco de rata)} + 3.9 \text{ ml SSA.}$

## ROSETAS FC Y ROSETAS C3b

### Procedimiento:

Cosechar macrófagos peritoneales, las ratas son -  
previamente anestesiadas con éter etílico en una cámara  
cerrada. Luego se inyecta a cada rata 30 ml de solución  
salina citrato fría (via peritoneal). De inmediato se -  
agita a la rata con movimientos de arriba hacia abajo -  
(aproximadamente 60 movimientos), para obtener el exuda  
do peritoneal se hace un corte en la cavidad peritoneal  
y se aspira el exudado con una pipeta Pasteur, colec --  
tando el líquido en tubos de ensaye. El exudado perito-  
neal obtenido se centrifuga a 2 000 rpm/5 min., dese . .  
char el sobrenadante y lavar el precipitado con SSA a  
2 000 rpm (2 veces), eliminar el sobrenadante, y para -  
romper los eritrocitos, agregar solución salina al 0.2%  
(1 ml), dejar reposar aproximadamente 20 segundos y ---  
agitar, de inmediato agregar 1 ml de solución salina al  
1.6%, para dejar la solución total isotónica. Posterior  
mente centrifugar a 2 000 rpm/5 min las veces que sea -  
necesario, hasta que el sobrenadante ya no se vea rojo-  
( no haya hemoglobina), se repite el paso anterior.

Posteriormente agregar SSA, y lavar los macrófagos  
obtenidos. Una vez lavados y eliminado el sobrenadante,  
se agregan 4 ml de solución salina amortiguada a los -  
macrófagos obtenidos de las ratas problema y las control  
Ajustar el número de células a  $2 \times 10^6$  cél/ml en medio --  
MEM. Ya ajustadas las células, cubrir toda la superfi -

cie onda con ligeros movimientos, incubar 45 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ . Lavar con SSA 2 veces (después de incubar), para eliminar las células no adherentes, (la SSA debe estar a  $37^{\circ}\text{C}$ , lo mismo que los eritrocitos sencibilizados).

Posteriormente añadir los eritrocitos (previamente sencibilizados) cada uno en la cajita correspondiente, recordar que de cada rata se tienen dos cajitas, una -- debe tener eritrocitos sencibilizados con IgG y otra -- con IgM. Incubar 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y terminado ese tiempo -- lavar con SSA hasta eliminar completamente todos los -- eritrocitos libres, sin permitir que la cajita se seque. De inmediato teñir con Giemsa de la siguiente manera:

- 1.-se agrega colorante May-Greenwald a la placa por -- teñir y se le deja reposar 2 min.
- 2.-se enjuaga el May-Greenwald con agua destilada hasta que del agua desaparezca el color azul.
- 3.-se agrega colorante de Giemsa diluído con agua al -- 10% y se deja reposar por 10 min.
- 4.-se enjuaga con agua de la llave hasta que el agua -- aparezca clara.
- 5.-se deja secar, se rompen las cajitas y se observa al microscopio.

DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES POR PRECIPITACIÓN CON POLIETILEN GLICOL (PEG) Y CONSUMO DE COMPLEMENTO (23).

PREPARACIÓN DE GAMMA GLOBULINA DE RATA AGREGADA POR CALOR

En un vaso de precipitados se suspendieron:

8.3752 ml que contenían 250 mg de gamma globulina de rata + 41.62 ml de SS 0.15 M = 250 mg/50 ml.

El vaso se colocó en un baño de agua a  $63^{\circ}\text{C}/12$  min. Después la solución se enfrió en una baño de hielo y la fracción microagregada se precipitó por adición de 1.675g de sulfato de sodio anhidro, el cual se fue adicionando poco a poco para asegurar la total disolución de éste. En seguida la solución se incubó a  $4^{\circ}\text{C}/1$  hr., y se centrifugó a 3 000 rpm/15 min. para separar el precipitado mismo que fué disuelto en 5 ml de regulador de fosfato 0.1 M, pH=7.0. Luego la solución proteica se dializó contra regulador de fosfatos 0.1 M, pH=7.0 durante 3 días, con 3 cambios de regulador al día. El dializado se centrifugó a 3000 rpm/15 min. y al sobrenadante obtenido se le determinó su concentración de proteínas por el método de Lowry, finalmente se guardó en un tubo perfectamente cerrado, y en el congelador.

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS POR EL MÉTODO DE LOWRY (37)

- Reactivo A  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% + tartrato de Na ó Potasio al 0.02% en NAOH 0.1 N.
- Reactivo B  $\text{CuSO}_4$  al 0.5% en agua
- Reactivo C 50 ml de A + 1 ml de B
- Reactivo D Folin sin diluir.

Procedimiento:

- 1.-en un tubo de ensaye agregar 1 ml de muestra problema + 3 ml del Reactivo C, dejar reposar 10 min. y adicionar 0.1 ml del reactivo D, dejar reposar 30 min. y leer a 600 nm.
- 2.-En otro tubo preparar un control con 50  $\mu\text{g}$  de proteina/ml y tratar esté control como problema.
- 3.-leer contra un blanco que lleva 1 ml de agua destilada + 3 ml de reactivo C y 0.1 ml de reactivo D.

Valores obtenidos:

lecturas

50  $\mu\text{g}$  (control) ----- 0.2 D.O.

problema ----- 0.35 D.O.

Cálculo

50  $\mu\text{g}$  /ml control ----- 0.2 D.O.

X=? ----- 0.35 D.O.

X= 87.5  $\mu\text{g}$ /ml = 0.0875 mg/ml de gamma globulina de rata agregada por calor.

COMPLEJOS INMUNES POR PRECIPITACION CON POLIETILEN

GLICOL (PEG) Y CONSUMO DE COMPLEMENTO (23)

1) a 0.5 ml de suero o plasma adicionar:

0.1 ml de regulador de boratos, 0.125 M pH=8.4 ó 8.6

0.1 ml de regulador de EDTA 0.2 M pH=7.2

2) incubar a 37°C durante 15 min.

3) agregar 0.2 ml de polietilen glicol al 11.25% en regulador de boratos.

4) incubar a 2°C durante 90 min. en baño de hielo

5) centrifugar a 3 200 rpm durante 15 min.

6) lavar el precipitado por 2 veces con PEG a una concentración del 2.5%. Centrifugar a 3 200 rpm/15 min.

7) resuspender el sedimento en 1.96 ml de regulador de trietanolamina (TBS) y adicionar 0.04 ml de complemento (suero fresco).

8) incubar a 37°C durante 30 min. en baño maria, preparar los controles siguientes:

Control 1 : 1.90 ml de TBS  
0.10 ml de complemento

Control 2 : 1.87 ml de TBS  
0.03 ml de GGA  
0.1 ml de complemento

9) dividir el volumen en 2 porciones idénticas de ( 1 ml c/u) y adicionar 0.8 ml de TBS y posteriormente 1.2 ml de una suspensión al 1% de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina.

Preparar 2 testigos

Testigo ( - )

Testigo ( + )

2.8 ml de TBS  
1.2 ml de eritros.  
sencibilizados.

1.2 ml de eritros.  
sencibilizados

10)incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. con agitación lenta y constante.

11)adicionar a todos los tubos 1 ml de TBS en frío . A excepción del tubo testigo(+) al que se le adicionan 2.8 ml de agua destilada.

12)centrifugar a 2 000 rpm durante 10 min.

13)leer el sobrenadante a 550 nm contra el sobrenadante del tubo testigo (-).

14) calcular el porcentaje de hemólisis que presenta cada tubo en relación al testigo (+) (100% de hemólisis)

15)sobre un papel semilogarítmico de probitas graficar la relación entre los porcentajes de hemólisis ( - abcisas ) y la cantidad en ml de suero diluido que se añadió a cada tubo (ordenadas).

16)unir los puntos con una línea recta y determinar el volumen del suero que produce un 50% de hemólisis.

17)calcular las unidades 50% hemolíticas por ml de suero diluido.

## TITULACIÓN DEL COMPLEMENTO EN UNIDADES 50% HEMOLITICAS

### Procedimiento:

- 1.-lavar 3 veces en la centrífuga a 1500 rpm durante 5 min. , los glóbulos rojos de carnero, en TBS y preparar una suspensión al 2% en TBS (200 ml).
- 2.-ajustar la suspensión en una celda del espectrofotómetro de la siguiente manera : mezclar 0.6 ml de la suspensión de eritrocitos al 2% y 3.4 ml de agua -- destilada. El 100% de hemólisis debe dar una D.O. - de 0.5, ( leer a 550 nm. utilizando un blanco de agua destilada), si no se obtiene esta lectura se corrige el volumen, mediante la siguiente ecuación.

$$D.O. 1 \times V1 = D.O.2 \times V2$$

$$V2 = \frac{D.O.1 \times V1}{D.O. 2} = 0.5$$

- 3.-a 10 ml de la suspensión anterior se le adiciona -- un volumen igual de hemolisina previamente titulada ( 2 U 50% H ) en TBS. Mezclar bien e incubar a 37°C durante 30 min. con agitación frecuente. Transcurrido este tiempo se saca el matraz del baño y de esta manera tenemos los eritrocitos sensibilizados a una suspensión del 1%.
- 4.-se hacen una dilución del suero problema ( 1:15) - en TBS de la siguiente manera :

$$0.1 \text{ ml} + 1.4 \text{ ml de TBS} = 1:15$$

suero

Se colocan en baño de hielo los tubos, utilizando -

2 tubos para cada suero problema y 2 para los testigos de la prueba.

Tubos	Dilución 1:15	eritrocitos sencibilizados	TBS
1	problema	1.2 ml	0.8 ml
.			
.			
T (+)	---	1.2 ml	---
T (-)	---	1.2 ml	---

5.- Se mezclan todos los tubos y se incuban a 37°C - durante 30 min. con agitación frecuente.

6.-sacar los tubos y adicionarles a todos 1.0 ml de TBS frío, excepto al testigo positivo al cual se le pone 2.8 ml de agua destilada , agitar los tubos.

7.-centrifugar los tubos a 1 500 rpm/5 min.

8.-leer los sobrenadantes a 550 nm usando como blanco - el tubo testigo (-).

9.-calcular para cada tubo el porcentaje de hemólisis - en relación con el testigo (+).

C A P I T U L O \_ I V

## R E S U L T A D O S

### PROBABILIDAD DE MANN WHITNEY

- 1.-Se tienen 2 grupos, uno de ratas normales y otro -  
de ratas intoxicas.
- 2.-Cada grupo esta determinado de cierto número de ---  
elementos, que son  $n_1$  y  $n_2$  respectivamente.
- 3.-A cada elemento de ambos grupos se les enumera en-  
orden progresivo, de acuerdo a sus valores que pre-  
sentan, asignándoles una numeración como la siguien-  
te: 1,2,3, .... etc.
- 4.-En el caso de que 2 ó más elementos sean iguales, -  
los números correspondientes del orden progresivo -  
se suman entre si y se dividen entre el número de -  
elementos, es decir, si los números que les corres-  
pondían eran 4,5,y 6, se suman estos y se dividen -  
entre el número de elementos, en este caso es 3, a  
estos se les asigna el valor obtenido, y al siguien-  
te elemento en el orden progresivo se le pone el nú-  
mero siguiente, en este caso es el número 7 y así -  
sucesivamente.
- 5.-Obtenido el orden creciente de ambos grupos, se ---  
procede a sumar los números de orden creciente de -  
cada grupo por separado.
- 6.-A la suma de cada grupo se le designa con la letra  
R. R1 corresponde al grupo de los normales y R2 al  
de los intoxicados.

7.-Se les aplica la siguiente relación para encontrar  $U_1$  y  $U_2$ .

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 ( n_2 + 1 ) - R_2$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 ( n_1 + 1 ) - R_1$$

8.-Obtenidos los valores de  $U_1$  y  $U_2$ , se toma el menor

9.-En las tablas de probabilidad de Mann Whitney (40)-  
buscar el número de intersección de  $n_1$  y  $n_2$ .

10.-Si el valor de  $U$ , es menor ó igual que el obtenido  
en tablas, estadísticamente los grupos son diferen-  
tes, con una "  $P < 0.05$  ".

## E J E M P L O

Intoxicación con Toxafeno a los 68 días.

Rosetas EA ( receptor Fc)

Grupo NORMALES

$U_1$

0 ---- 1

1 ---- 5

1 ---- 5

1 ---- 5

2 ---- 9.5

$n_1 = 5$   $R_1 = 25.5$

Grupo INTOXICADAS

$U_2$

1 ---- 5

1 ---- 5

2 ---- 9.5

1 ---- 5

1 ---- 5

$n_1 = 5$   $R_2 = 29.5$

Sustituyendo en la relación se tiene:

$$U_1 = (5)(5) + 1/2 \cdot 5(5+1) - 25.5 = 40 - 25.5 = 14.5$$

$$U_2 = (5)(5) + 1/2 \cdot 5(5+1) - 29.5 = 40 - 29.5 = 11.5$$

Se elige  $U_2 = 11.5$ , siendo el menor.

El número de intersección en tablas de  $n_1 = 5$  y  $n_2$  es 2 .

El valor de  $U_2$  es mayor al encontrado en tablas por lo tanto, los grupos son estadísticamente no diferentes "  $P > 0.05$ " siendo no significativo .

Intoxicación con Toxafeno

a los 68 días				a los 116 días			
Rosetas EA (receptor Fc)		Rosetas EAC (receptor C3b)		Rosetas EA (receptor Fc)		Rosetas EAC (receptor C3b)	
N	I	N	I	N	I	N	I
0	1	5	1	1	1	2	6
1	1	5	1	1	2	4	2
1	2	1	1	2	1	4	2
1	1	1	0	17	4	14	5
2	1	1	1				
$\bar{X} = 1$	$\bar{X}=1.6$	$\bar{X}=2.6$	$\bar{X}=0.8$	$\bar{X}=5.25$	$\bar{X}=2$	$\bar{X}=3.5$	$\bar{X}=3.25$
S=0.7	S=0.89	S=2.19	S=0.44	S=7.84	S=1.41	S=1	S=1.89
$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=5$	$n_1=5$	$n_1=4$	$n_2=4$	$n_1=4$	$n_1=4$
$R_1=25.5$		$R_1=34$		$R_1=18.5$		$R_1=19$	
$R_2=29.5$		$R_2=21$		$R_2=10.5$		$R_2=17$	
$U_1=14.5$		$U_1=6$		$U_1=7.5$		$U_1=7$	
$U_2=11.5$		$U_2=9$		$U_2=15.5$		$U_2=9$	
$n_1/n_2 = 2$	de tablas			$n_1/n_2=0$			
$U_2 > 2$	$U_1 > 2$			$U_1 > 0$	$U_1 > 0$		
no significativo				No significativo			

N = Normales

I = Intoxicadas

Gráfica (1)

Gráfica (2)

C O M P L E M E N T O

EN UNIDADES 50% HEMOLITICAS ( CU50~~H~~ )

Ratas intoxicadas con Toxafeno  
a los 116 días (dilución L:15)

Normales

2  
0  
2.3  
0

$$\bar{X} = 1.075$$

$$S = 1.24$$

$$n_1 = 4$$

$$R_1 = 15$$

$$U_1 = 5$$

Intoxicadas

1.8  
0  
2.8  
2.8

$$\bar{X} = 1.85$$

$$S = 1.32$$

$$n_2 = 4$$

$$R_2 = 21$$

$$U_2 = 11$$

$5 > 0$

no significativo

( $P > 0.05$ )

Gráfica (3)

Peso de las ratas intoxicadas con Toxafeno

a los 68 días		a los 116 días	
Normales	Intoxicadas	Normales	Intoxicadas
332.7	314	194	327
411	361	213	325
411	337	192	274
381	389	185	310
367	339.5		
$\bar{X}=380.5$	$\bar{X}=348.1$	$\bar{X}=196$	$\bar{X}=309$
$S=32.8$	$S=28.2$	$S=11.9$	$S=24.53$
$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=4$	$n_2=4$
$R_1=34$		$R_1=10$	
$R_2=21$		$R_2=26$	
$U_1=6$		$U_1=16$	
$U_2=19$		$U_2=0$	
$6 > 2$		$0 > 0$	
No significativo		significativo	

Gráfica(4)

Gráfica(5)

Intoxicación con DDT

a los 112 días				a los 122 días			
Rosetas EA (receptor FC)		Rosetas EAC (receptor C3b)		Rosetas EA (receptor Fc)		Rosetas EAC (receptor C3b)	
N	I	N	I	N	I	N	I
3	8	3	2	1	1	1	15
1	4	1	4	0	3	1	6
8	4	3	1	1	0	2	2
5	1	6	1		1		3
1	2	1	3				
$\bar{X}=3.5$	$\bar{X}=3.8$	$\bar{X}=2.2$	$\bar{X}=2.2$	$\bar{X}=0.66$	$\bar{X}=1.25$	$\bar{X}=1.33$	$\bar{X}=6.5$
S=2.96	S=2.68	S=1.09	S=1.30	S=0.57	S=1.25	S=0.57	S=5.91
$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=3$	$n_2=4$	$n_1=3$	$n_2=4$
$R_1=26.5$	$R_2=28.5$	$R_1=26$	$R_2=24$	$R_1=11.5$		$R_1=6.5$	
				$R_2=17.5$		$R_2=21.5$	
$U_1=13.5$	$U_2=14$			$U_1=6.5$		$U_2=14$	
$U=11.5$	$U=16$			$U=4.5$		$U=0.5$	
$11.5 > 2$	$14 > 2$			$4.5 > 0$		$0.5 > 0$	
No significativo				No significativo			

N = Normales

I = Intoxicadas

Gráfica (6)

Gráfica(7)

**COMPLEMENTO**  
**EN UNIDADES 50% HEMOLITICAS (CU50%<sub>H</sub>)**

**Ratas intoxicadas con DDT**

a los 69 días dilución 1:15		a los 122 Días dilución 1:15	
Normales	Intoxicadas	Normales	Intoxicadas
1.6	0	2.5	2.2
0	0	3.2	2.1
1.7	0	4.0	0
1.6	1.8		1.8
1.9	2.9		
$\bar{X}=1.36$	$\bar{X}=0.94$	$\bar{X}=3.2$	$\bar{X}=1.52$
$S=0.77$	$S=1.34$	$S=0.75$	$S=1.03$
$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=3$	$n_2=4$
$R_1=29.5$	$R_2=25.5$	$R_1=18$	$R_2=10$
$U_1=14.5$		$U_1=12$	
$U_2=10.5$		$U_2=0$	
10.5 > 2		0 > 0	
no significative		significativo	
( $P > 0.05$ )		( $P < 0.05$ )	

Gráfica (8)

Peso de las ratas intoxicadas con DDT

a los 112 días		a los 122 días	
Normales	Intoxicadas	Normales	Intoxicadas
348.2	361	321	335
394.2	418	355.5	398
322.7	393	311	388
389	282		400
278	332		
$\bar{X}=346.42$	$\bar{X}=357.2$	$\bar{X}=329$	$\bar{X}=380$
$S=41.32$	$S=52.11$	$S=23.3$	$S=30.61$
$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=3$	$n_2=4$
$R_1=25$		$R_1=7$	
$R_2=30$		$R_2=21$	
$U_1=15$		$U_1=11$	
$U_2=10$		$U_2=1$	
$10 > 2$		$1 > 0$	
No significativa		No significativa	
( $P > 0.05$ )		( $P > 0.05$ )	

Gráfica (9)

COMPLEJOS INMUNES

Ratas intoxicadas con DDT

a los 69 días		a los 122 días	
Normales	Intoxicadas	Normales	Intoxicadas
0.1	0.1	0.1	0.06
0.08	0.07	0.06	0.06
0.16	0.08	0.06	0.06
0.08	0.095		0.07
0.16	0.14		
$\bar{X}=0.116$	$\bar{X}=0.097$	$\bar{X}=0.07$	$\bar{X}=0.062$
$S=0.040$	$S=0.026$	$S=0.02$	$S=0.005$
$n_1=5$	$n_2=5$	$n_1=3$	$n_2=4$
$R_1=31.5$	$R_2=23.5$	$R_1=15$	$R_2=13$
$U_1=16.5$		$U_1=5$	
$U_2=8.5$		$U_2=3$	
8.5 > 2		3 > 0	
no significativo (P > 0.05)		no significativo (P > 0.05)	

Gráfica (10)

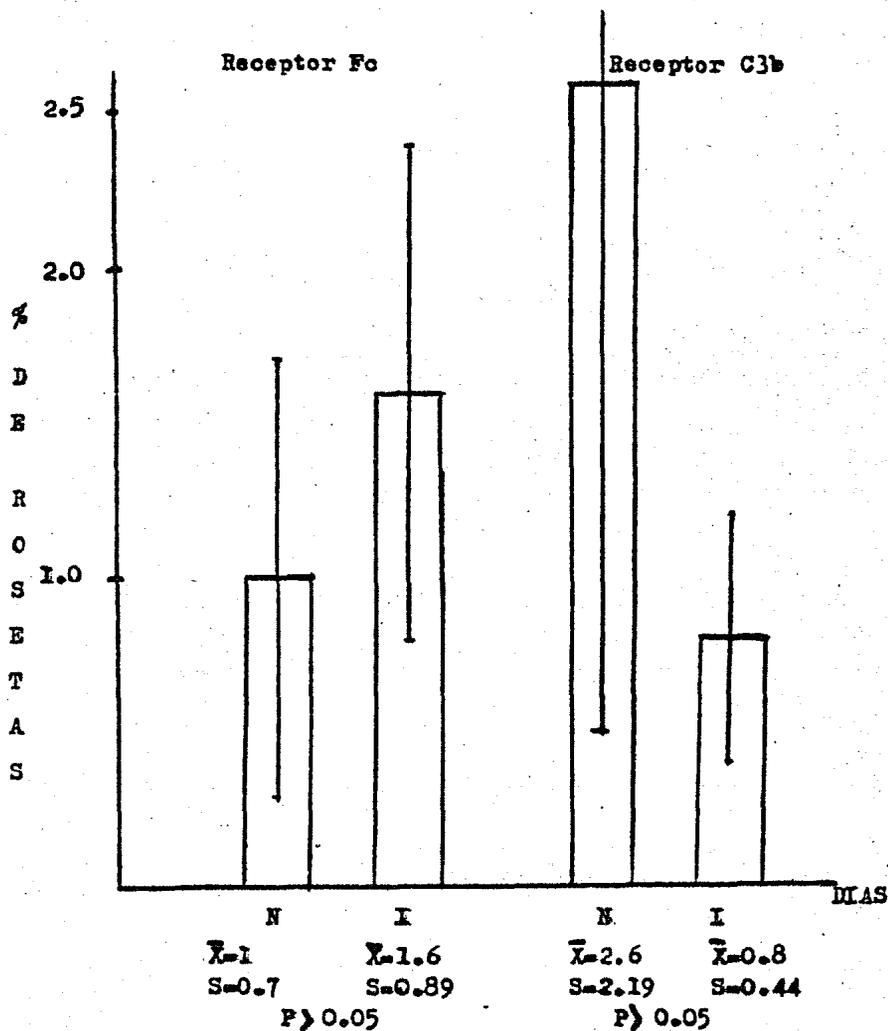
## GRÁFICAS

**Nota:** en todas las gráficas

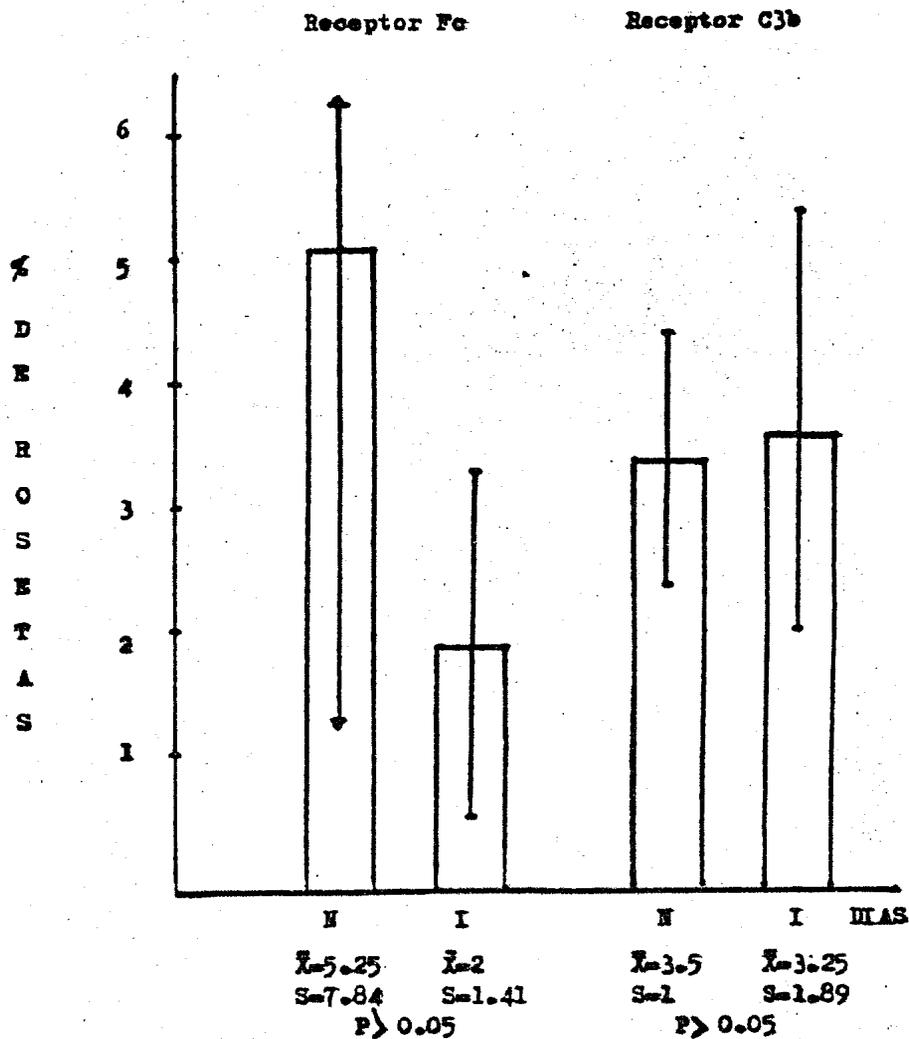
**N** - Normales

**I** - Intoxicadas

G R A F I C A (1)  
 INTOXICACION CON TOXAFENO A LOS 68 DIAS  
 R O S E T A S

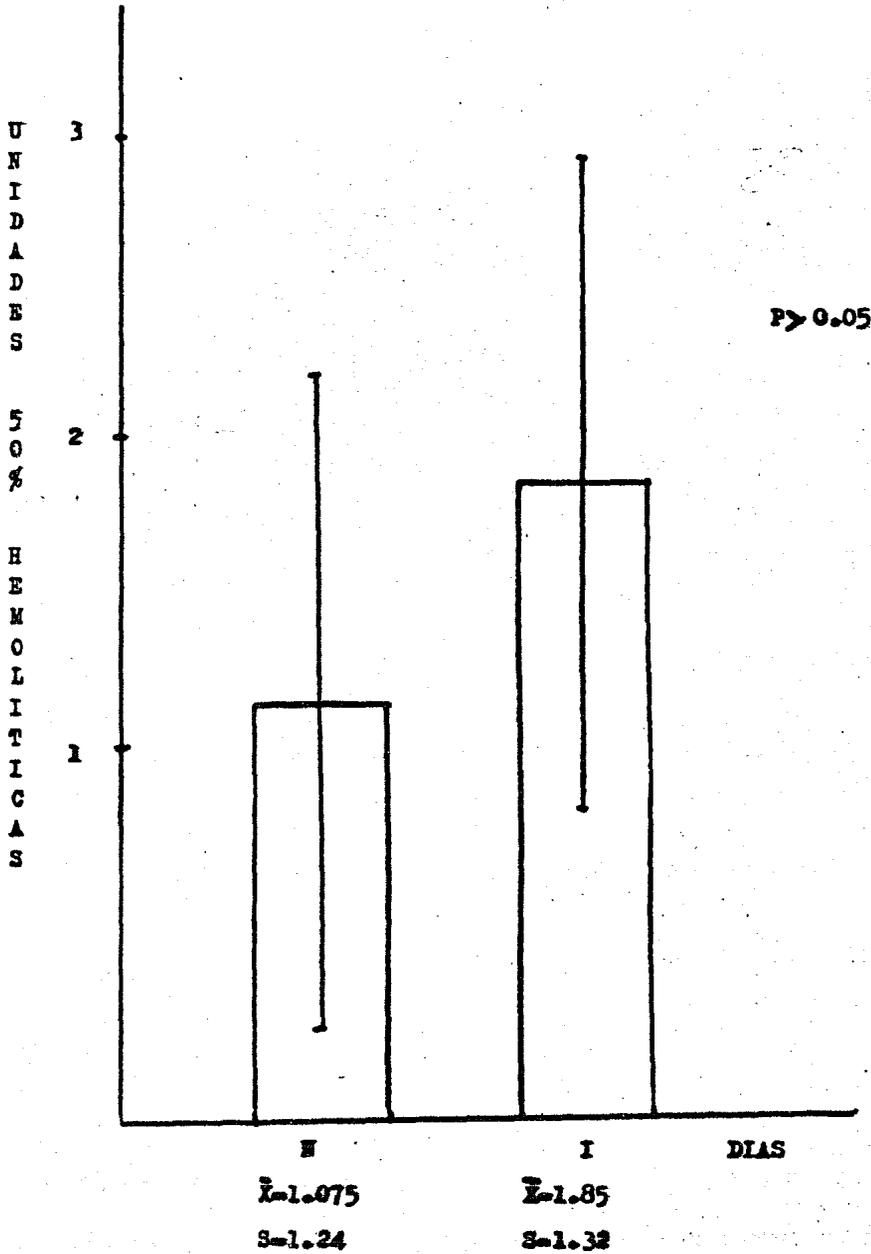


G R A F I C A (2)  
 INTOXICACION CON TOKAFENO A LOS 116 DIAS  
 R O S E T A S



G R A F I C A (3)

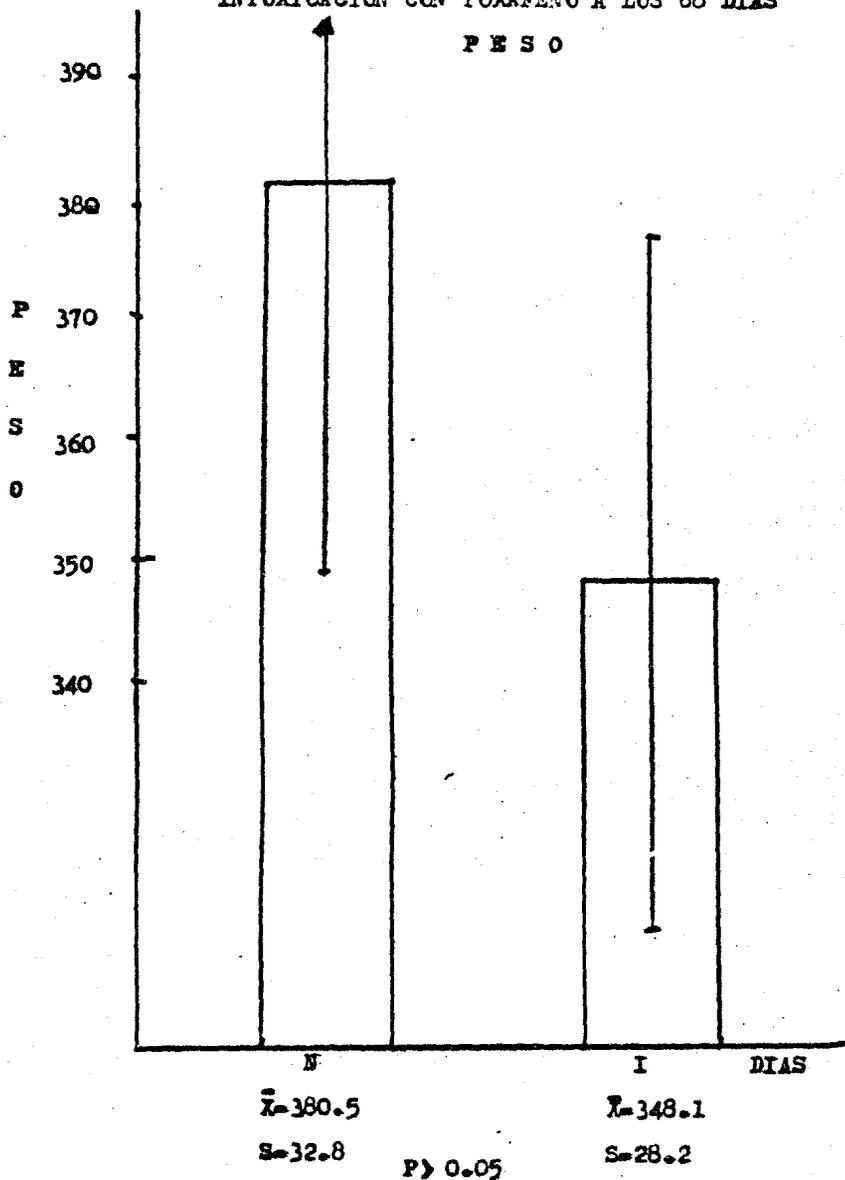
INTOXICACION CON TOXAFENO A LOS 116 DIAS  
COMPLEMENTO EN UNIDADES 50% HEMOLITICAS



GRÁFICA (4)

INTOXICACION CON TOXAENO A LOS 68 DIAS

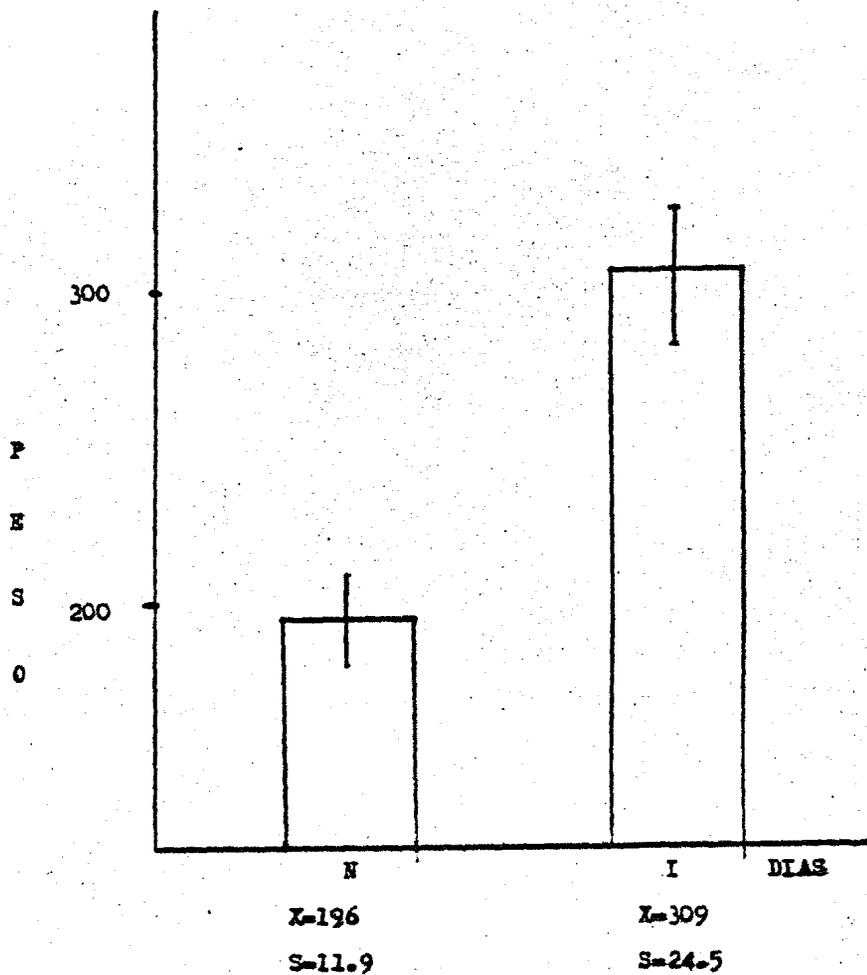
P E S O



G R A F I C A (5)

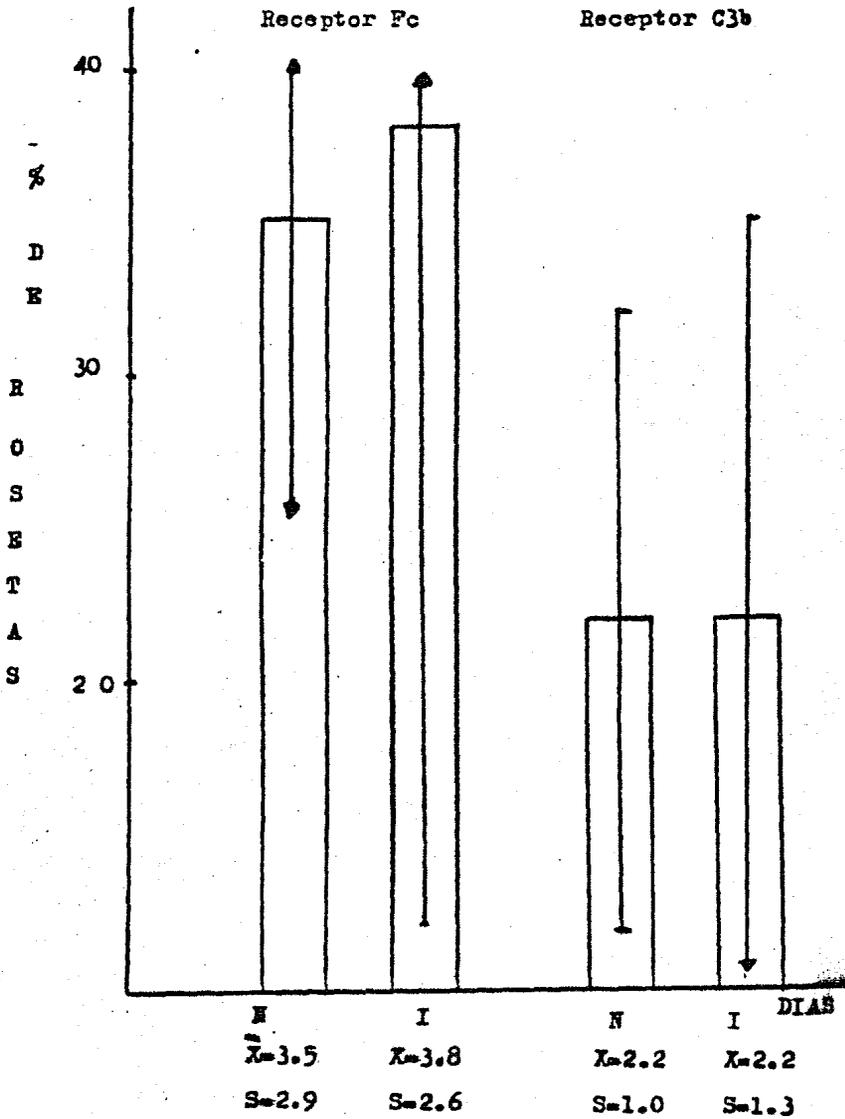
INTOXICACION CON TOXAFENO A LOS 116 DIAS

P E S O

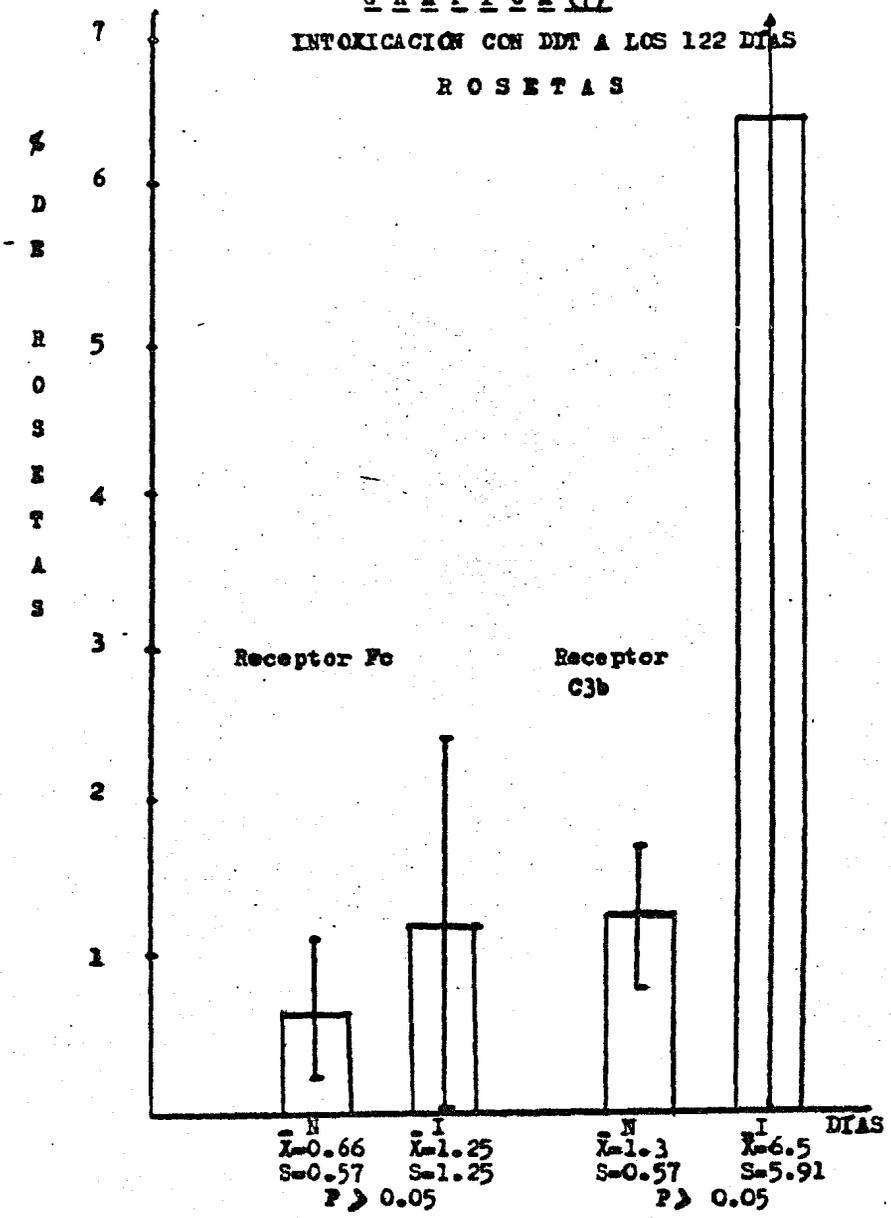


$P < 0.05$

G R A F I C A (6)  
 INTOXICACION CON DDT A LOS 112 DIAS  
 R O S E T A S



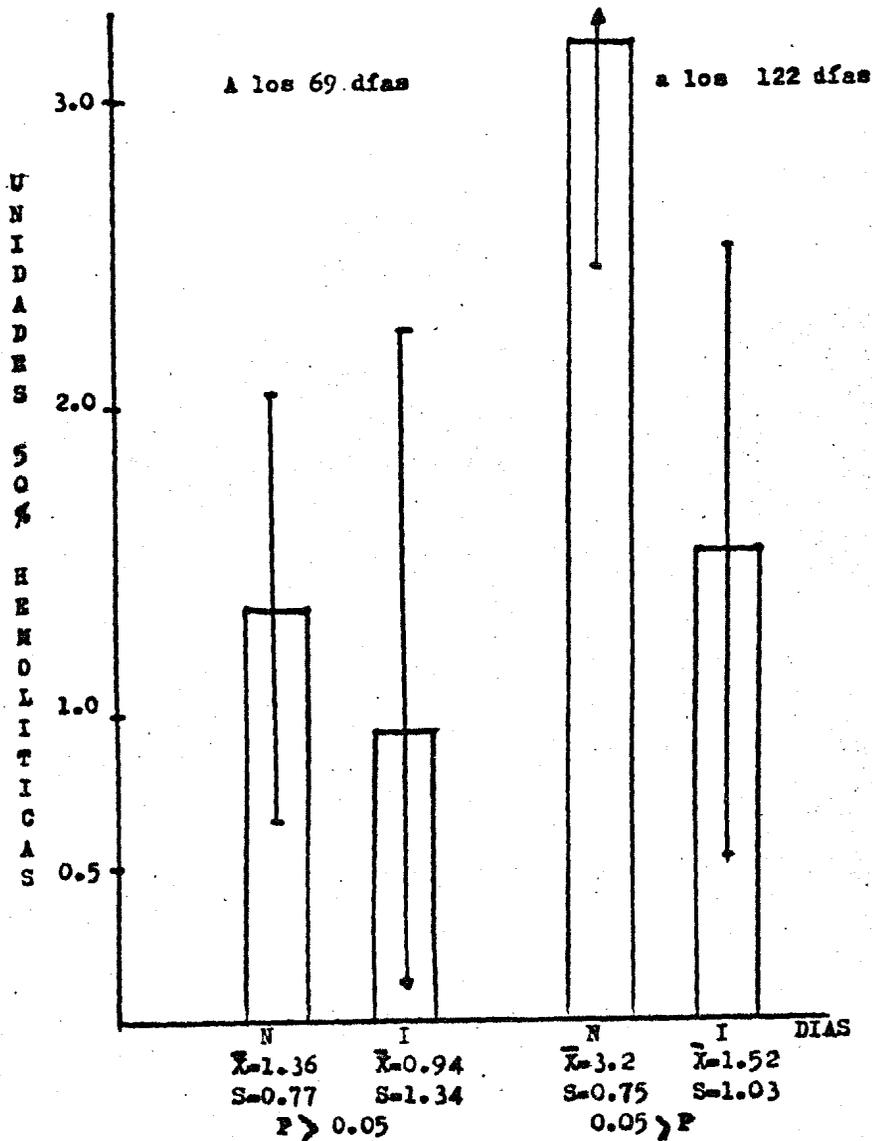
GRÁFICA (7)  
 INTOXICACION CON DDT A LOS 122 DIAS  
 ROS ETAS



GRÁFICA (8)

INTOXICACION CON DDT

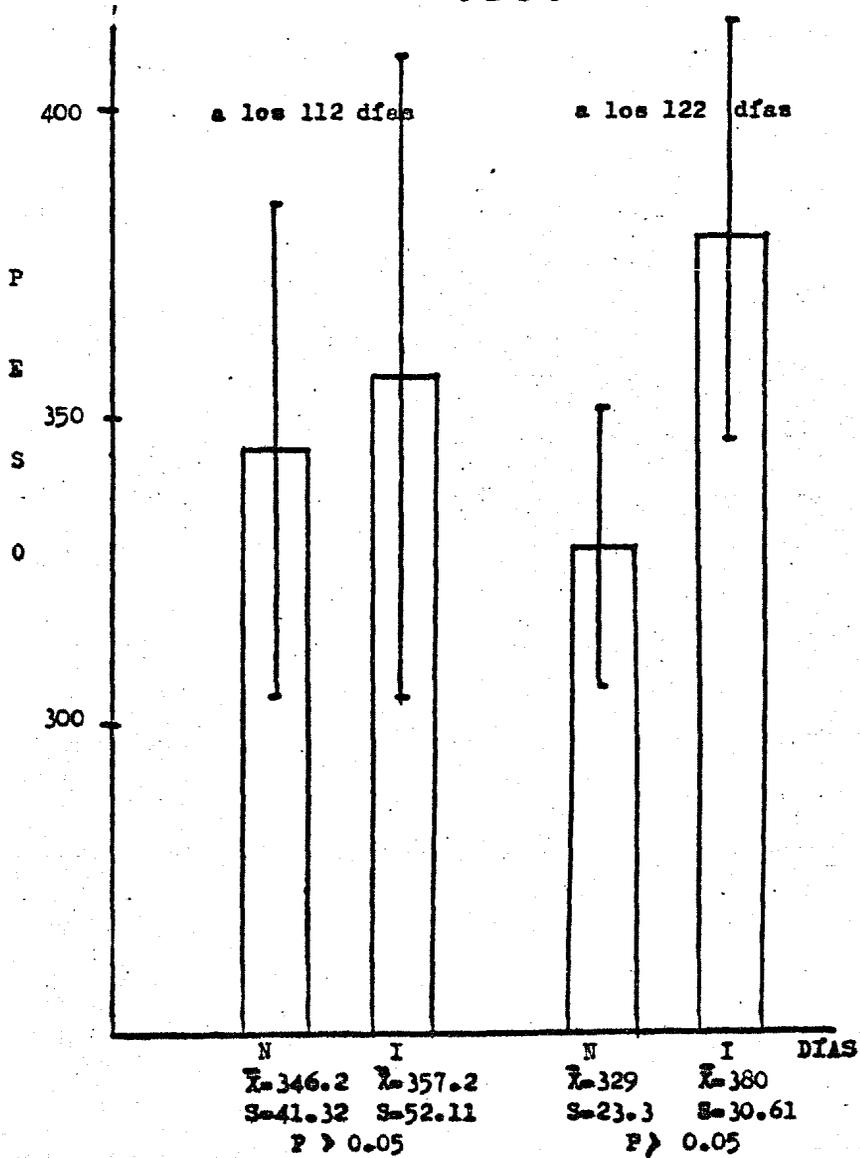
COMPLEMENTO EN UNIDADES 50% HEMOLITICAS



# GRÁFICA (9)

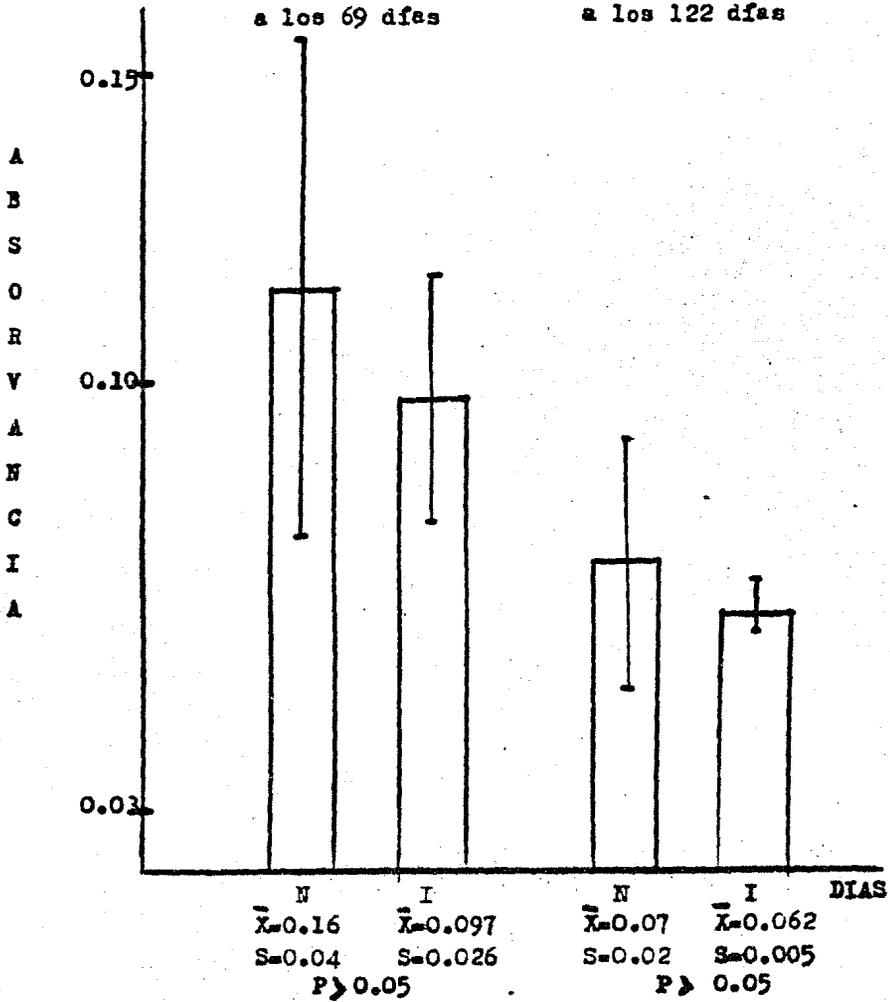
INTOXICACION CON DDT

P E S O



G R Á F I C A (10)

INTOXICACION CON DDT  
COMPLEJOS INMUNES



**C A P I T U L O V**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desde los 60 días de intoxicadas las ratas --- presentaron disminución de peso, siendo mas notorio - en las intoxicadas con Toxafeno, observandose una --- intoxicación aguda debido a que el Toxafeno es más-tóxico que el DDT, según se puede apreciar en las LD50 (110 mg/Kg y 200 mg/Kg respectivamente).

En una tesis parapela a esta, se observó que -- desde los 112 días de intoxicación con DDT se presentó una hepatomegalia, y a partir de los 122 se presentó una esplenomegalia ; no ocurrió así en las intoxicadas con Toxafeno. Esto puede deberse a que el Toxafeno es parcialmente biodegradable; en tanto que el DDT se -- acumula en tejido lipídico.

A los 112 días de intoxicación con DDT la res -- puesta inmune celular no se encuentra alterada, medida por la actividad de las células en la reducción del -- Nitro Azul de Tetrazolio (40), que se determinó para -- lelamente. Tampoco se obsárvó diferencias significa -- tivas en la formación de rosetas EA y EAC. En las ratas intoxicadas con Toxafeno a los 116 días se observa una media menor en las intoxicadas en cuanto al receptor - Fc, sin embargo, esta diferencia no es significativa ( $P > 0.05$ ).

Hasta los 122 días de intoxicación con DDT, la respuesta inmune humoral medida, por células formadoras de anticuerpos se encontraron aumentadas (40), y se observó una disminución significativa en la determinación de complemento en unidades 50% hemolíticas. Esto puede deberse a que el hígado se encuentra dañado (referido anteriormente), y es en este donde se sintetizan las fracciones C3, C6, C9 del complemento. También se presentó daño en el bazo, y es en este donde se sintetizan las fracciones C5, C7 y C8 del complemento.

En cuanto a los complejos inmunes determinados a los 69 días de intoxicación con DDT, las medias en las ratas intoxicadas se encuentran ligeramente disminuidas sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

C A P I T U L O V I

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

El peso corporal de las ratas intoxicadas dis-  
minuyó a los 60 días, siendo más notorio en las into-  
xicadas con Toxafeno observandose , una diferencia ---  
estadísticamente significativa con respecto a las ----  
normales a los 116 días.

Hasta los 112 días de intoxicación con DDT, la --  
respuesta inmune celular no se encuentra alterada.

Hasta los 122 días de intoxicación con DDT, la --  
respuesta humoral se encuentra alterada, presentandose  
aumentadas las células formadoras de anticuerpos, y --  
disminuído el complemento 5) % hemolítico en relación •  
con los valores encontrados en las ratas normales.

Como se observó en los resultados de Toxafeno, --  
hasta los 116 días no se presentaron diferencias sig-  
nificativas en los parámetros medidos (CU50 % H, Rosetas -  
EA y EAC ).

Por lo que propongo que se realicen otras deter -  
minaciones con más tiempo de intoxicación y el número -  
de ratas de cada determinación sea mayor.

En base , a los resultados obtenidos se observa -  
lo siguiente:

- el Toxafeno es más tóxico que el DDT
- con Toxafeno se presenta una intoxicación aguda sin -  
padecimientos
- la intoxicación con Toxafeno produce una disminución -  
de peso significativa.

-con DDT se produce una intoxicación crónica a largo plazo.

-la intoxicación con DDT produce hepatomegalia, esplenomegalia y disminución de complemento en unidades — 50% hemolíticas..

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

- 1) Fudenberg, H.H. et. al "Inmunología Clínica" editorial El Manual Moderno, 2a.edición, México 1980.
- 2) Bellanti, J. "Inmunología", Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 1a. Edición, México(1972)
- 3) Hudson, L. Hay, F.C. "Practical Immunology" Blackwell Scientific Publications, First - published United States of América(1976).
- 4) Pierce, C.W. et. al "Immune Responses In Vitro" Functions of Macrophages. Journal of Immunology 112 (3) : 1181-1189 (1974)
- 5) Mosier, D.E. "A Requirement for Two cell Types for - Antibody Formation in Vitro ". Science, 158 : 1573-1575 ( 1967)
- 6) Davie, J.M. And Paul, W.E. " Receptors on Immunocompetent Cells" 11. Specificity and Nature of Receptors on Dinitrophenylated Guinea - Pig Albumin - 125-I-Binding Lymphocytes of Normal Guinea Pigs" 111. Specificity and Nature of Receptors - on Dinitrophenylated Guinea Pig Albumin - -125-I-Binding Cells of Immunized Guinea - Pigs. J.EXP. MED. 134: 495-531 (1971).
- 7) Binz, H. and Lindenmann, J. "Celular Receptors : - Binding of Radioactively Labeled Anti - - - Alloantiserum" J.Exp. Med. 136 ; 872-884 (1972).

- 8) Grey, H.M. et. al "Thymus-Derived (T) Cell Immuno -  
 globulins" presence of a Receptor Site -  
 for IgG and Absence of Large Amounts of -  
 "Buried" Ig Determinants on T cells  
 J.Exp. Med. 136 ; 1323-1328 (1972).
- 9) Ashman R.F. and Raff M.C. "Direct Demonstration of -  
 Theta-Positive Antigen-Binding Cells, With  
 Antigen-Induced Movement of Thymus-Depen -  
 dent Cell Receptors"  
 J.Exp. Med. 137 ; 69-84 (1973).
- 10) Ramseier H. and Lindenmann, J. Recognition of trans -  
 plantation Antigens in vitro :Blocking of  
 recognition Structures by Specific Antibody  
 Eur. J. Immunol. 1:348-351 ( 1971).
- 11) Scribner, D.J. et. al. Surface Immunoglobulin and -  
 Fc Receptors on Murine B Lymphocytes: Loss  
 of Receptor Interaction After Cell Activa -  
 tion. J.Immunol. 119(6):2084-2088(1977).
- 12) Passwell, J.H. et. al. Cellular Requirments for the -  
 formation of EA rosettes By Human Monocytes.  
 Immunology 35; 863-872(1978).
- 13) Iida, K, and Nussenzweig, V. Complement Receptors -  
 is an inhibitor of the Complement Cascade  
 J.Exp. Med. 153 (5) ; 1138-1150 (1981).
- 14) Beckett, R.C. et.al. Empiric Analysis of the Inter -  
 actions Involved in the Formation of --  
 Fc Receptor Rosettes Int.  
 Archs Allergy appl. Immun.56:65-72(1978).

- 15) Teodorescu, M. et. al. A Simple Radioimmunoassay for the Enumeration of Rosette - Forming Cells.
- 16) Rothbarth, P.H. et. al. Identification of Rosette--Forming Cells in Permanent Preparations. J. Immunol. Methods, 19: 111-118 (1978).
- 17) Laws, E.R. et.al. Men with intensive occupational - exposure to DDT. A clinical and Chemical - study. Arch. Environm. Health 15: 766-----775 ( 1967).
- 18) Wurster, C.F. DDT: it is needed against malaria, -- but for the environment. Smithsonian 1 (17): 41, 46-49 (1970).
- 19) Stormont, F.T. and Conley B.E. : Pharmacologic ---- properties of toxaphene, a chlorinated Hydrocarbon insecticide. J.Amer. Med. Assoc. 149, 1135 (1962).
- 20) Epstein, S.S. The carcinogenicity of organochloride - pesticides. Original of Human Cancer. --- Book A. Ed. by H.H. Hiatt, I.D. Watson, - I.D. Winsten. Cold Spring Harbor Labora - tories pp. 243-265 (1977).
- 21) Reuber, H.D. Carcinogenicity of toxaphene: A review. J. or Toxicol. and environm. Health. 5: - 729-748 ( 1979).

- 22) U.S. Department of Health. Report of carcinogenesis bioassay of toxaphene. Rev. Hyg. Assoc. J. 40: 26-32 (1979).
- 23) Brandslund, I. et. al. "Detection and Quantitation of Immune Complexes with a Rapid Polyethylene Glycol Precipitation Complement Consumption Method (PEG-CC), en: Methods in Enzymology Volume 74 Immunochemical Techniques Part C. Edited by John J. Langone, Helen Van Vunakis ACAD PRESS, INC (London) LTD, 1981)
- 24) García, B.M.M. Alteraciones Enzimáticas en el suero y en la membrana plasmática de los hepatocitos de ratas como consecuencia de la intoxicación con DDT y Toxafeno. (tesis)- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional México. (1983)
- 25) Rudd, R.L. Pesticides and the livene lands cape --- Madison . Wis (1964).
- 26) McEwen, P.L. , Stephenson, G.R. The use and significance of pesticides in the environment. - John Wiley & Sons . New York. Chichester. Brisbane, Toronto (1979).
- 27) Hawley Gessner G. Diccionario de Química y de Productos Químicos, Ediciones Omega, México, pag, 262, 836 (1975).
- 28) Hayes, W.J. Jr. Pharmacology and Toxicology of DDT-

- Chapter VI 9-297. DDT, the insecticide - dichlorodiphenyl trichloethane and its -- significance. Paul Muller, ed, Vol. 11 , Birkhauser Verlag, Basilea. p 129,(1959).
- 29) Deichmann, W.B. The chronic Toxicity of organochlori ne pesticides in man. By W.B. Deichman -- (ed). Proc. 8th Pestic. Symp, Collect. -- Pap. Inter. Amer. Cont. Toxicol. Occup. - Med., 347 (1973).
- 30) Chernoff, N., and Carver, B.D.: Fetal toxicity of - toxaphene in rats and mice. Bull Environ. Contam. Toxicol. 15, 660(1976).
- 31) Levinsky, R.J. The measurement of immune complexes. Immunology Today, Techniques: 94-97(1981)
- 32) Levinsky, R.J. and Soothill, J.F. Protide of the -- Biological Fluids 26 th Colloquium. Vol. 26 243 ( H. Peeters ed.) ( 1979).
- 33) W.H.O. Scientific Group W.H.O. Technical Report -- Series 606 Geneva (1977).
- 34) Brostoff, J., et.al. Immune Complexes in Alopoy --- in the Mast Cell its Role in Health and - Diseases ( Pepys, J. and Edwards, A.M. -- eds) 380 (1979).
- 35) Theofilopoulos, A.N. Immunology Today 1,1. (1980).
- 36) Kabat, E.A. Inmunoquímica Experimental. La prensa - Médica Mexicana, 2a. edición México D.F. (1964).

- 37) Lowry, O.H. et.al. Polin Protein Determination .. -  
Biol. Chem. 193:268, (1951)
- 38) Remington, R.D. Estadística Biométrica y Sanitaria  
Editorial Prentice/ Hall Internacional,  
1a. edición , México (1970).
- 39) Götze, O. and H.J. Müller- Eberhard. The Alternative  
Path way of Complement Activation.  
Adv. Immunology 24: 1-27 (1976).
- 40) Macias ,R; D. Valoración de algunos aspectos de la  
respuesta inmune, midiendo la actividad -  
fagocítica y la capacidad de sintetizar  
anticuerpos, asi como la determinación de  
biometria hemática en ratas intoxicadas -  
con DDT y Toxafeno. ( tesis) .  
ENEP-ZARAGOZA , México D.F. 1984.