



13
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
zey

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

FALLA DE ORIGEN

EVALUACION DE LAS POBLACIONES CELULARES DE
LINFOCITOS T MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO,
RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA A BSA,
MEDIDA POR LA TECNICA DE ELISA, PARA
CARACTERIZAR EL MODELO MURINO CDI ET/ET.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N I
ANGELICA CASTRO BALBUENA
GEORGINA GUADALUPE BERMEJO TORRES



MEXICO, D. F.

1995



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.

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor, Cand. a Dr. Rubén Marroquin Segura, por su apoyo, orientación y tiempo para la realización de este trabajo.

Al Cand. a Dr. Juan Padierna Olivos y a la QFB Beatriz Ortega Escamilla por las facilidades que nos brindaron para que se llevara a cabo este trabajo.

A la QFB Yolanda Flores Cabrera por sus consejos y apoyo que nos dió durante la realización de nuestro trabajo.

DEDICO ESTA TESIS:

A mis padres:

Raquel y Jorge por su cariño,
confianza y apoyo que me
dieron para poder alcanzar la
meta deseada.

A mis hermanos:

Jorge, Octavio y Adriana,
porque me alentaron a
seguir adelante.

A mi tía:

Rebeca por todo el apoyo
incondicional que siempre me
ha brindado.

A mis amigas:

Por su amistad y por todos
los momentos que comparti-
mos.

Y con mucho cariño:

A mi esposo, Margarito, por su amor,
paciencia y confianza en todo
momento.

GEORGINA.

DEDICO ESTE TRABAJO Y DOY GRACIAS A:

Dios por iluminarme siempre.

A mis padres:

Gilberto y Mercedes que me dieron la vida y desde niña supieron guiarme y en todo momento me dieron su amor y fuerzas para seguir adelante.

A mis hermanos:

De una manera muy especial a José y Yolanda que me aconsejarón y apoyaron incondicionalmente.

A Evelia, Alicia, Noé, Fermin y Mario porque siempre tuvieron en sus labios una palabra de aliento y me brindaron todo su apoyo.

A ti Rogelio para que sigas adelante.

A mis tios:

El Sr. Román y la Sra. Catalina por los deseos de superación que inculcaron en mí y su apoyo, así también a mis primos Román y Rafael.

ANGELICA.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE ESPECIALIDADES
INMUNOLOGICAS PADIERNA Y EN EL LABORATORIO L-313 DE INMUNOLOGIA
DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA", DE LA UNAM.

I N D I C E.

I	INTRODUCCION.....	1
II	MARCO TEÓRICO.....	2
	2.1. EL RATON DESNUDO.....	2
	2.2. LA RESPUESTA INMUNE.....	5
	2.3. ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.....	13
	2.4. RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA.....	20
	2.5. MARCADORES DE SUPERFICIE.....	23
	2.6. CARACTERISTICAS DE LOS LINFOCITOS T Y DE LOS LINFOCITOS B.....	25
	2.7. CITOMETRIA DE FLUJO.....	31
	2.8. ENSAYO DE ENZIMA LIGADO A UN INMUNOABSORBENTE.....	35
III	FUNDAMENTACION.....	43
IV	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
V	HIPOTESIS.....	52
VI	OBJETIVOS.....	53
VII	REACTIVOS.....	54
VIII	MATERIAL.....	56
IX	METODOLOGIA.....	56
X	RESULTADOS.....	62
XI	ANALISIS DE RESULTADOS.....	75
XII	CONCLUSIONES.....	78
XIII	ANEXOS.....	80
XIV	BIBLIOGRAFIA.....	82

I. INTRODUCCION.

Dentro de un laboratorio de investigación biomédica el ratón constituye un material biológico esencial ya que por su tamaño y bajo costo de mantención, resulta ser un animal de laboratorio ideal. Es por esto que dentro de un Bioterio estos animales deben estar bien caracterizados genética, microbiológica e inmunológicamente para que los trabajos de investigación puedan ser reproducibles y den resultados con una mínima variabilidad.

El siguiente trabajo pretende caracterizar una nueva cepa de ratones hipotímicos, sin pelo llamados CDI et/st, surgidos espontáneamente en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y compararlos con las cepas CD1 y CD1et/+. Evaluando las poblaciones celulares de linfocitos T a través de sus receptores de superficie (CD3, CD4 y CD8) por medio de la citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales marcados con ficoeritrina e isotiocianato de fluoresceína y la respuesta de tipo humoral determinando anticuerpos de tipo IgM para la respuesta primaria e IgG para la respuesta secundaria contra un inmunógeno timodependiente como es la albúmina sérica bovina (BSA) mediante la técnica de ELISA.

II. MARCO TEORICO.

2.1. EL RATON DESNUDO.

El objeto de la producción animal en el Bioterio, debe ser el obtener animales los cuales presenten respuestas estándares a la manipulación experimental. Esto significa que la variabilidad debe de mantenerse mínima y consecuentemente que los experimentos puedan producir resultados significativos, tales animales se les conoce como animales definidos; éstos deben de ser criados bajo condiciones estándares libres de enfermedades y en el caso de especies comunes de laboratorio deberán estar bien caracterizados genética, microbiológica e inmunológicamente (1).

Uno de los animales más populares dentro del laboratorio es el ratón, por su tamaño pequeño, facilidad de manejo, bajo costo de mantenimiento y un alto grado de reproducción. La facilidad con que un gran número de ratones pueden ser mantenidos y las diferentes mutaciones que se han encontrado en el ratón lo hacen un modelo animal favorito dentro del laboratorio.

El descubrimiento de ratones con mutaciones productoras de inmunodeficiencias, su desarrollo y posterior utilización en

investigación biomédica, representaron pasos fundamentales para el progreso de áreas como la inmunología, investigación en cáncer, infectología, microbiología, parasitología y patología experimental entre otras áreas médicas (1,2,3).

En 1966 el Dr. S.P. Flanagan reportó la existencia de un ratón mutante con las siguientes características: sin pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido, atimia y un periodo de vida breve con presentación de un 100% de mortalidad a la edad de 25 semanas y una marcada mortalidad infantil de hasta el 45% en las dos primeras semanas de vida, demostró que el gen responsable de la mutación de ausencia de pelaje es un gen autosomal recesivo que el denominó nude (desnudo) y cuyo símbolo genético es nu (4).

En 1968 E.M. Pantelouris describió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen nu (nu/nu) carecen de timo, mientras que los hermanos de camada homocigóticos dominantes (+/+) y heterocigóticos (nu/+) presentan timo normal. Asimismo, describió la presencia de una marcada leucopenia en los ratones atímicos (815-3380 leucocitos/ul), mientras que hermanos fenotípicamente normales presentaron hasta cuatro veces niveles más altos y otros con niveles intermedios, estos últimos fueron considerados como heterocigotos (nu/+) (5,6).

A partir del reporte de Pantelouris se inició una ola de

investigaciones siendo los primeros usos experimentales: rechazo de injertos así como respuesta inmune antitumoral, de hecho es en estos animales donde se descubrieron unas células no T, que tenían actividad antitumoral y se les denominó linfocitos asesinos naturales (células NK) (7,8,9).

En el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza surge espontáneamente una cepa de ratones pelones derivados de la cepa CD1; llamó la atención por su resistencia a las condiciones estándares del bioterio, y de acuerdo a un estudio realizado donde se pesó el timo, se comprobó que eran hipotímicos, denominándoseles CD1 et/et (10).

Las características observadas en estos animales son las siguientes: su desarrollo sexual es mayor de dos meses y medio, su periodo de lactancia es de 35 días y las crías por hembra son de 4 a 5 ratones, con un 25% de mortalidad en estos mismos.

2.2. LA RESPUESTA INMUNE.

El término de inmunidad comprende todos los mecanismos fisiológicos de los que está dotado el organismo para reconocer materiales como propios o extraños y neutralizarlos, eliminarlos o metabolizarlos eventualmente (11).

El sistema inmune se halla compuesto por los órganos linfoides primarios y secundarios, por los linfocitos y células del sistema mononuclear fagocítico que se encuentran circulando por el resto del organismo. En los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) es donde se diferencian y maduran las diferentes poblaciones de linfocitos. En los secundarios constituidos por acúmulos de linfocitos maduros entremezclados con células del sistema mononuclear fagocítico (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide distribuido a lo largo del tubo digestivo y aparato respiratorio) es donde entran en contacto los linfocitos con los antígenos extraños presentados por células accesorias y donde se inicia por lo tanto la respuesta inmune (12, 13).

La respuesta inmunitaria está estructurada por una secuencia compleja de eventos; se inicia con la presencia de un estímulo (inmunógeno o antígeno) y por lo general culmina con la eliminación del agente que lo provoca. Hay dos niveles de defensa contra la invasión por los agentes externos: La inmu-

nidad innata y la adaptativa. La inmunidad innata, llamada en ocasiones inmunidad natural, está presente desde el nacimiento y comprende diversos elementos no específicos como son la piel, enzimas, polimorfonucleares, proteínas de fase aguda, células NK e interferones. La inmunidad adaptativa se distingue por una alta especificidad para el inmunógeno ofensor y por su memoria. Los elementos principales son las células presentadoras de antígeno (APC), linfocitos derivados del timo (células T) y linfocitos derivados de la médula ósea (células B) (13, 14).

ACTIVACION DE LA RESPUESTA INNUNE.

La respuesta inmunitaria adaptativa se inicia con la presencia de un agente extraño que se escapa a la eliminación temprana por el sistema inmunitario innato. Un agente extraño dentro del organismo se denomina antígeno; éste tiene la capacidad para reaccionar con los productos de la inmunidad adaptativa, en particular los anticuerpos y no necesariamente a su capacidad para inducir su formación, contrariamente a los inmunógenos que son moléculas que inducen e incrementan una respuesta inmunitaria.

RESPUESTA INMUNE CELULAR.

El destino de un inmunógeno que penetra las barreras físicas del sistema inmunitario innato, depende en parte de su ruta de entrada; en general, un inmunógeno puede tener tres rutas: si el inmunógeno entra al torrente sanguíneo se lleva hacia el bazo que se transforma en el sitio principal de respuesta inmunitaria; si el inmunógeno permanece localizado en la piel se desarrolla una respuesta inflamatoria local que viaja a través de los canales linfáticos aferentes hacia los ganglios linfáticos que drenan el área afectada, lo que a su vez, sirve como el sitio principal de la respuesta inmunitaria y finalmente, el inmunógeno puede entrar al sistema inmunitario de las mucosas en el aparato respiratorio o digestivo, ambos de los cuales tienen tejido linfóide (amígdalas y placas de Peyer) para montar una respuesta inmunitaria.

Después de la entrada del inmunógeno es capturado y procesado por la APC y la presentación en forma procesada de dicho inmunógeno es acompañado de la molécula complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, ya que sólo así es reconocido por un subgrupo de células T llamadas células T colaboradoras (T_H).

Aunque no todas las células somáticas expresan proteína

clase II aquellas que lo hacen incluyen macrófagos, linfocitos B, linfocitos T activados y células presentadoras de antígeno.

Las células B precursoras de las células que secretan anticuerpos (células plasmáticas) también expresan dichas moléculas clase II del MHC. El denominador común entre las células es la expresión de antígeno clase II y por lo tanto su función como APC. Estas células fagocitan o pinocitan el inmunógeno, que entonces es modificado en las vacuolas endocíticas del citoplasma. Los fragmentos del inmunógeno original se asocian de manera no covalente con las moléculas clase II y este complejo es transportado hacia la superficie celular donde se hace accesible a la célula T. Solo un número limitado de los fragmentos peptídicos de un antígeno proteico son capaces de asociarse con las moléculas clase II para formar un complejo inmunogénico; tales péptidos se denominan epítopos inmunogénicos (15).

Las células T_H son las que inician la respuesta inmunitaria ya que activan a las células efectoras principales de la respuesta, es decir, las células citotóxicas (T_C) y las células B productoras de anticuerpo. La activación de las células T_H requiere al menos dos señales: la unión del receptor de la célula T para el antígeno con el complejo antígeno-molécula clase II MHC, sobre las APC y la señal que proviene de la

interleucina I (IL-1) que es una proteína soluble producida por APC. Juntas las dos señales inducen la expresión de receptores para otra linfocina, interleucina II (IL-2), así como la producción de una batería de factores de crecimiento y diferenciación celular (citocinas) que son importantes para activar las células B y los macrófagos. La IL-2 induce el crecimiento de las células T_H que lo producen y células T_c que, de ordinario, no la producen. Por lo tanto la función principal de la IL-2 es amplificar la respuesta iniciada por el contacto de las células T_H con las APCs.

Las células T_H activan a las células T_c cuya función principal es matar células que expresen antígenos extraños o no propios. Las células T_c al igual que las T_H también requieren dos señales de activación. Una está dada por la interacción de los receptores de la célula T para el antígeno con un complejo de un epítipo extraño biosintetizado y MHC clase I sobre la célula en diana; estas células pueden ser tumorales o infectadas por virus o aloinjertos. La segunda señal está proporcionada por la IL-2 producida por la célula T activada. Esta liberará entonces citocinas que matan a la célula en diana

Fig. 1 (12).

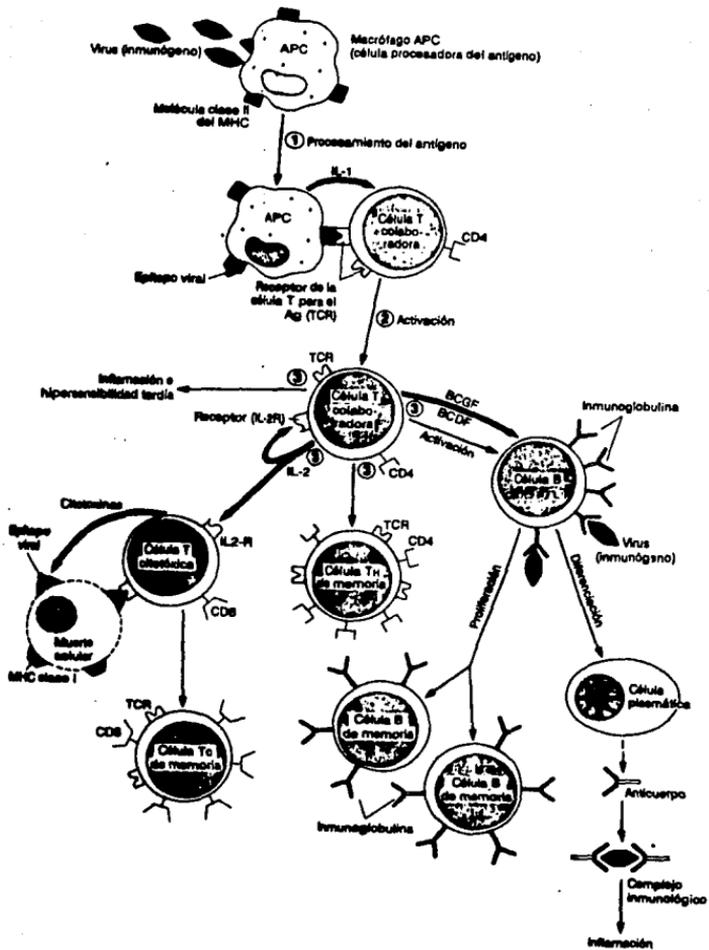


Fig. 1 Esquema del sistema inmunitario adaptativo (12).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

La producción de anticuerpos requiere la activación de linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Mientras que las células T_H se activan, las células B específicas se unen al inmunógeno a través de sus receptores dándose enseguida la endocitosis del complejo antígeno-receptor, que parece proporcionar la señal de activación; sin embargo ésta es insuficiente para la activación total de las células B que requieren señales adicionales de las células T_H . Estas señales adicionales son citocinas: la primera se denomina factor de crecimiento para la célula B (BCGF) que junto con el antígeno estimula la proliferación de las células B; y la segunda denominada factor de diferenciación de células B (BCDF), induce a éstas células B activadas a diferenciarse hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpo. Una fracción de las células B prolifera pero no se diferencia hacia células plasmáticas, quizá debido a que no reciben suficiente BCDF, tales células B forman un grupo de fondo común de células de memoria, que pueden responder a encuentros subsecuentes con el inmunógeno relevante (16).

Durante la proliferación de las células B actúan también otras interleucinas como son:

- Interleucina 2 que puede inducir el incremento en la produc-

ción de anticuerpos y proliferación en los linfocitos B normales.

- Interleucina 4 se sinergiza con IL-2 para estimular el crecimiento de células B. Aunque no es un factor de crecimiento para las células B en descanso, la IL-4 induce incrementos rápidos en la expresión membranar de antígenos MHC clase II y receptores para Fc de IgE. La IL-4 induce producción de IgG2b e IgG3 por las células B estimuladas por LPS.

- Interleucina 5 tienen una actividad promotora en el incremento de las células B (BCGF-II). Se ha visto que las IL-5 murina recombinante promueve el crecimiento de las células B activadas y se combina con IL-2 para estimular la proliferación celular, promueve también la producción de anticuerpo por células B en particular IgA.

- Interleucina 6 como factor estimulador de B es un agente de diferenciación o maduración que promueve la capacidad de células activadas de la línea B para secretar inmunoglobulinas (17).

2.3. ESTRUCTURA Y CARACTERISTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

Los anticuerpos son inmunoglobulinas que pueden reaccionar específicamente con el antígeno que estimuló su producción. Las inmunoglobulinas comprenden alrededor del 20% de las proteínas totales del suero y una proporción variable de inmunoglobulinas tienen actividad de anticuerpo.

Todas las inmunoglobulinas tienen patrones estructurales similares, con una gran diversidad de propiedades antigénicas de secuencias de aminoácidos. Las moléculas de inmunoglobulinas están formadas por cadenas polipeptídicas ligeras (pequeñas) y pesadas (grandes). Cada cadena de inmunoglobulina consta de una porción terminal amino variable (v) y una porción terminal carboxilo constante (c), cada una de las cuales, a su vez está genéticamente determinada. Las cadenas ligeras y pesadas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro (Fig. 2).

Las cadenas están plegadas en tres dimensiones con enlaces disulfuro para formar dominios. Hay dominios variables y constantes.

CADENAS LIGERAS (L). Estas siempre son de dos tipos, kappa (k) y lambda (λ) con pesos moleculares de 25000; ambos tipos

ocurren en todas las clases de inmunoglobulinas pero cualquier molécula contiene sólo un tipo de cadena L.

CADENAS PESADAS (H). Cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas tienen un conjunto antigénico de cadenas H (isotipos), con pesos moleculares de 50000 a 70000. Los cinco tipos de cadenas pesadas se denominan γ en IgG, μ en IgM, α en IgA, δ en IgD y ϵ en IgE. La porción de cadena (H) que no está involucrada en el sitio de combinación del anticuerpo (fragmento Fc) porta los sitios para diferentes reacciones efectoras, por ejemplo, fijación a células fagocitarias, desgranulación de las células cebadas y fijación cutánea.

Los fragmentos de inmunoglobulina provienen del tratamiento enzimático de la molécula de inmunoglobulina. El tratamiento de la molécula IgG 7S con papaína resulta en la producción de 3 fragmentos; dos de estos son muy parecidos y tienen capacidad para ligarse a los antígenos, son de tipo univalente ya que solo tienen un punto de unión al ligando. Estos fragmentos reciben el nombre de Fab (fragmento de unión con el antígeno), el tercero es el fragmento Fc el cual no porta actividad de anticuerpo sino una gama de reacciones efectoras y tiene la propiedad de ser cristalizabile.

SITIO COMBINANTE. La actividad inmune de una molécula de

anticuerpo se centra sobre su capacidad de enlazar específicamente antígenos. El sitio de combinación está localizado sobre el extremo del grupo amino terminal de la molécula de anticuerpo y está compuesto de ciertos segmentos hipervariables plegados dentro de las regiones modificables de ambas cadenas L y H. La especificidad de los anticuerpos es una función de la secuencia de los aminoácidos y de su configuración tridimensional (18).

INMUNOGLOBULINA G (IgG).

La IgG comprende aproximadamente 75% de inmunoglobulinas en los sueros humanos normales. Cada molécula de IgG consta de dos cadenas L y dos cadenas H ligadas por 20-25 enlaces disulfuro. Hay 4 subclases de IgG basadas en las diferencias antigénicas en las cadenas H. Cada molécula de IgG tiene solo un tipo de cadena L y un tipo de cadena H; las moléculas de IgG probablemente tienen la forma de Y con una bisagra cercana a la mitad de la cadena pesada que une a los dos segmentos Fab al segmento Fc (Fig. 2).

Durante la respuesta secundaria, la IgG es la principal inmunoglobulina sintetizada. Por su capacidad para cruzar la placenta ofrece una línea defensiva primordial contra las infecciones en las primeras semanas de la vida del recién nacido; la región Fc de las moléculas de IgG se unen a los receptores específicos de las células fagocitarias tales como los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, aumentando así la eficiencia de las células fagocíticas para que puedan ingerir y destruir los microbios infectantes que han quedado cubiertos con los anticuerpos IgG producidos como respuesta a la infección. Además de unirse a las células fagocíticas, la región Fc de IgG puede unirse, activando, al primer componente del sistema del complemento que en estas circunstancias desata un ataque bioquímico que mata al microorganismo (19).

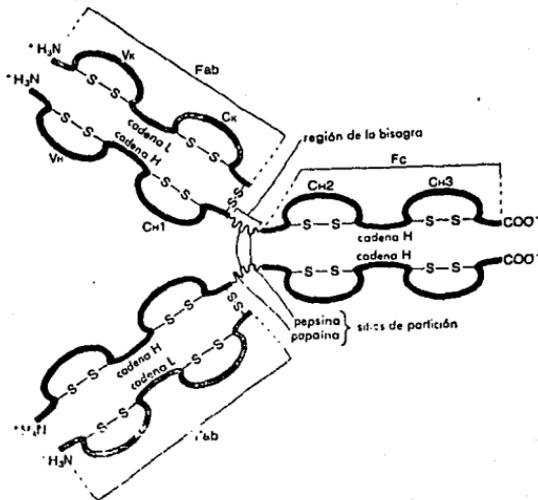


Fig. 2 Representación esquemática de una molécula IgG (12).

INNUNOGLOBULINA M (IgM).

La IgM comprende alrededor del 10% de inmunoglobulinas en el suero humano normal. El mayor tamaño de las moléculas de IgM es debido al eslabonamiento de 5 unidades (cada una similar a la unidad de IgG) mediante enlaces disulfuro cerca de la región de la bisagra; cada subunidad de IgM consiste en dos cadenas L y dos cadenas H (Fig. 3). Además hay una cadena J (peso molecular 15000) por cada diez cadenas L de moléculas IgM. La cadena J es ácida y difiere en antigenicidad y composición de aminoácidos de las otras cadenas. Es probable que ayude a la polimerización y estabilización de las moléculas de IgM. Puesto que cada molécula de IgM tiene diez segmentos Fab que se pueden combinar hasta en diez sitios antigénicos.

Las moléculas de IgM son los anticuerpos que se sintetizan primero en la respuesta al estímulo antigénico, fijan bien el complemento en presencia de antígeno.

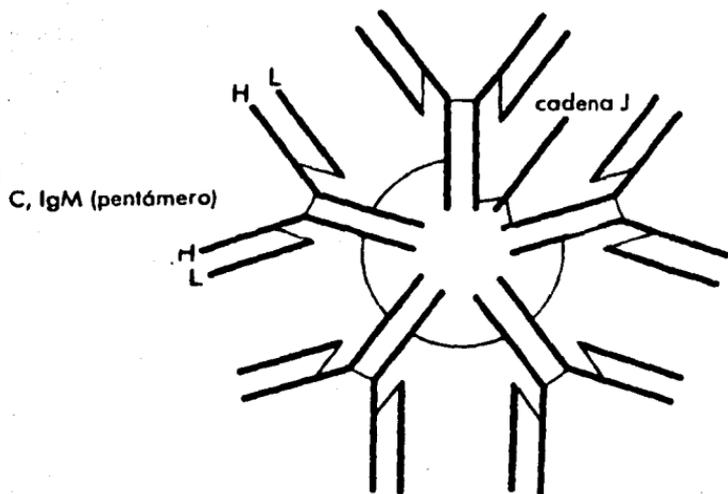


Fig. 3 Estructura pentamérica de la IgM humana (12).

2.4. RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA.

La primera exposición de un inmunógeno desencadenará una respuesta de anticuerpo relativamente débil y de vida corta denominada respuesta primaria, la cual se divide en diversas fases. La fase de espera o latente es el tiempo que pasa entre el contacto con el inmunógeno y la detección de anticuerpos en la circulación, que en promedio, dura una semana en humanos. Durante este periodo tiene lugar la activación de los linfocitos T y B. La fase exponencial marca un rápido incremento en la cantidad de anticuerpos en circulación. Después de un intervalo el nivel de anticuerpos permanece relativamente constante debido a que está ocurriendo síntesis y degradación a frecuencias casi iguales (fase del estado de equilibrio), el nivel de anticuerpo declina en forma gradual (fase de declinación) al menguar la síntesis de nuevos anticuerpos.

Los siguientes encuentros con el mismo inmunógeno dan como resultado la respuesta secundaria en donde está acortado el periodo de latencia y los niveles de anticuerpo alcanzan rápidamente un nivel de equilibrio mucho más alto permaneciendo detectables en el suero durante periodos muchos más largos (Fig. 4). Las células T y B de memoria son generadas durante la respuesta primaria y son responsables de una cinética más rápida, de mayor intensidad y duración en la respuesta secun-

daria; esto explica porque son tan eficaces las inyecciones de refuerzo de las vacunas (Fig. 5).

En la respuesta primaria la clase de anticuerpos que se detecta primero es de tipo IgM, en un lapso de una a dos semanas, mientras que en la respuesta secundaria los anticuerpos producidos son casi en su totalidad IgG (20, 21, 22).

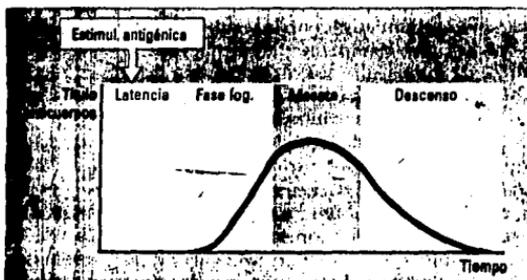


Fig. 4 Fases de una respuesta de anticuerpos primaria después del contacto con el antígeno (20).

FALLA DE ORIGEN

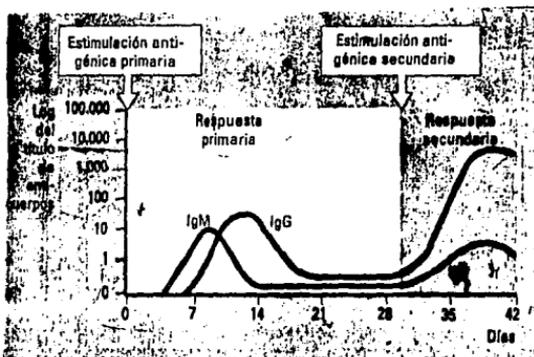


Fig. 5 Respuestas de anticuerpos primaria y secundaria (20).

2.5. MARCADORES DE SUPERFICIE.

Los linfocitos y otros leucocitos expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie. Algunas de éstas moléculas aparecen en determinados estadios de la diferenciación o activación celulares durante breves periodos de tiempo, mientras que otras son características de distintas líneas celulares.

Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores, en muchas de ellas ésta identificación se puede realizar mediante anticuerpos monoclonales específicos.

En fechas recientes se ha desarrollado una nomenclatura para estas moléculas de la superficie celular el sistema CD, en el que los marcadores se numeran como CD1, CD2, etc. El término CD (designación de agrupamientos; cluster designation) provino del análisis computarizado de los anticuerpos monoclonales contra los antígenos leucocitarios humanos llevado a cabo por diferentes laboratorios de todo el mundo (Cuadro 1). Los marcadores se pueden poner de manifiesto por medio de anticuerpos fluoresceinados. En este caso, los marcadores de superficie actúan como antígenos (23, 24).

Grupo de diferenciación	Anticuerpo monoclonal representativo	Distribución celular
CD1a	T6	Timocitos, célula de Langerhans
CD1b		Timocitos
CD1c		Timocitos
CD2	T11	Linfocitos T
CD3	T3	Linfocitos T maduros
CD4	T4	Subpoblación T
CD5	T1	Linfocitos T
CD6	T12	Linfocitos T
CD7		Linfocitos T (receptor Fcμ)
CD8	T8	Subpoblación T
CD9		Monocitos, Pre-B, plaquetas
CD10	J5 (Calla)	Pre-B, LLA común
CD11a		Leucocitos (LFA-1)
CD11b	OKM1	Monocitos, granulocitos, NK (CR3)
CD11c		Monocitos (granulocitos)
CDW12		Monocitos, granulocitos, plaquetas
CD13		Monocitos, granulocitos
CD14		Monocitos, células dendríticas
CD15		Granulocitos, (monocitos)
CD16		Granulocitos, NK
CD17		Granulocitos, monocitos, plaquetas
CD18		Leucocitos (LFA-B)
CD19	B4	Linfocitos B
CD20	B1	Linfocitos B, células dendríticas
CD21	B2	Linfocitos B, células dendríticas
CD22		Linfocitos B
CD23		B activada (IL-4 R), célula dendrítica
CD24	BA-1	Linfocitos B, granulocitos
CD25	Tac	T activadas (receptor IL-2)
CDW26		T activadas
CD27		Células T, plasmáticas
CD28		Subpoblación T
CDW29		Subpoblación T
CD30	Ki-1	Células activadas T y B
CD31		Monocitos, granulocitos, plaquetas, (células T)
CDW32		Monocitos, granulocitos, plaquetas, linfocitos B (2 ^o FcR)
CD33		Células mieloides inmaduras (LMA)
CD34		Leucemia mieloide y linfoblástica
CD35		Granulocitos, monocitos, células dendríticas (CR1)
CD36		Monocitos, plaquetas
CD37		Células B
CD38	T10	Plasmáticas, timocitos B y T activados
CD39		Células B, macrófagos
CDW40		Células B, carcinomas
CDW41		Plaquetas
CDW42		Plaquetas
CD43		T, granulocitos, hemátiles, cerebro
CD44		T, granulocitos, pre-B, cerebro
CD45	T200	Pan leucocitario
CD45R	T220	B, subpoblaciones T, granulocitos monocitos

Cuadro 1. Principales moléculas CD (25).

2.5. CARACTERISTICAS DE LOS LINFOCITOS T Y DE LOS LINFOCITOS B.

Dentro del sistema inmune los linfocitos desempeñan un papel central aparte de otras células como son los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y células NK.

Los linfocitos se dividen en dos clases: linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos B que se generan en médula ósea e hígado fetal y que son las células precursoras de las células productoras de anticuerpo y que en las aves se adiestran en la bursa de Fabricio, mientras que en los mamíferos en donde no existe tal estructura, salen de médula ósea con marcadores de linfocitos B. Cuando se sintetizan las cadenas funcionales H y L, se expresa la inmunoglobulina en la superficie celular. Estas células expresan inmunoglobulina y se denominan células B vírgenes porque poseen inmunoglobulina funcional sobre la membrana pero aún no interactúan con el antígeno. La clase principal de inmunoglobulina de los linfocitos B es la IgM presente en forma monomérica; también pueden estar sobre la superficie la IgD, IgG, IgE e IgA. La mayoría de los linfocitos B tienen un receptor para complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulina agregada. Este receptor es específico para un sitio de la porción Fc. Se ha demostrado en los linfocitos B un receptor para el componente C3d para el complemento y el

virus Epstein Barr (CD21-OB2). Las células B también manifiestan los antígenos clase II del MHC y el receptor para transferrina. En este estadio las células B migran desde la médula ósea hacia la sangre y tejido linfóide periférico.

Se han descrito dos tipos generales de antígeno: antígeno independientes de T y antígenos dependientes de T. Las células B que se encuentran a los antígenos independientes de T son capaces de proliferación y secreción de inmunoglobulina en ausencia de células T_H . En contraste la respuesta a antígenos dependientes de T requiere la interacción entre células B y T para la producción subsecuente de inmunoglobulinas.

La maduración de células T en el timo se acompaña de una serie compleja de cambios en su genotipo y fenotipo. El timocito de reconocimiento más temprano, la célula pro-T, se puede identificar mediante expresión de ciertos antígenos de la superficie celular (es decir, CD2 y CD7) y mediante la presencia de la proteína CD3 en el citoplasma. Las células pro-T se diferencian en células pre-T.

Los timocitos que expresan CD3/TCR-alfa/beta en su superficie, y reaccionan con antígenos propios, por lo general se eliminan de la población por un proceso aún desconocido. Otros timocitos que poseen CD3/TCR-alfa/beta, se "educan" para

reconocer péptidos antigénicos sólo cuando están asociados con proteínas propias MHC, mediante un proceso que aún no se ha delineado. La mayoría de los timocitos mueren en este proceso de selección dentro del timo; sólo una minoría se diferencia en forma exitosa en linfocitos maduros T, y migran a los órganos linfoides periféricos y a la sangre. En la sangre periférica, cerca del 70% de los linfocitos son células T.

Otras moléculas diferentes del complejo CD3/TCR, están encargadas de la diferenciación tímica de linfocitos T, y también se pueden utilizar como marcadores para identificar estadios de maduración. Las células pro-T expresan CD2 y CD7 en la superficie celular, estos timocitos inmaduros carecen de CD3, CD4 y CD8. Al madurar, la mayoría de los linfocitos pro-T y pre-T inician la expresión de marcadores CD1, CD4 y CD8, por lo general, dentro de la corteza tímica.

Cierta proporción de las células relativamente inmaduras CD4⁺8⁻ pierden la expresión del CD4 o el CD8 para transformarse en CD4⁺8⁺; se incrementa la cantidad de CD3/TCR sobre la superficie celular, y se pierde la molécula CD1. Estos linfocitos más maduros se encuentran de manera predominante en la corteza. Las células T que poseen TCR-alfa/beta, son del tipo predominante de las células T en el timo y ganglios linfáticos después de nacer, y constituyen casi todos los timocitos CD3 y

células T maduras periféricas. Los linfocitos T maduros se pueden subdividir con base en las expresiones de antígenos: linfocitos T cooperadores (CD4) o linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8) (26, 27).

CELULAS T COOPERADORAS. Los linfocitos T tipo CD4 forman el subgrupo denominado células colaboradoras tipo T, o colaboradoras/inductoras (T_H) debido a su capacidad para incrementar respuestas de células B y amplificar las respuestas que las células T tipo CD8 llevan a cabo; bajo ciertas circunstancias también pueden mediar la citotoxicidad y su presión inmunitaria. Los linfocitos T tipo CD4 por lo general reconocen antígenos peptídicos que están unidos a las glicoproteínas clase II del MHC presentes en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

Después de la exposición al complejo péptido-MHC, las células T tipo CD4 se activan y proliferan; producen una serie de linfocinas, con distintos efectos como es la interleucina 2 (IL-2) que sirven como factor de crecimiento para la proliferación policlonal independiente de antígeno de otras células T.

La interleucina 4 (IL-4) incrementa el crecimiento de las células B y otras células T, aumenta la función de los linfo-

citos T₀ e induce la expresión de receptores fo, para la IgE sobre las células B y los monocitos.

Las células T tipo CD4 proveen factores reguladores que incrementan las funciones mediadas por todo el sistema inmunitario. Intervienen también cooperando con los linfocitos B a los cuales induce a producir respuestas secundarias (28).

CELULAS T CITOTOXICAS/SUPRESORAS. Las células T tipo CD8 median la mayoría de la citotoxicidad específica para el antígeno, capacidad para matar otras células que se toman como ajenas, como por ejemplo, células infectadas por virus.

Las células T tipo CD8 reconocen los antígenos peptídicos unidos a las moléculas clase I del MHC sobre la superficie del blanco. Como consecuencia de la activación, las células T tipo CD8, también liberan linfocinas (es decir interleucina 2, interferon gamma), que pueden incrementar las respuestas inmunitarias por otros linfocitos T, B. Aparte de su función citotóxica, las células T tipo CD8, pueden suprimir las respuestas inmunitarias, quizá por la liberación de factores solubles que interfieren con la función de otras células inmunitarias (28, 29).

Existen diferentes métodos para determinar los tipos

celulares de linfocitos T, con la idea de evaluar la respuesta celular. Una forma de hacerlo es mediante la detección de sus receptores por técnicas como las rosetas E (marcador de todos los linfocitos T). Se puede usar también rosetas EA, usando hemolisina IgG, para determinar poblaciones de T supresores; o hemolisina IgM para determinar linfocitos T cooperadores (30). La determinación de las subpoblaciones de linfocitos T se puede realizar también determinando los receptores CD4 (marcadores de los linfocitos T cooperadores/inductores) y los receptores CD8 (marcadores de los linfocitos T citotóxicos/supresor), mediante microscopía de fluorescencia o bien usando la citometría de flujo (31, 32).

2.7. CITOMETRIA DE FLUJO.

La citometría de flujo es una técnica que permite medir características celulares tales como tamaño, volumen, pH, actividad enzimática, contenido de DNA, a través del marcaje de partículas o células con fluorocromos. Evaluando estos parámetros en un sistema de fluido en el cual las partículas o células fluyen y son interceptadas por un rayo luminoso detectándose la fluorescencia que emiten. La importancia de éste método se ha caracterizado por la rapidez y la cantidad de pruebas que se realizan así también por su alto grado de confiabilidad y exactitud, utilizándose cada vez más en medicina y en biología, destacando las pruebas inmunológicas como por ejemplo la evaluación de poblaciones celulares (linfocitos, monocitos y granulocitos) que han tomado un lugar importante en el diagnóstico y pronóstico de diversas situaciones clínicas, como es el trasplante de órganos y médula ósea, el diagnóstico temprano de leucemias y linfomas además de la evaluación de pacientes con inmunodeficiencias (32).

Una medición que puede hacer la citometría de flujo es la evaluación de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T por medio de sus marcadores de superficie (CD3, CD4, CD8) utilizando anticuerpos (mono y policlonales) u otras proteínas marcadas con sustancias fluorescentes llamadas fluorocromos

que son capaces de absorber luz de una determinada longitud de onda y emitir luz de mayor longitud de onda (33, 34).

El fluorocromo más utilizado es la fluoresceína; las ventajas que presenta son un alto coeficiente de extinción, un máximo de absorción cercano a las líneas de emisión de un laser de ion argón y su amplia disponibilidad de unirse a una gran variedad de anticuerpos. Otro fluorocromo es la ficoeritrina (PE); esta puede ser excitada a 488 nm, y emitir luz anaranjada la cual puede ser fácilmente distinguida de la fluorescencia verde de la fluoresceína.

El fenómeno de la fluorescencia ocurre cuando un compuesto absorbe luz de una determinada longitud de onda, los electrones pasan de un estado basal a un estado excitado regresando después a su estado basal, emitiendo luz a una mayor longitud de onda. La luz emitida siempre es de más baja energía y por lo tanto de mayor longitud de onda que la luz de excitación. Estas dos longitudes de ondas pueden ser captadas y separadas por filtros ópticos. La fluorescencia ha sido usada durante muchos años para visualizar ciertas estructuras a través del microscopio. Tiene particularmente una amplia aplicación en la citometría de flujo y junto con la dispersión es el principal tipo de medición que se realiza en muchos equipos.

La citometría de flujo realiza sus mediciones basadas en la luz como fuente de excitación; se requiere de una iluminación intensa, la cual es dada por la lámpara de arco o lasser, debido a que las células son pequeñas y pasan muy rápidamente a través del punto de detección. La fuente de luz debe ser capaz de producir longitudes de onda específicas que puedan ser usadas para excitar a los marcadores fluorescentes. Cuando la muestra es inyectada en uno de los canales pasa a la cámara de fluido en donde las partículas o células son transportadas o liberadas una por una a un punto específico en el espacio e interceptadas por un rayo luminoso. La dispersión y la luz de fluorescencia generada son captadas por fotodetectores los cuales convierten el fotón en señales electrónicas que son detectadas y procesadas por computadora dando resultados gráficos y análisis estadísticos (32).

Para medir la respuesta inmune humoral se usan una serie de pruebas que varían en cuanto a sencillez de ejecución, sensibilidad, costo, etc. Así tenemos a la precipitación en capilar o en gel que es fácil de realizar pero tiene una sensibilidad muy baja. Por otro lado tenemos técnicas muy sensibles como el radioinmunoanálisis (RIA), la cual detecta cantidades de picogramos pero tiene el inconveniente de usar un equipo caro, de emplear sustancias radioactivas que tienen generalmente una vida corta (30).

Otros son los inmunoensayos que son técnicas para la detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos; además de la elevada sensibilidad que caracteriza a las pruebas inmunológicas, es la elevada especificidad de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo lo que constituye la base de su excelente aplicabilidad (35).

2.8. ENSAYO DE ENZIMA LIGADO A UN INMUNOABSORBENTE (ELISA).

Es una técnica que permite determinar la concentración de un antígeno o anticuerpo mediante la fijación de uno de ellos a una fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo, mediante una inmunoglobulina, frente a la inmunoglobulina heteróloga o ante el antígeno unido a una enzima, posteriormente se le adiciona el sustrato de la enzima y la transformación del sustrato por la enzima es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo fijada (36).

En este ensayo, el antígeno o anticuerpo se adosa usualmente a un soporte de fase sólida para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados. Se ha hallado que antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente al material particulado, tal como celulosa y poliacrilamida y que también se puede obtener una absorción pasiva satisfactoria a tubos, perlas, discos o microplacas, de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno.

Una parte esencial del inmunoensayo por enzimas es la conjugación de anticuerpo o antígeno fijado a una enzima. Es necesario que la enzima tenga actividad elevada, sea económica, se obtenga en forma pura y que posea una reacción con el

substrato fácilmente medible. Las enzimas más comunes son la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la B-galactosidasa y la fosfatasa alcalina.

Los substratos deben ser estables y deben ser solubles antes y después de la degradación. Los substratos cromogénicos deben ser incoloros inicialmente y fuertemente coloreados tras la degradación. Para los conjugados de fosfatasa alcalina es adecuado el p-nitrofenil fosfato; para los de peroxidasa, la o-fenilendiamina (38, 37).

Existen varios tipos de ELISA: competitivo, inhibitorio, sandwich e indirecto. Estos métodos son fáciles de realizar, no requiere equipo costoso, sus reactivos son muy estables por largos periodos de tiempo y tienen una sensibilidad similar al RIA.

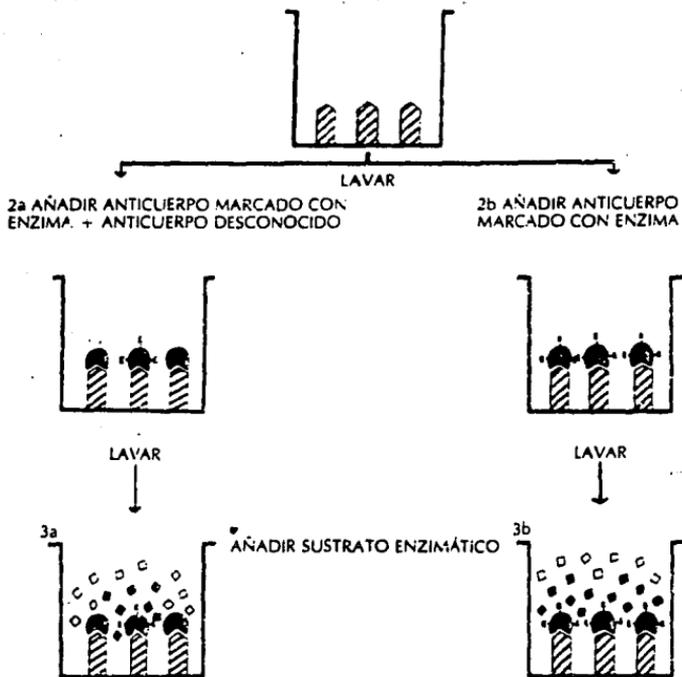
METODO COMPETITIVO.

Este método sirve para determinar anticuerpos o antígenos. Para la determinación de anticuerpos, el anticuerpo se marca con la enzima. El anticuerpo marcado compite con el anticuerpo no marcado en la muestra en estudio por los sitios de unión de un antígeno inmovilizado en una fase sólida como poliestireno. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado solo (anticuerpo marcado) y el conjugado más la muestra ensayada es proporcional a la cantidad de anticuerpo de ésta última (Fig. 8).

METODO DE INHIBICION.

Este sistema se utiliza para la detección de antígeno así como su cuantificación y puede ser utilizado para sustancias de bajo peso molecular en el cual la interacción antígeno-anticuerpo, del antígeno de la fase sólida y el anticuerpo marcado con la enzima, es inhibida por el antígeno libre de la muestra. La diferencia de la degradación entre las pruebas con el conjugado de referencia solo y con el conjugado más la muestra ensayada es proporcional a la cantidad de antígeno de la misma (Fig. 7).

1. ADSORBER ANTÍGENO A SUPERFICIE



HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO = [ANTICUERPO] MARCADO

DIFERENCIA ENTRE 3a y 3b = [ANTICUERPO] "DESCONOCIDO"

Fig. 6 Método competitivo de ELISA en micro placas para la detección y determinación de anticuerpos (38).

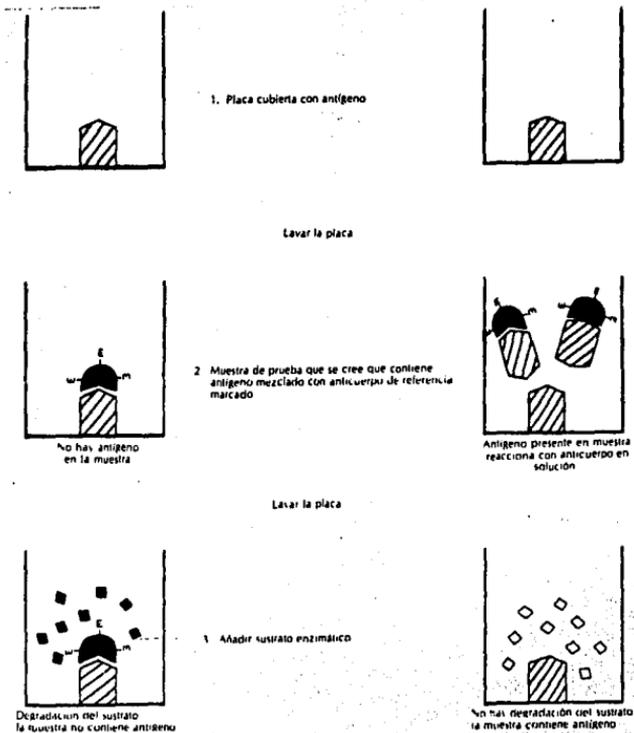


Fig. 7 Método de inhibición de ELISA en microplaca para análisis de antígeno (36).

METODO DE SANDWICH.

Este sistema emplea dos anticuerpos, uno unido a la fase sólida y otro que va marcado por la enzima. El anticuerpo en fase sólida reacciona con el antígeno y después de un lavado, se adiciona el anticuerpo marcado con la enzima. La actividad enzimática en la fase sólida es directamente proporcional a la concentración del antígeno. Se emplea para la cuantificación de marcadores tumorales como la alfafeto proteína y para otros antígenos tales como proteínas (Fig. 8).

METODO INDIRECTO.

El método indirecto es ampliamente utilizado para la determinación de anticuerpo, ya que se necesita sólo unos pocos conjugados (ej. antiglobulinas humanas marcadas con enzimas) para analizar anticuerpos de una variedad de enfermedades.

Este procedimiento emplea antígeno inmovilizado el cual reacciona con el anticuerpo de la muestra, adicionando después el anticuerpo marcado con enzima que es específico para la inmunoglobulina a ser determinada (Fig. 9).

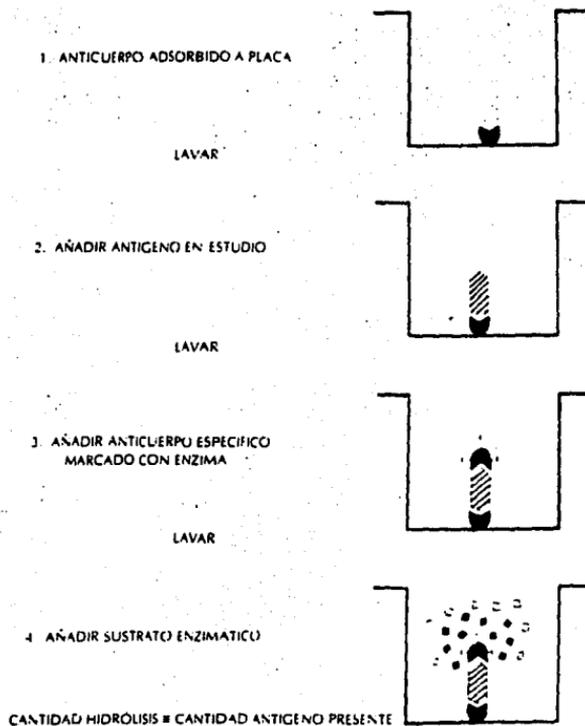


Fig. 8 Método de SANDWICH de doble anticuerpo en microplacas para la detección y determinación de antígeno (38).

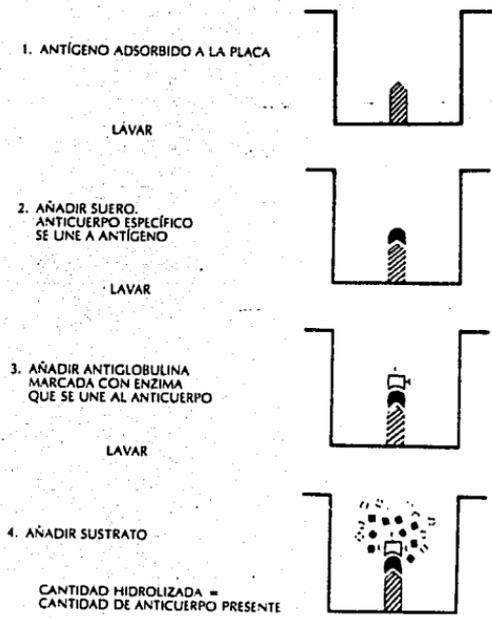


Fig. 9 Método indirecto en microplacas para detección y determinación de anticuerpo (36).

III. FUNDAMENTACION.

El objeto de la producción animal en el Bioterio, debe ser el producir animales los cuales demuestren respuestas estandarizadas a la manipulación experimental. Esto significa que la variabilidad debe de mantenerse mínima y consecuentemente que los experimentos puedan producir resultados significativos. Tales animales se les conoce como animales definidos; éstos deben ser criados bajo condiciones estandarizadas, libres de enfermedades y en el caso de especies comunes de laboratorio deberán estar bien caracterizados genética y microbiológicamente (1). Existen cepas de ratones pelones y atímicos nu/nu derivados de Balb/c y de CD1, éstos animales han sido una herramienta excelente para estudiar: rechazo de injertos así como respuesta inmune antitumoral, de hecho es en estos animales donde se descubrieron unas células, no T, no B que tenían actividad antitumoral y que se les denominó linfocitos asesinos naturales (células NK) (12). En el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, surge espontáneamente una cepa de ratones pelones, atímicos derivada de la cepa CD1, llamó la atención por su resistencia a las condiciones estandarizadas del Bioterio y en un estudio realizado se comprobó que no era el ratón atímico desnudo CD1 nu/nu, ya que la nueva cepa, se comprobó que era hipotímica, se le llamó CD1 et/et (10).

Sabemos que la respuesta inmune específica, se encuentra mediada por dos tipos de células. Los linfocitos B, que se generan en médula ósea e hígado fetal y que son las células precursoras de las células productoras de anticuerpo y que en las aves se adiestran en la bursa de Fabricio, mientras que en los mamíferos, en dónde no existe tal estructura, salen de médula ósea con marcadores de linfocitos B. Cuando se sintetizan las cadenas funcionales H y L, se expresa la inmunoglobulina en la superficie celular. Estas células que expresan inmunoglobulina se denominan células B vírgenes porque poseen inmunoglobulina funcional sobre la membrana; pero aún no interactúan con el antígeno. En éste estadio las células B migran desde la médula ósea hacia la sangre y tejido linfoide periférico.

Desde la interacción del antígeno con la inmunoglobulina de superficie, las células B se activan y finalmente se transforman en células plasmáticas, responsables de la producción de grandes cantidades de inmunoglobulinas que son secretadas. Algunas células B viven durante años y se denominan células de memoria, éstas células son las responsables de las respuestas de memoria rápida que se observan luego de reexposición a antígenos reconocidos previamente por el sistema inmunitario (12).

Por otro lado tenemos a los linfocitos T que se producen en timo y en médula ósea y mediante un fenómeno llamado "homeing" se dirigen al timo, en donde se adiestran, aprendiendo a conocer lo propio de lo extraño, y es en timo donde se adquieren una serie de receptores que nos reflejan, en cierta medida el grado de maduración y el tipo de célula (15).

La maduración de las células T en el timo se acompaña de una serie compleja de cambios en su genotipo y fenotipo. El timocito de reconocimiento más temprano es la célula pro-T, se puede identificar mediante la expresión de ciertos antígenos de la superficie celular (CD2, CD7) y mediante la presencia del marcador CD3 en el citoplasma. Las células pro-T se diferencian en células pre-T.

Los linfocitos que expresan CD3/TCR alfa/beta en su superficie y reaccionan con antígenos propios, por lo general se eliminan de la población por un proceso aún desconocido. Otros timocitos que poseen CD3/TCR- alfa/beta, se educan para reconocer péptidos antigénicos solo cuando están asociados con proteínas propias MHC, mediante un proceso aún no conocido del todo. La mayoría de linfocitos mueren en éste proceso de selección dentro del timo, solamente una minoría se diferencia en forma exitosa en linfocitos T maduros y migran a los órganos linfoides periféricos y la sangre. En la sangre periférica

cerca del 70% de los linfocitos son linfocitos T (15).

Otras moléculas diferentes del complejo CD3/TCR están encargadas de la diferenciación tímica de linfocitos T y también son marcadores para identificar estadios de maduración. Las células pro-T expresan CD2 y CD1 en la superficie celular, éstos timocitos inmaduros carecen de CD3, CD4 y CD8. Al madurar la mayoría de los linfocitos pro-T y pre-T inician la expresión de marcadores CD1, CD4 y CD8, por lo general dentro de la corteza tímica.

Cierta proporción de las células relativamente inmaduras CD4⁺ CD8⁻ pierden la expresión del CD4 o del CD8 para transformarse en CD4⁺ 8⁻ o CD4⁻ 8⁺, se incrementa la cantidad de CD3/TCR sobre la superficie celular y se pierde la molécula CD1. Estos linfocitos más maduros se les encuentra de manera predominante en la corteza. Las células T que poseen TCR alfa/beta son el tipo predominante de células T en el timo y ganglios linfáticos después de nacer y constituyen casi todos los linfocitos CD3 y células T maduras periféricas. Los linfocitos T maduros se pueden subdividir en base a las expresiones de antígenos CD4 o CD8 sobre la superficie celular (12).

Los linfocitos T realizan una serie de funciones en la respuesta inmune: Son células efectoras v. gr. (linfocitos T

citotóxicos CD8), presentan también un efecto regulador. Los linfocitos supresores que comparten al igual que, los citotóxicos los receptores CD8, intervienen suprimiendo respuestas, por ejemplo ante antígenos propios (38). Tenemos también a los linfocitos T cooperadores CD4, que producen una serie de citocinas con distintos efectos, v. gr. Interleucina II que es un agente mitogénico para linfocitos T e interviene también cooperando con los linfocitos B a los cuales induce a producir respuestas secundarias (17).

Existen diferentes métodos para determinar los tipos celulares de linfocitos T, con la idea de evaluar la respuesta celular. Una forma de hacerlo es mediante la detección de sus receptores por técnicas como las rosetas E (marcador de todos los linfocitos T). Se puede usar también rosetas EA, usando hemolisina IgG, para determinar poblaciones de T supresores, o hemolisina IgM para determinar linfocitos T cooperadores (30). La determinación de las subpoblaciones de linfocitos T, se puede realizar también determinando los receptores CD4 (marcadores^b de los linfocitos T cooperadores/inductores) y los receptores CD8 (marcadores de los linfocitos T citotóxicos/supresores), mediante microscopía de fluorescencia o bien usando citometría de flujo (31, 32).

En años recientes la citometría de flujo ha sido de gran

utilidad en el diagnóstico y pronóstico de diferentes situaciones clínicas, como es el trasplante de órganos y médula ósea, el diagnóstico temprano de leucemias y linfomas, así como la evaluación de pacientes con inmunodeficiencias (32,-36). El fundamento de la técnica está basada en las propiedades de las células individuales, reconocidas por señales electrónicas, de tal manera que mediante la fluorocitometria de flujo se pueden distinguir diferentes tipos de células, de acuerdo a su tamaño y sus granulaciones; pero además se pueden identificar las subpoblaciones celulares si se marcan con anticuerpos monoclonales fluorocromados, antereceptores de las células. Debido a que ésta técnica es confiable, rápida y fácil de manejar un número grande de muestras, ha venido desplazando a la microscopia de inmunofluorescencia (31).

Para medir la respuesta inmune humoral, se usan una serie de pruebas, que varían en cuanto a su sencillez de ejecución, su sensibilidad, su costo, etc. Así tenemos a la precipitación en capilar o en gel, que es fácil de realizar; pero tiene una sensibilidad muy baja. Por otro lado tenemos técnicas muy sensibles como el radioinmunoanálisis (RIA), la cual detecta cantidades de picogramos; pero tiene el inconveniente de usar un equipo caro, de emplear sustancias radioactivas, que tiene generalmente una vida corta (30). Otra técnica es el ensayo de enzima ligado a un inmunoabsorbente (ELISA), permite determi-

nar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante la fijación de uno de ellos a una fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo, mediante una inmunoglobulina anti inmunoglobulina o anti antígeno unida a una enzima, posteriormente se le adiciona el sustrato de la enzima y la transformación del sustrato por la enzima es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo fijado. Existen varios tipos de ELISA: competitivo, inhibitorio, sandwich e indirecto (32, 38). Estas técnicas son fáciles de realizar, no requiere equipo costoso, son muy estables por largos periodos de tiempo y tiene una sensibilidad similar al RIA (38).

IV. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dentro del campo de la investigación, el uso de animales de laboratorio como modelos de trabajo juegan un papel muy importante en la reproducibilidad de resultados. Es por ello que para poder ser utilizados se requiere que estén bien caracterizados tanto genética, microbiológica como inmunológicamente, para tener una variabilidad mínima (1).

En un Bioterio éstos son factores importantes debido a que de ahí es de donde se distribuyen animales a diversos centros educativos con prácticas experimentales, tal es el caso del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que proporciona animales a las carreras de Medicina, QFB, Odontología, Psicología y Biología, así también para investigación y el Posgrado.

El presente trabajo pretende caracterizar una nueva cepa de ratones hipotímicos, sin pelo llamados CD1 et/et los cuales derivaron del CD1 (10) y compararlos con la cepas progenitoras CD1 y CD1 et/+. La caracterización se realizará cuantificando poblaciones celulares con marcadores CD4, CD8 y CD3, por medio de la citometría de flujo, la cual es una técnica que está sustituyendo a la microscopia de inmunofluorescencia (30, 32). Así también se evaluará la respuesta inmune humoral primaria y

secundaria a un inmunógeno timo dependiente, como es la albúmina sérica bovina (BSA), por medio de la técnica de ELISA (32). Otro parámetro que es importante tomar en cuenta es el sexo, ya que las hormonas son un determinante de inmunidad no específica v. gr. sabemos que los estrógenos son inmunopoten- ciadores mientras que los andrógenos son inmunosupresores (39,40).

Debido a que la respuesta inmune mediada por linfocitos T juega un papel primordial tanto en la amplificación de la inmunidad celular T, como en la producción de anticuerpos, entre otras actividades, consideramos que es importante la cuantificación de los marcadores de linfocitos T (CD4, CD8 y CD3) así como la evaluación del tipo de respuesta primaria y secundaria a antígenos timo dependientes, ya que en el ratón CD1 et/et no ha sido caracterizado y parece ser un excelente modelo, debido a su hipotimia, para estudiar enfermedades parasitarias como es la enfermedad de Chagas (41).

V. HIPÓTESIS.

Esperamos que debido a la hipotímia de los ratones CD1 et/et, los linfocitos T totales, así como las subpoblaciones se encuentren alteradas. Con lo que respecta a la respuesta inmune medida por anticuerpos, ante un antígeno timo dependiente, como es la albúmina sérica bovina, esperamos una respuesta deficiente.

VI. OBJETIVOS.

Evaluar las poblaciones de linfocitos T, mediante marcadores de superficie CD4 (cooperadores/inductores), CD8 (citotóxicos/supresores) y CD3 linfocitos T totales, usando el fluorocitómetro.

Medir el título de anticuerpos específicos, de clase IgM (respuesta primaria) y de clase IgG (respuesta secundaria) ante un antígeno timo dependiente (albúmina sérica bovina), mediante la técnica de ELISA.

VII. REACTIVOS.

<u>NOMBRE</u>	<u>ESPECIFICACION</u>
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	J.T. Baker
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	J.T. Baker
Cloruro de sodio (NaCl)	Prod. Quim. Monterrey
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	J.T. Baker
Cloruro de potasio (KCl)	Prod. Quim. Monterrey
Acido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	MERCK
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	J.T. Baker
Acido sulfúrico (H_2SO_4)	Técnica Química S.A.
Albúmina de huevo	SIGMA de México S.A.
Albúmina sérica bovina	" " " "
TWEEN	" " " "
Ortofenilendiamina	" " " "
Anti-Mouse IgM	SIGMA CHEMICAL
Peroxidase conjugate anti-Mouse IgG	" "
Peroxidase conjugate	
Ortho-mune Lysing Reagent	Ortho diagnostic systems

Mab Mouse CD3-fluorescein

Mab to Mouse CD4-R-PE

Anti Mouse Lyt-2-FITC

GIBCO BRL

GIBCO BRL

Becton Dickinson

VIII. MATERIAL.

<u>MATERIAL</u>	<u>ESPECIFICACION</u>
- Tubos de ensayo de 13X100.	Pryex
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 ml.	"
- Probetas graduadas de 25 y 50 ml.	"
- Matraces aforados de 50, 100 y 2000 ml.	"
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, y 10 ml.	"
- Pipetas Pasteur.	---
- Pipetas semiautomáticas de 200-1000 ul.	BRAND
- Pipeta semiautomática de 20-100 ul.	BRAND
- Puntas para pipeta.	---
- Placas de poliestireno.	Costar
- Tubos vacutainer de 13X100 con EDTA.	Becton Dickinson
- Tubos de plástico de 13X100.	---
- Gradilla.	---
- Equipo de disección.	---
- Pipetas semiautomáticas de 25 y 250 ul.	Raining

EQUIPO.

- Balanza granataria.	OHAUS
- Balanza analítica.	Mettler H80
- Centrifuga.	SOL-BAT
- Vortex.	Scientific Indus

- Placa de agitación.

- Lector de ELISA.

- Fluorocitómetro.

tries

Bello Glass,

Ins.

DYNATECH

Ortho Cytoron

Absolute

MATERIAL BIOLÓGICO.

- Ratones machos y hembras.

CD1, CD1 et/+ y

CD1 et/et

IX. METODOLOGIA.

INNUNIZACION DE RATONES PARA LA EVALUACION DE LA RESPUESTA PRIMARIA.

Se trabajaron con lotes de 10 ratones de las cepas CD1 machos, CD1 hembras, et/+ hembras, et/et machos y et/et hembras.

- Cada uno de los ratones de las distintas cepas fueron inoculados por vía subcutánea con $5 \mu\text{g}/0.1$ ml de BSA.
- Después de 8 días se sangraron los ratones, incubándose la sangre a 37°C durante 30 minutos para separar los sueros, los cuales fueron colocados en viales y mantenidos en congelación.

INNUNIZACION DE RATONES PARA LA EVALUACION DE LA RESPUESTA SECUNDARIA.

Se trabajaron con lotes de 10 ratones cada una de las cepas CD1 machos, CD1 hembras, et/+ machos, et/+ hembras, et/et machos y et/et hembras.

- Cada uno de los ratones fueron inoculados por vía subcutanea con $5 \mu\text{g}/0.1$ ml de BSA.
- Después de 8 días se les puso un refuerzo de BSA ($5 \mu\text{g}/0.1$ ml).
- A los 15 días se sangraron a los ratones, incubándose la

sangre a 37°C durante 30 minutos; se centrifugó para separar los sueros colocándolos en viales y mantenidos en congelación.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS DE TIPO I_gM POR LA TECNICA DE ELISA.

- Se preparó una solución de BSA en buffer de carbonatos-bicarbonatos con una concentración de 8 μ g/ml.
- En cada uno de los pozos de la placa de poliestireno se pegaron 100 microlitros de la solución de BSA excepto en la fila H donde solo se puso PBS.
- La placa se dejó reposar durante 18 horas a 4 C.
- Se tiró el sobrenadante de la placa y se bloqueó con 300 μ l de albúmina de huevo al 1% en PBS con leche al 5%, incubándose durante 30 minutos a 37°C.
- Se tiró el sobrenadante de las placas, lavándose 4 veces con PBS-TWEEN dejando actuar 1 minuto la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante.
- Se preparó una dilución 1:10 de cada uno de los sueros problema.
- Se agregaron 100 μ l de cada suero problema y se incubaron durante 1 hora a 37°C, se tiró el sobrenadante y se lavó 4 veces con PBS-TWEEN, dejando actuar 1 minuto la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante y lavando 4 veces como se realizó anteriormente.

- Se pusieron 100 μ l del sustrato y se incubó a 37°C durante 15 minutos, se paró la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ a 2.5 N.
- Se leyó la densidad óptica a 492 nm.

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG POR LA TÉCNICA DE ELISA.

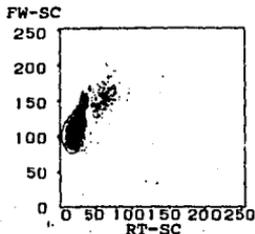
- Se siguió el mismo procedimiento que para IgM, sólo que ahora se le puso el conjugado anti-IgG.

FLUOROCITOMETRIA DE FLUJO.

- Se utilizaron lotes de 10 ratones CD1 machos, CD1 hembras, et/+ machos, et/+ hembras, et/et machos y et/et hembras.
- Se sangraron los ratones obteniendo aproximadamente 1 ml de cada uno mezclándolo con EDTA.
- Se utilizaron 4 tubos para cada muestra de sangre rotulando los de la siguiente forma:
 - absoluto
 - CD3
 - CD4
 - CD8
- Estos tubos se colocaron en un baño de hielo.
- Se adicionaron 4 μ l del anticuerpo anti CD3, anti CD4 y anti CD8 en los tubos correspondientes.
- Se adicionaron 50 μ l de sangre en cada uno de los tubos para cada muestra y se agitaron.
- Se incubó 30 minutos en baño frío a 4°C con agitación cada 10 minutos.
- Se agregaron 2 ml de lisante y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos.
- Se desechó el sobrenadante con una bomba de vacío.
- Se resuspendió en 1 ml de PBS el precipitado.
- Se leyó el porcentaje de cada subpoblación en el fluorocitómetro.

I. RESULTADOS.

Forma de reporte del equipo Ortho Cytoron Absolute.



Total Cells: 4,106 cells/ul
 Gated Cells: 2,972 cells/ul
 Gated/Total: 72.4 %

	Mode ch	SD	CV(%)
RT-SC	18.2	5.2	28.6
FW-SC	107.0	11.0	10.3

T4/T8 Ratio: 4.20

Items [X]/[Y]	REG	Positive%	Count	Reference%
ABSOLUTE/ABSOLUTE	--	68.3	2,193	
	+-	31.7	1,020	
	++	0.0	0	
	++	0.0	0	
ABSOLUTE		0.0	0	10 - 80
ABSOLUTE		31.7	1,020	10 - 80
<hr/>				
/OKT4A		34.9	1,096	25 - 35
<hr/>				
Lyt-2 /		8.3	207	50 - 90
<hr/>				
OKT3 /		51.1	1,520	10 - 80

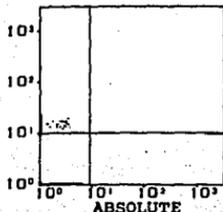
COMMENT: _____

Absolute Count depends on calibration procedure !

Forma en que se comportan los Fluorocromos.

ABSOLUTE

Protocol: ABSOLUTE/ABSOLUTE

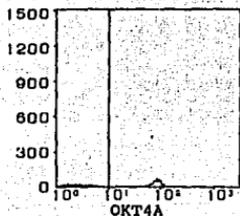


REG -+	REG ++
1,020	0
31.7 %	0.0 %
REG --	REG +-
2,193	0
68.3 %	0.0 %

ABSOLUTE: 0.0 % 0 cells/ul
 ABSOLUTE: 31.7 % 1,020 cells/ul

Counts

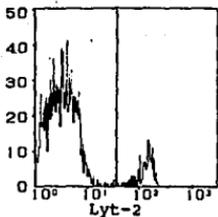
Protocol: /OKT4A



Reg	Positive %	Count	Mode	SD	CV
-	65.1	2,040	13.7	18.7	136.5
+	34.9	1,096	141.4	9.5	6.7

Counts

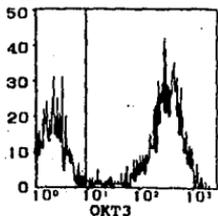
Protocol: Lyt-2 /



Reg	Positive %	Count	Mode	SD	CV
-	91.7	2,294	26.5	23.8	89.8
+	8.3	207	156.9	11.0	7.0

Counts

Protocol: OKT3 /



Reg	Positive %	Count	Mode	SD	CV
-	48.9	1,452	17.0	18.3	107.6
+	51.1	1,520	180.0	29.0	16.1

VALORES DE FLUOROCITOMETRIA DE FLUJO.

CEPA CD1 HEMBRAS.
total de
células.

	T4/T8	OKT4	OKT8	OKT3	
1.-	11.555	2.61	18.8	7.2	24.2
2.-	5.256	1.59	10.5	6.6	21.7
3.-	9.316	3.13	25.1	8.0	34.6
4.-	5.165	2.50	15.3	6.1	18.2
5.-	3.346	2.27	35.1	15.4	52.1
6.-	4.106	4.20	34.9	8.3	51.1
7.-	3.891	3.36	16.8	5.0	21.8
8.-	4.386	2.19	9.0	4.1	12.2
9.-	3.335	2.77	16.4	5.9	23.7
10.-	7.303	2.90	9.6	3.3	11.8

Tabla 1.

CEPA CD1 MACHOS.
Total de
células

	T4/T8	OKT4	OKT8	OKT3	
11.-	2.947	3.13	20.7	6.6	31.3
12.-	3.927	1.91	18.6	9.7	27.4
13.-	7.542	1.62	11.2	6.9	21.7
14.-	3.724	2.04	4.7	2.3	6.0
15.-	4.604	3.19	9.9	3.1	13.1
16.-	6.793	1.7	8.7	5.1	9.9
17.-	4.698	1.84	7.2	3.9	10.8
18.-	5.717	2.85	7.7	2.7	10.3
19.-	7.976	2.5	8.0	3.2	11.9
20.-	4.06	2.59	10.9	4.2	18.8

Tabla 2.

CEPA et/+ HEMBRAS.

	Total de células	T4/T8	OKT4	OKT8	OKT3
21.-	2.735	2.39	23.9	10.0	30.6
22.-	3.088	1.46	10.4	7.1	15.2
23.-	3.027	2.87	15.5	5.4	26.4
24.-	3.325	1.88	16.8	8.9	34.3
25.-	2.325	2.19	21.9	10.0	35.4
26.-	6.135	1.89	10.4	5.5	17.9
27.-	4.426	1.45	12.1	8.3	25.6
28.-	5.931	1.12	19.0	16.9	42.9
29.-	5.407	1.56	12.4	7.9	19.7
30.-	5.654	2.09	17.2	8.2	27.0

Tabla 3.

CEPA et/+ MACHOS

	Total de células	T4/T8	OKT4	OKT8	OKT3
31.-	7.008	2.52	9.1	3.6	18.1
32.-	5.003	1.88	15.1	8.0	27.8
33.-	6.631	1.48	16.6	11.2	17.5
34.-	4.455	3.17	17.8	5.6	31.8
35.-	8.030	0.69	10.9	15.7	29.1
36.-	6.144	1.78	9.8	5.5	12.1
37.-	7.303	3.42	12.0	3.5	25.0
38.-	7.655	1.43	13.1	9.1	35.9
39.-	7.492	2.87	22.1	7.7	30.7
40.-	6.611	1.42	13.4	9.4	23.7

Tabla 4.

CEPA et/et HEMBRAS.

	Total de células	T4/T8	OKT4	OKT8	OKT3
41.-	3.672	1.29	8.7	6.7	35.8
42.-	2.372	0.97	21.9	22.4	49.9
43.-	3.470	1.90	21.2	11.1	39.0
44.-	5.542	1.85	22.5	12.1	44.7
45.-	6.683	1.62	23.6	14.3	51.1
46.-	11.012	2.63	24.5	9.3	45.7
47.-	6.699	1.57	22.2	14.1	48.1
48.-	9.682	3.42	14.4	4.2	31.2
49.-	7.902	1.01	14.1	13.9	34.3
50.-	5.579	3.58	23.3	6.5	55.8

Tabla 5.

CEPA et/et MACHOS.

	Total de células	T4/T8	OKT4	OKT8	OKT3
51.-	7.448	2.45	10.3	4.2	26.3
52.-	7.902	1.48	13.4	9.0	40.1
53.-	10.404	0.79	7.1	8.9	25.3
54.-	3.222	3.37	46.3	13.7	62.2
55.-	7.786	3.75	18.4	4.9	37.8
56.-	8.159	1.73	11.8	6.8	32.7
57.-	4.53	2.34	22.0	9.4	42.3
58.-	8.025	2.06	12.6	6.1	26.2
59.-	5.359	3.67	20.2	5.5	42.9
60.-	6.795	1.42	14.1	9.9	33.3

Tabla 6.

TECNICA DE ELISA.
ANTICUERPOS DE TIPO IgG anti BSA.

	CD1	CD1	et/+	et/+	et/et	et/et
1.-	.732	.743	.756	.406	.754	.759
2.-	.736	.664	.759	.763	.754	.600
3.-	-	-	.763	.759	.783	.651
4.-	.770	.730	.631	.754	.768	.745
5.-	.707	.783	.756	.420	.766	.675
6.-	.743	.783	.775	.743	.759	.750
7.-	.747	.743	.759	.770	.759	.589
8.-	.756	.656	.759	-	.743	.683
9.-	.700	.756	.754	-	-	.752
10.-	-	.759	-	-	-	.738

Tabla 7.

TECNICA DE ELISA.
ANTICUERPOS IgM anti BSA.

	CD1	CD1	et/+	et/+	et/et	et/et
1.-	.496	.632	-	.403	.165	.245
2.-	.425	.136	-	.200	.168	.407
3.-	.224	.343	-	.117	.193	.136
4.-	.381	.672	-	.140	.109	.461
5.-	.622	.215	-	.584	.291	.123
6.-	.231	.222	-	.059	.299	.233
7.-	.202	.145	-	.368	.240	.216
8.-	.130	.104	-	.071	.368	.635
9.-	.181	.064	-	.149	.207	.431
10.-	.186	-	-	.104	.168	.437

Tabla 8.

MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDARES DE IgM e IgG.

	IgG		IgM	
	MEDIAS	SD	MEDIAS	SD
CD1 hembras	.736	.023	.307	.163
CD1 machos	.735	.046	.281	.224
et/+ hembras	.745	.043	.219	.173
et/+ machos	.659	.169	-	-
et/et hembras	.760	.011	.220	.078
et/et machos	.691	.065	.332	.165

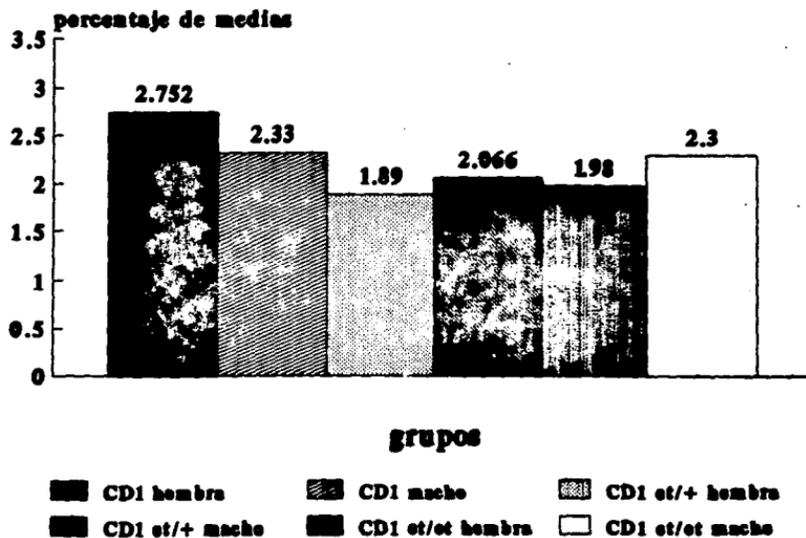
Tabla 9.

CITOMETRIA DE FLUJO.
MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDARES.

	T4/T8		OKT4		OKT8		OKT3	
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
CD1	2.75	0.715	19.15	9.63	6.99	3.36	27.14	14.4
CD1	2.33	0.591	10.76	5.07	4.77	2.33	16.1	8.3
et/+	1.89	0.518	15.96	4.7	8.82	3.25	28.1	9.03
et/+	2.06	0.886	13.99	4.0	7.93	3.71	25.17	7.4
et/et	1.98	0.93	19.84	5.53	11.48	5.23	43.56	8.11
et/et	2.35	1.01	17.62	11.07	7.89	2.88	36.91	11.1

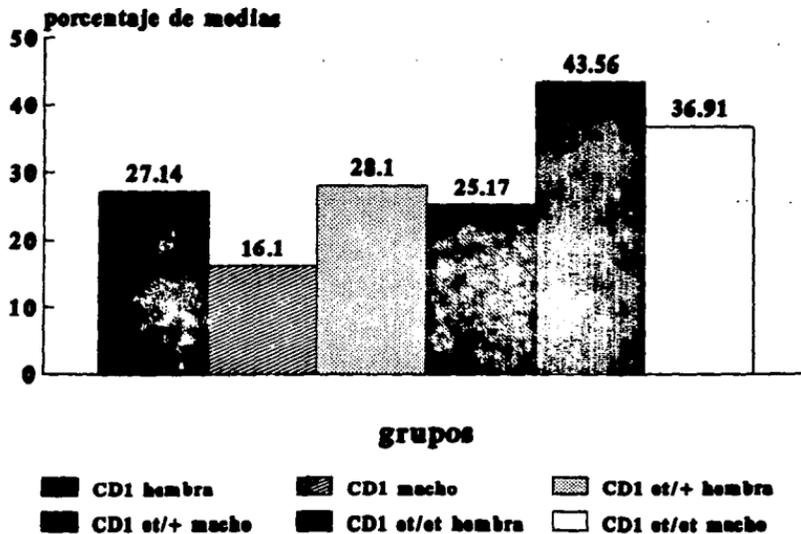
Tabla 10.

FLUOROCITOMETRIA DE CELULAS MURINAS CD4/CD8



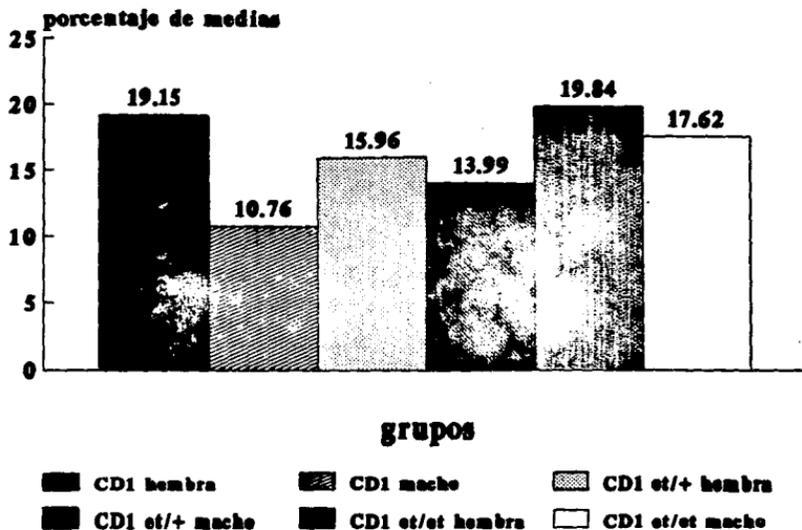
gráfica 1.

FLUOROCITOMETRIA DE CELULAS MURINAS CD3



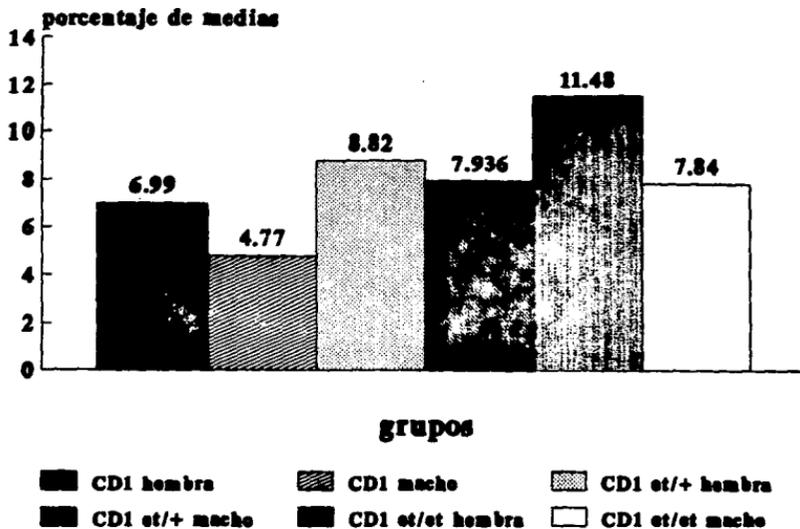
gráfica 2.

FLUOROCITOMETRIA DE CELULAS MURINAS CD4



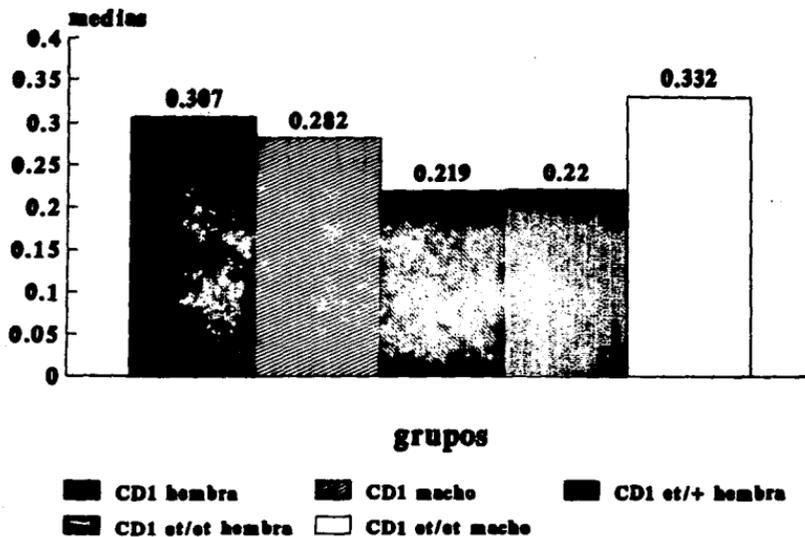
gráfica 3.

FLUOROCITOMETRIA DE CELULAS MURINAS CD8



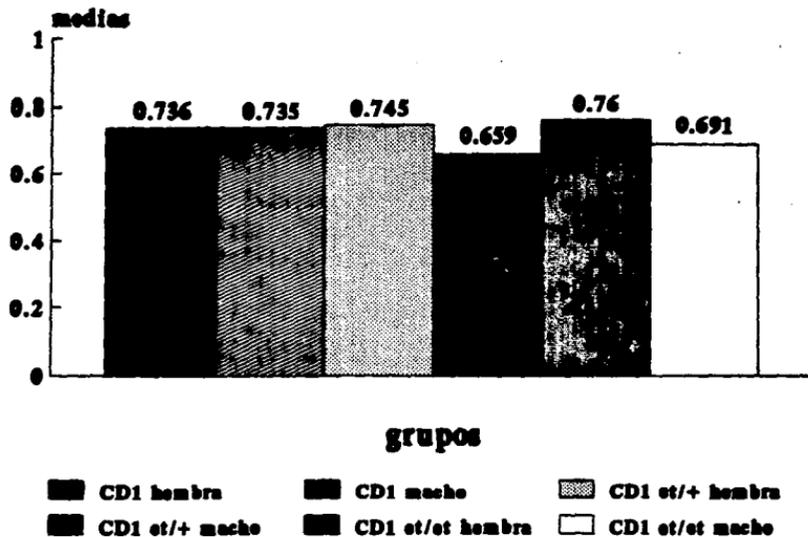
gráfica 4.

RESPUESTA PRIMARIA A BSA. IgM DETERMINADA POR ELISA.



gráfica 5.

RESPUESTA SECUNDARIA A BSA. IgG DETERMINADA POR ELISA.



gráfica 6.

XI. ANALISIS DE RESULTADOS.

En el análisis estadístico por Kruskal Wallis que se aplicó a los resultados obtenidos por citometría de flujo, se encontró una diferencia significativa entre las cepas de ratones estudiados CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et. Como se observa en la gráfica número 2 la cepa que difiere es la CD1 et/et en cuanto a que el porcentaje de linfocitos totales es mayor; en la gráfica número 3 no se observa claramente quien es el grupo que difiere por lo que se realizó la prueba de U de Mann Whitney la cual nos indicó que la cepa diferente es la et/et. La subpoblación de linfocitos T₂ es mayor en la cepa CD1 et/et como observamos en la gráfica 4.

En estudios realizados en los cuales se le han hecho diferenciales a estos ratones reportan una linfocitosis de aproximadamente el 80 % lo cual apoya a los resultados obtenidos.

En los ratones hipotímicos, la degeneración de su timo puede provocar que este no tenga sus funciones normales, por lo cual se puede suponer que dentro del timo no halla una eliminación adecuada de linfocitos, como se llevo a cabo en el timo de los ratones normales, donde hay un proceso de selección dentro del timo en el cual la mayoría de los linfocitos se eliminan y solamente una minoría se diferencie en linfociti-

tos T maduros los cuales migran a órganos linfoides secundarios y a sangre.

Por otra parte se encontró diferencia entre machos y hembras de las distintas cepas. Observándose que las hembras presentan un número mayor de linfocitos T, como se ve en las gráficas 2, 3 y 4. En un estudio realizado por la Dra. Rosas se encontró que las hembras tienen un timo de mayor tamaño comparado con el de los machos, lo cual puede explicar la diferencia que se observa entre los sexos debido a la relación que hay entre el tamaño del timo y la capacidad para diferenciarse los linfocitos T (10).

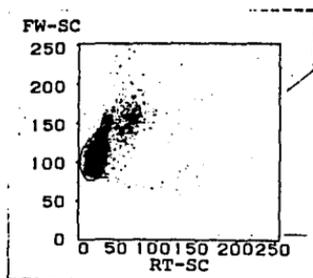


Fig. 10

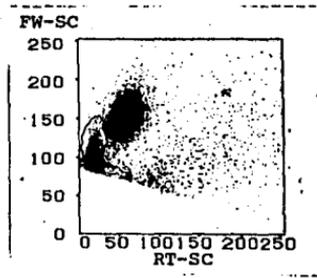


Fig. 11

En las figuras 10 y 11 se presentan como se distribuyen las poblaciones celulares del ratón CD1 y CD1 et/et respectivamente como se observa en la figura 10 la nube de células es más uniforme comparada con la figura 11 en donde se observa claramente la formación de dos nubes, una de las cuales se piensa que son células atípicas en forma y tamaño.

Como se observa en los resultados obtenidos por la técnica de ELISA en las tablas 7 y 8 y de acuerdo al diseño estadístico podemos decir que las cepas de los ratones CD1 et/et tienen una respuesta casi igual a la de los ratones CD1 y CD1 et/+.

En la síntesis de anticuerpos de tipo IgM la respuesta fue semejante aunque ya se ha reportado que el contenido total de inmunoglobulinas presentes en el suero de algunas cepas de ratones como el nu/nu puede ser variable o puede ser comparable a la de los ratones normales. Se ha encontrado que los niveles de IgM se encuentran algunas veces por arriba de los valores normales. Esto se puede deber a que la elaboración del fragmento constante de la cadena *μ* es independiente del timo, del antígeno y que el mecanismo de desviación hacia la síntesis de los fragmentos constantes de las otras inmunoglobulinas es antígeno dependiente.

En el análisis de la respuesta secundaria no se encontró

diferencia significativa entre las distintas cepas estudiadas ya que se observaron valores semejantes de anticuerpos de tipo IgG.

Considerando la hipotimia de los ratones y sabiendo que los linfocitos T regulan la actividad de los linfocitos B para que se dé lugar a una respuesta secundaria, esperábamos una respuesta baja y aún más sabiendo que el antígeno que inyectamos era tino dependiente pero observamos que la hipotimia no los hace completamente incompetentes, porque puede haber una maduración de linfocitos T y estos activar a las células B, aunque también en estudios realizados se ha observado que la función de los linfocitos B es de un 87%.

Estadísticamente encontramos que sólo hay diferencia entre los machos y las hembras de la cepa et/et, observando en la gráfica 6 que las hembras dan una respuesta mayor que los machos, ya que se ha encontrado una estrecha relación del sistema inmune y el reproductivo de los mamíferos y también que las hormonas son un determinante de inmunidad no específica en donde los estrógenos son inmunopotenciadores mientras que los andrógenos son inmunosupresores (39).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

XII. CONCLUSIONES.

Según los resultados obtenidos y el análisis realizado de estos se llegan a las siguientes conclusiones:

- 1.- La diferencia entre las cepas CD1, CD1 et/+ y CD1 et/et es significativa en cuanto a la cuantificación de sus receptores de superficie por citometría de flujo pero en cuanto a la evaluación de su respuesta primaria y secundaria a BSA por la técnica de ELISA es similar.
- 2.- Con respecto a los sexos, hay una diferencia significativa entre estos, dando un porcentaje mayor las hembras en la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T y su respuesta primaria y secundaria.
- 3.- La cepa CD1 et/et en la cuantificación de sus receptores de superficie es diferente a las cepas CD1 y CD1 et/+, presentando un número mayor de linfocitos T, y su respuesta humoral (respuesta primaria y secundaria) ante un antígeno tino dependiente es parecida a las cepas de ratones anteriores con las que se compararon, por lo que se concluye que su estado de hipotimia no los hace incompetentes completamente.

XIII. ANEXOS.

Preparación de reactivos para la técnica de ELISA.

Amortiguador de recubrimiento.

Carbonato-bicarbonato pH 9.63

1.58g de Na_2CO_3

2.93g de NaHCO_3

Disolver ambos reactivos con agua bidestilada juntarlos y llevarlos a 1 litro de agua bidestilada.

Se puede almacenar a 4°C por no más de 2 semanas.

PBS-TWEEN.

8.0g de NaCl

0.2g de KH_2PO_4 .

2.9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{I}_2\text{H}_2\text{O}$.

0.2g de KCl .

0.5 ml de TWEEN 20.

Disolver los reactivos con agua bidestilada juntarlos y llevarlos a 1 litro de agua bidestilada ajustando el pH a 7.4 y guardar a 4°C .

Sustrato de peroxidasa.

Acido cítrico 0.1 M (24.3ml).

Na_2HPO_4 0.2M (25.7ml).

El sustrato se prepara antes de usarlo porque es sensible a la luz.

Ortofenilendiamina 40 mg disolverla en 100 ml del amortiguador del sustrato y adicionarle 40 microlitros de H_2O_2 al 30%.

XIV. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Poole T. The WFAW Landbook on: the care and management of laboratory animals. Sixth edition. Great Britain: Longman Scientific Technical, 1988: 1-15.
- 2.- Rygaard J, Povisen O. Heterotransplantation of human malignant tumor to the mouse mutant nude. Acta Pathol.Microbiol. Scand 1968; 77: 758.
- 3.- Hag Bj. Animal models of immunological processes. London: Academic Press Inc, 1982: 138-141.
- 4.- Flanagan SP. Nude, a new hairless gene with pleist effects in the mouse. Genet Res. 1966; 8: 295.
- 5.- Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 1968; 217: 370-371.
- 6.- Pantelouris EM. Nude mice with normal thymus. Nature 1975; 254: 140-141.
- 7.- Pantelouris EM. Thymus rudiment of the athymic nude mouse. Nature 1975; 256: 491-493.
- 8.- Pantelouris EM. Observations on the immunobiology of "nude" mice. Immunology 1971; 20: 247-252.
- 9.- Wortis HH. Immunological responses of "nude" mice. Clin. Exp. Immunol 1971; 6: 305-317.
- 10.- Rosas P. et. al. The existence of spontaneous hairless nude hypothyroid mutant mice from the CD1 strain reared under conventional house conditions. Med. Sci. Res. 1987;

- 15: 553-554.
- 11.- Rose RN, Milgram MF, Carel VJ. Principios de inmunología. México: Continental, 1983: 43, 49-50
 - 12.- Stites DP, Terr AI. Inmunología básica y clínica. 7a. edición. México: El manual moderno, 1983: 302-304.
 - 13.- Claman NH. The biology of the immune response. JAMA 1992 268: 2790-2795.
 - 14.- Barret TJ. Inmunología. 4a. edición. México; Interamericana, 1985: 78-79.
 - 15.- Boehmer HV, Kisielow P. How the immune system learns about self. Sc: Amer 1991; 285: 50-59.
 - 16.- Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B Lymphocyte response. Annu Rev immunol 1988; 6: 485.
 - 17.- Hamblin AS. Lymphokines. Washington DC: IRL Press Oxford, 1990: 36.
 - 18.- Jawetz E, Melnick J. L. Microbiología médica. 13a. edición. México: El Manual Moderno, 1990.
 - 19.- Brinkmann V, Heusser C. T cell-dependent differentiation of human B cells into IgM, IgG, IgA or IgE plasma cells: high rate of antibody production by IgE plasma cells, but limited clonal expansion of IgE precursors. Cell Immunol 1993; 152: 323-331.
 - 20.- Roitt MI, Brostoff J, Male D. Inmunología. 2a. edición. Barcelona: Salvat, 1991: 2.4-2.6.
 - 21.- Margni AR. Inmunología e inmunquímica. 4a. edición. Bue-

- nos Aires: Médica panamericana, 1988: 571-578.
- 22.- Berek C, Ziegner M. The maturation of the immune response. *Immunol Today* 1993; 14:400-404.
- 23.- Koning F. Lymphocyte antigen receptors: a common design? *Immunol Today* 1991; 12: 100-101.
- 24.- Mac Donald HR, Less KR, Sordat B. Age-associated increase in expression of the T cell surface markers Thy-1, Lym-1 and Lym-2 in congenitally athymic (nu/nu) mice: analysis by flow microfluorometry. *J Immunol* 1981; 128: 865-869.
- 25.- Shaw S. Characterization of human leukocyte differentiation antigens. *Immunol Today* 1987; 8: 1-3.
- 26.- Boehmer HV. The developmental biology of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 309-321.
- 27.- Allison JP, Lanier LL. Structure, function and Serology of the T cell antigen receptor complex. *Annu Rev Immunol*.
- 28.- Kabelitz D, Janssen O, Brucker C. Use of OKT3 hybridoma cells to clonally activate CD3+ human T Lymphocytes. *J Immunol methods* 1988; 107: 211-216.
- 29.- Godfrey ID, Zlotnik A. Control points in early T cell development. *Immunol Today* 1993; 14: 547-551.
- 30.- Weir DM (editor). *Handbook of experimental immunology*. Fourth ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988: vol. 2: 22-30.
- 31.- Mishell B, Shiigi SM (editors). *Selected methods in*

- cellular immunology. New York: W.H. Freeman and company, 1980: 247-257.
- 32.- Rose RN, Conway ME, Fahey LJ, Friedman H, Penn MG. Manual of clinical laboratory immunology 4a. edición. Washington DC: American Society for Microbiology, 1982: 158-159, 164- 168.
- 33.- Ruiz AA. Flow cytometry in the clinical laboratory. *Cli. Chim. Acta* 1992; 211: 513-514.
- 34.- Finegold MS, Baron JE. Diagnóstico microbiológico 7a. edición. Buenos Aires: Médica panamericana, 1988: 154-158.
- 35.- O'beirne JA, Cooper RH. Heterogenous enzyme immunoassay. *J of Immunochemistry* 1979; 22: 1148-1156.
- 36.- Rose RN, Friedman H. El laboratorio en inmunología clínica. 2a. edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1984: 414-415, 419-425.
- 37.- Karbowski I, Appel S. Determination of Lymphocyte subpopulations by enzyme immunoassay. *J. Immunol Methods.* 1988; 112: 31-35.
- 38.- Theophilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 1985; 37: 269.
- 39.- Mountz JD, Talal N. Retrovirus, apoptosis and autogenes. *Immunol Today* 1993; 14: 532-536.
- 40.- Rosas P, De paz R, Hernández-Ehlers V, Quiroz U, Domínguez R. Sex differences in the effects of gonadectomy and

- hemigonadectomy on the weight of the thymus in adult mice. *Med. Sci. Res.* 1992; 20: 509-510.
- 41.- Harroquín-Segura R. et al. Modelo murino CD, et/et para prinoaislamiento de *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del XVII Congreso Nacional de Bioquímica* 1994; 19: 98.
- 42.- Klein J. Athymic (nude) mice. *Immunology* 1990; 481-492.
- 43.- Fogh J. *The nude mouse in experimental and clinical research*. London: Academic Press, 1978: 54-103.