

1 9 8 4 - 2

Reg. No. 078161493

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

DETERMINACION DE LINFOCITOS T Y B EN RATONES
DESNUDOS (nu/nu) Y HETEROZIGOTOS (nu/+) POR
LAS PRUEBAS DE FORMACION DE ROSETAS.

YOLANDA RAMOS ZEPEDA

GUADALAJARA, JAL. 1986.

13958 / 016499
D.S.
g.I

1984-2

REG. NO. 078161493

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LINFOCITOS T Y B EN RATONES
DESNUDOS (nu/nu) Y HETEROZIGOTOS (nu/+) POR
LAS PRUEBAS DE FORMACION DE ROSETAS.

YOLANDA RAMOS ZEPEDA

**DETERMINACION DE LINFOCITOS T Y B EN RATONES
DESNUDOS (nu/nu) Y HETEROZIGOTOS (nu/+) POR
LAS PRUEBAS DE FORMACION DE ROSETAS.**

ESTA TESIS SE REALIZO EN LA DIVISION
DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DE LA UNIDAD
DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE OCCI
DENTE DEL IMSS BAJO LA ASESORIA DEL
M. EN C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA.

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JUAN MORA GALINDO.

**AGRADEZCO AL M. EN C. JUAN MORA GALINDO
SUS ENSEÑANZAS Y ORIENTACIONES PARA LA
REALIZACION DE ESTA TESIS.**

**AGRADEZCO AL M. EN C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA
SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS Y ORIENTACIONES PARA
LA REALIZACION DE ESTA TESIS.**

**A MIS PADRES Y A MI HERMANA
LUZ MARIA.**

A LUIS HUMBERTO BECERRA FIGUEROA.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

INDICE .

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
HIPOTESIS	12
OBJETIVO	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	21
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27

INTRODUCCION.

Los ratones desnudos atímicos nu/nu, son una mutante espontánea de los ratones Balb/c¹. Esta cepa atrajo la atención de numerosos investigadores que vieron la oportunidad que la naturaleza proporcionaba, para emplear un animal con deficiencia congénita de timo^{2,3}, en la realización de estudios dirigidos a valorar de forma directa la influencia tímica sobre las respuestas inmunes celular y humoral¹⁻⁴.

Inicialmente se encontró que los ratones homocigotos nu/nu presentaban deficiencia en su mecanismo de inmunidad celular, lo que permitió asociar esta alteración con su mayor susceptibilidad a las infecciones, en comparación con los ratones Balb/c normales⁵.

Existen antecedentes en relación con la presencia de vestigios tímicos⁶ y células precursoras de linfocitos T en los ratones desnudos nu/nu^{7,8}. La determinación de estas células precursoras se ha realizado por medio de cultivos celulares^{8,9} y estí

mulos específicos¹⁰.

En este trabajo se encontró que en los ratones nu/nu existen linfocitos esplénicos con capacidad para formar rosetas directas con eritrocitos de carnero (EC). Esta prueba es específica para revelar un marcador de superficie que está presente en los linfocitos T. Además se observó que el número de linfocitos con esta característica, fue menor que el encontrado en los ratones heterocigotos nu/+ y Balb/c normales.

ANTECEDENTES.

La inmunidad es la capacidad de un individuo para resistir la agresión de microorganismos potencialmente perjudiciales y forma parte de sus sistemas de defensa. Estos se dividen en específicos e inespecíficos. Los primeros son los mecanismos innunológicos propiamente dichos y los constituyen: la inmunidad celular y la humoral. Entre los inespecíficos se tienen las barreras anatcnofisiológicas del organismo (piel y faneras), la fagocitosis, el interferón y el coplemento^{11,12}.

Los linfocitos y sus células precursoras, están involucrados en las respuestas inmunes humoral y celular, se producen en médula ósea y de ahí son transportados a través del sistema circulatorio a todo el organismo. Existen depósitos de linfocitos y de sus precursores en sitios como el timo, ganglios linfáticos, bazo y amígdalas^{12,13}.

El timo es el órgano central del sistema linfoide³. Se le considera responsable de la capacitación de las subpoblaciones de

linfocitos T efectores de la respuesta inmune celular^{2,5,7,10,14}. Además, existen antecedentes de que el timo y/o células T son indispensables para la capacitación, maduración y activación de las células B, que constituyen los linfocitos efectores de la respuesta inmune humoral^{4,15-17}.

La integridad de la respuesta inmune, tanto humoral como celular y la cooperación de los macrófagos con los linfocitos T y B, son esenciales para mantener un vigoroso sistema de defensa contra ciertos virus, bacterias y hongos. Además la respuesta inmune celular participa en las reacciones de injerto contra huésped y en la protección contra el cáncer^{4,18}.

Existen diversos métodos para el estudio de los mecanismos de defensa específicos¹⁹⁻²⁶. La respuesta inmune celular se valora entre otros métodos, mediante pruebas de hipersensibilidad retardada hacia diversos antígenos (candidina, PPD, varidasa, coccidioidina e histoplasmina)²¹; factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF)²⁴; pruebas de citotoxicidad^{23,26}, cultivo de linfocitos, para inducir su transformación blastoide¹⁹; por

formación de rosetas-E²⁰. Con el empleo de anticuerpos monoclonales se caracterizan antígenos selectivos de superficie de las diferentes subpoblaciones de linfocitos²⁵.

Para la valoración de la inmunidad humoral, los métodos empleados más comúnmente son: determinación de inmunoglobulinas (por electroforesis, inmunodifusión radial simple e inmunolectroforesis)¹³. Así como también por la presencia de linfocitos B, identificados por marcadores de superficie (receptores para inmunoglobulinas G, A y M) para lo cual se utilizan procedimientos con inmunofluorescencia y rosetas-EA²². O bien, por la producción de anticuerpos específicos mediante la prueba de Cunningham para células formadoras de placa de hemólisis²⁷.

Para determinar las características de los linfocitos T y B, existen diversas pruebas a nivel de marcadores de superficie^{22, 28}. Entre estas se cuenta con la formación de rosetas directas (rosetas-E) e indirectas (rosetas-EA). Las primeras resultan de la interacción directa de los linfocitos T con eritrocitos de carnero (EC) y las segundas por la interacción mediada por

anticuerpos contra EC. El criterio para determinar la forma
ción de ambos tipos de rosetas, se basa en que los linfocitos
con capacidad para formarlas, deben tener adheridos a su su
perficie un mínimo de tres EC^{20,29,30}.

El significado funcional de la capacidad de los linfocitos pa
ra formar rosetas-E no es claro. Pero el método se ha emplea
do como indicador de la heterogeneidad de los linfocitos en
varias especies de mamíferos³¹. Las rosetas-E son el resultado
de la interacción entre un determinante de la superficie
del EC y un receptor específico de la superficie de los linfo
citos aún no caracterizado completamente. La reacción depende
de cationes divalentes (Ca^{++} y Mg^{++}) y está influenciada por
la temperatura y el pH. También se requieren linfocitos via
bles y metabólicamente activos³². Este fenómeno constituye un
marcador exclusivo de los linfocitos T, ya que los B no forman
rosetas de manera espontánea con los EC; sino con EC previame
te tratados con anticuerpos específicos³⁰.

Las rosetas-E que se obtienen al interaccionar directamente lin

BIBLIOTECA GENERAL

focitos T con EC, en medio de cultivo líquido, presentan dos variantes: activas y tardías. Las rosetas-E activas o tempranas, se forman después de incubar los linfocitos y los EC durante 15 min a 37°C, los linfocitos que se identifican de esta manera se sabe que están íntimamente relacionados con los linfocitos que participan en la respuesta inmune celular in vivo (pruebas de hipersensibilidad retardada)³³.

Las rosetas-E tardías se forman después de dos períodos de incubación de la mezcla de linfocitos T con EC. Uno a 37°C por 15 min y otro a 4°C por 16 horas. De esta manera se identifican las subpoblaciones de linfocitos T (cooperadores, supresores, citotóxicos y null) que tienen la propiedad de unirse con EC a temperatura baja y en mayor tiempo^{20,32}.

Los resultados de las rosetas-E, se informan como porcentaje de linfocitos formadores de rosetas-E activas o tardías, según el caso. La suma de ambas poblaciones representa el porcentaje de los linfocitos T existentes y se señalan como porcentaje de linfocitos formadores de rosetas-E totales³⁴.

En cuanto a los linfocitos B, que son los productores de anticuerpos (inmunoglobulinas) que constituyen el sustrato químico de la respuesta inmune humoral, se detectan entre otros métodos por medio de la formación de rosetas indirectas (rosetas -EA). Esta clase de rosetas se forman entre linfocitos B y EC. Los EC se tratan previamente con suero anti-EC y se tienen entonces EC recubiertos de anticuerpos (EA). Los EA se mezclan con los linfocitos B y se incuban a 4°C por una hora. Los EA se unen con el receptor específico del linfocito B para el fragmento Fc del anticuerpo que recubre al EC (IgG). El porcentaje de rosetas-EA representa el total de linfocitos B existentes en la muestra analizada^{29,30}.

Por otra parte, los ratones en general se emplean como modelos experimentales en múltiples estudios inmunológicos^{1,35}. Las poblaciones de linfocitos T y B murinos, por microscopía de luz son indiferenciables. Para caracterizarlos se utilizan métodos inmunológicos para revelar marcadores de superficie de cada subpoblación linfoide. Los linfocitos T de ratón contienen en su superficie antígenos Thy y Ly^{7,14}. En cambio los linfocitos

B presentan el antígeno MBL e inmunoglobulinas en su superficie. Para revelar dichos marcadores, se emplean métodos de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales. Así mismo, los linfocitos murinos se diferencian por su capacidad funcional. Los linfocitos T por pruebas de citotoxicidad¹⁴ y cultivos con estímulos mitogénicos²¹ y los B por su capacidad para formar placas de hemólisis^{27,36,37}. Existen pocos estudios de los linfocitos de ratón que tienen la capacidad de formar rosetas directas^{31,38}. En cambio la prueba de rosetas indirectas para linfocitos B murinos se ha empleado extensamente²².

Los ratones, al igual que otras especies, incluyendo al humano, presentan esquemas de inmunodeficiencias. Flanagan en 1966 describió una mutante espontánea de los ratones Balb/c y la designó con el símbolo nu. Los ratones homocigotos nu/nu tienen la característica de carecer de pelo. Inicialmente se pensó que carecían de timo, por lo cual se les conoce como ratones atímicos¹. En observaciones posteriores se encontró que poseen rudimentos tímicos y presentan deficiencia en la respuesta inmune celular⁶, la cual origina mayor susceptibilidad a las in-

fecciones por bacterias, virus y hongos, que normalmente son toleradas por los ratones normales. En cambio los ratones heterocigotos nu/+ Balb/c, no tienen deficiencia tímica, ni alteraciones inmunológicas^{7,39}.

Los ratones nu/nu se han utilizado como modelo natural para estudiar la participación del timo en la respuesta inmune dirigida contra bacterias, virus, hongos, trasplantes y tumores^{1,5}. Este modelo se semeja al obtenido experimentalmente con ratones timectomizados neonatalmente, tratados con inmunosupresores, mediante radiaciones o con sueros antitímicos o antilinfocíticos. Pero sin los problemas adicionales que se presentan al emplear algunos de estos procedimientos, que provocan alteraciones generales en los animales, por no estar dirigidos específicamente a una población celular. Esto hace que los estudios en los ratones atímicos nu/nu tengan mayor relevancia, por la valoración directa de la influencia del timo sobre las respuestas inmunes, tanto humoral como celular¹⁶.

Los ratones desnudos nu/nu carecen de timo y sin embargo, se señala que su respuesta inmune humoral es normal¹⁶. Esta información en cierta forma, está en oposición con lo señalado en relación con la participación del timo en la regulación de las células B^{9,16,37,40}. Aunque parece ser que los vestigios tímicos o algunas células precursoras de los linfocitos T, son los responsables de la normalidad de la respuesta inmune humoral, que se ha descrito en los ratones nu/nu^{6,10,39,41}.

HIPOTESIS.

Los ratones desnudos atímicos nu/nu tienen linfocitos esplén
nicos, capaces de formar rosetas-E con eritrocitos de carnee
ro.

OBJETIVO.

Este trabajo tuvo por objeto determinar la existencia de linfocitos T y B, por medio de las pruebas de formación de rosetas indirectas y directas en los ratones atímicos nu/nu y en los ratones heterocigotos nu/+ y normales Balb/c.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron tres grupos de 20 ratones machos cada uno, de 3 a 4 meses de edad, con un peso promedio de 22g; de las cepas nu/nu, nu/+ y Balb/c.

Reactivos:**Solución de Alsever:**

Glucosa	20.50 g
Citrato de sodio	8.99 g
Acido cítrico	0.55 g
Cloruro de sodio	4.20 g
Agua	1000.00 ml
pH	6.1

Filtración estéril con filtro Millipore de 0.22 micras.

Solución amortiguadora Salina-Fosfatos (PBS), pH 7.2

Cloruro de sodio	8.50 g
------------------	--------

Posfato de sodio no
nobásico 13.79 g

Posfato de sodio di
básico 14.10g

Agua 1000.00 ml

Solución de Ficoll-Hypaque:

Hypaque al 30% (Dia
trizoato de sodio.
(Sydney Ross Co.) 20.00 ml

Ficoll al 9% 50.00 ml
(PM 40000 Pharmacia)

Densidad: 1.079.

Medio de Cultivo McCoy's (GIBCO).

Suero de Ternera Fetal (GIBCO).

Obtención de linfocitos de bazo.

Los ratones se descerebraron y se les extrajo el bazo⁴². Este se homogenizó en solución amortiguadora salina-fosfatos, 0.1 M, pH 7.2. Los linfocitos se separaron en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque⁴³. Se contaron las células en cámara de Neubauer y se llevaron a la concentración requerida para la formación de rosetas-E y rosetas-EA.

Obtención de eritrocitos de carnero.

De un carnero se extrajeron 10 ml de sangre por punción de la yugular externa. La sangre se depositó en un tubo que contenía un volumen similar de solución de Alsever (anticoagulante y conservador). Estos EC se conservaron a 5°C y se utilizaron durante cuatro semanas y fueron renovados cuantas veces fueron necesarias.

BIBLIOTECA CENTRAL**Obtención del suero anti-eritrocitos de carnero.**

El antisuero contra EC se obtuvo por inmunización de un conejo con 1 ml de EC concentrados, que se inyectaron por vía intraperitoneal semanalmente, durante cuatro semanas. A la quinta semana se extrajeron 20 ml de sangre del conejo, por punción cardíaca. El suero se separó por centrifugación, el cual contiene los anticuerpos contra los EC. El suero se inactivó por calentamiento a 56°C durante 30 min, para inhibir la acción del complemento a través del componente C3. Se determinó la dilución subaglutinante (1:252) para los EC, que se utilizó posteriormente en la prueba de formación de rosetas-EA. El suero fue almacenado en varios tubos y se conservó a -4°C para su uso.

Formación de rosetas:

En los tres grupos de ratones se determinaron los linfocitos esplénicos capaces de formar rosetas directas e indirectas con

EC. El método que se empleó fue el descrito por Semenzato²⁹ para rosetas-E activas y el de Wybran³⁰ para rosetas-E totales. Los linfocitos formadores de rosetas-EA (indirectas), se determinaron por el método de Jondal²⁰. En este trabajo se utilizaron como se indica anteriormente, linfocitos esplénicos murinos, en lugar de linfocitos humanos, como ocurre en los métodos mencionados.

Básicamente los métodos consistieron en lo siguiente:

Rosetas directas.

Las rosetas-E activas se obtuvieron al poner en contacto 5 μ l de EC al 50%, con 7.5×10^5 linfocitos murinos esplénicos, de esta manera se obtuvo una proporción de 25 a 1 respectivamente. Se resuspendieron en medio de cultivo McCoy's adicionado con 10% de suero de ternera fetal (SFT) y se incubaron a 37°C por 15 min. Las rosetas-E totales se obtuvieron por un procedimiento similar al anterior, sólo que además de la incubación a 37°C, se incubaron después a 4°C durante 16 hr. La valoración

se hizo por cuenta diferencial en microscopio de luz con el ob
jetivo 40X. Se consideró como roseta, el linfocito que tenía
unidos a su superficie tres o más eritrocitos de carnero. Se
contaron 300 linfocitos y se diferenciaron los que formaron rosetas
-E. Se reportaron como porciento de linfocitos formadores de rose
tas-E activas o totales, según el caso.

Rosetas indirectas.

Para la determinación de los linfocitos formadores de rosetas-EA
los EC se incubaron con el antisuero contra eritrocitos de car
nero diluido 1:252, durante 15 min a 37°C. Se lavaron dos ve
ces en PBS. Los EC recubiertos de inmunoglobulinas G (IgG) se
pusieron en contacto con los linfocitos esplénicos en una propor
ción de 1:25 (5 ul de EA al 50% y 7.5×10^5 linfocitos). Se resus
pendieron en medio de cultivo de McCoy's, adicionado con 10% de
SFT, en un volumen de 1 ml. Se incubaron a 4°C durante 1 hora.
El criterio para considerar las rosetas-EA fue el mismo que se
utilizó para las rosetas-E. Las rosetas indirectas, fueron repor
tadas como porciento de linfocitos formadores de rosetas-EA.

Los resultados se analizaron mediante la prueba "t" de Student.

RESULTADOS.**Rosetas directas.**

En las Tablas 1 y 2 se observa que los linfocitos formadores de rosetas-E, tanto activas como totales, en los ratones nu/nu se encontraron disminuidos ($p < .001$) en comparación con los de los ratones Balb/c y nu/+.

Rosetas indirectas.

En la Tabla 3 se muestra que los ratones nu/nu tuvieron disminuída la subpoblación de linfocitos B, ya que las cifras de linfocitos formadores de rosetas-EA fue menor que en los ratones Balb/c ($p < .001$) y en los ratones nu/+ (n.s.).

TABLA 1. PORCIENTO DE LINFOCITOS FORMADORES DE ROSETAS-E ACTIVAS.

CEPA	% ROSETAS-E ACTIVAS	PRUEBA "t"	"p"	
1 BALB/c	\bar{X}	10.85	1 vs 2	ns
	\pm	3.55		
2 NU/+	\bar{X}	8.30	1 vs 3	<.001
	\pm	5.31		
3 NU/NU	\bar{X}	1.75	2 vs 3	<.001
	\pm	1.32		

\bar{X} = PROMEDIO DEL PORCIENTO DE VEINTE CASOS.

\pm = DESVIACION ESTANDAR.

ns= NO SIGNIFICATIVA.

TABLA 2. PORCIENTO DE LINFOCITOS FORMADORES DE ROSETAS-E TOTALES.

CEPA	\bar{X}	% ROSETAS-E TOTALES	PRUEBA "t"	"p"
1 BALB/c	\bar{X}	13.45	1 vs 2	ns
	\pm	5.67		
2 NU/+	\bar{X}	17.50	1 vs 3	<.001
	\pm	10.90		
3 NU/NU	\bar{X}	2.45	2 vs 3	<.001
	\pm	1.32		

\bar{X} = PROMEDIO DEL PORCIENTO DE VEINTE CASOS.

\pm = DESVIACION ESTANDAR.

ns = NO SIGNIFICATIVA.

TABLA 3. PORCIENTO DE LINFOCITOS FORMADORES DE ROSETAS-EA.

CEPA	% ROSETAS-EA	PRUEBA "t"	"p"
1 BALB/c	\bar{X} 15.80	1 vs 2	ns
	\pm 3.17		
2 NU/+	\bar{X} 15.10	1 vs 3	<.001
	\pm 8.90		
3 NU/NU	\bar{X} 11.00	2 vs 3	ns
	\pm 4.06		

\bar{X} = PROMEDIO DEL PORCIENTO DE VEINTE CASOS.

\pm = DESVIACION ESTANDAR.

ns = NO SIGNIFICATIVA.

DISCUSION.

Este trabajo permitió saber que por medio de la prueba de for
mación de rosetas-E, se pueden detectar linfocitos esplénicos
murinos, con características de linfocitos T. Esto es, que pre
sentan receptores para eritrocitos de carnero, lo cual constiti
tuye una peculiaridad de los linfocitos T que ha sido poco es
tudiada en ratones^{31,38}.

En relación con las cifras de linfocitos formadores de rose
tas-E en los ratones desnudos nu/nu, se encontró que sólo el
1.75% y el 2.45% de linfocitos esplénicos tuvieron la capacidad
de formar rosetas-E activas y totales respectivamente.
Este resultado llamó la atención, ya que teóricamente debería
detectarse la totalidad de la población de linfocitos T por
estos métodos, que corresponde aproximadamente al 50% de los
linfocitos esplénicos totales⁴⁴. Sin embargo, los resultados
aquí obtenidos están acordes con otros informados anteriormente
en ratones desnudos⁴⁵, aunque emplean otros métodos para

la valoración de linfocitos T, como son la presencia de antígenos de superficie Thy^{7,14}.

Por otra parte, cuando se determinan rosetas-E en linfocitos humanos de sangre periférica, existe una amplia variación en los resultados (5%-80%) debido a que existen diversas variantes y modificaciones de los métodos para la determinación de rosetas-E^{32,33}.

Cabe señalar que el resultado de rosetas-E en los ratones nu/nu, fue significativamente menor ($p < .001$) que en los ratones nu/+ y Balb/c, en los cuales se detectaron respectivamente el 10.85% y el 8.30% de rosetas-E activas y el 13.45% y el 17.50% de rosetas-E totales. Este resultado confirma la existencia de linfocitos T o células precursoras de ellos en ratones nu/nu⁴⁵. Los cuales sin recibir la influencia normal del timo, tienen la capacidad de unirse directamente con los EC.

La elección del método de formación de rosetas-E para determinar

a los linfocitos T o células precursoras de ellos, en los ratones nu/nu, obedeció a que han sido empleados otros métodos para el estudio de linfocitos T murinos. Entre estos métodos se encuentra el cultivo de linfocitos estimulados con mitógenos y los resultados se interpretan de manera similar a los obtenidos en humanos. De esta manera, la capacidad de transformación por mitógenos, la comparten los linfocitos T humanos y los de ratón¹.

Así mismo, se considera como marcador de superficie de los linfocitos T humanos la capacidad de formar rosetas-E²². En base a esto, se pensó que si los linfocitos murinos tienen la capacidad de proliferar mediante estímulos mitogénicos, de la misma manera que los linfocitos humanos. También tendrían la capacidad de formar rosetas-E. Esto quedó de manifiesto con los resultados del presente trabajo.

Con referencia a la capacitación de los linfocitos B de los ratones nu/nu, se puede señalar que es multifactorial, dado que los linfocitos con características de T detectados por la prueba

ba de formación de rosetas-E, son escasos en los ratones nu/nu, otros factores tímicos o extratímicos son los responsables de la capacitación de los linfocitos B. Ya que aun cuando esta sub población de linfocitos se encontró numéricamente disminuída, funcionalmente desempeña su actividad normal en la respuesta in mune humoral de los ratones desnudos^{15,22}.

CONCLUSIONES.

BIBLIOTECA GENERAL

1. Los ratones desnudos nu/nu contienen linfocitos esplénicos con capacidad para unirse directamente con eritrocitos de carnero, formando rosetas-E activas y totales. Esto constituye una propiedad específica de la membrana linfocítica que los identifica como linfocitos T.
2. El número de linfocitos esplénicos, formadores de rosetas-E de los ratones desnudos nu/nu, resultó significativamente menor que en los ratones heterocigotos Balb/c nu/+ y Balb/c normales.
3. Los ratones nu/nu tuvieron también disminuída la cantidad de linfocitos formadores de rosetas indirectas, en comparación con los ratones nu/+ y Balb/c.
4. Los ratones desnudos nu/nu tienen deficiencia cuantitativa de linfocitos T y linfocitos B.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Fogh, J. y Giovanella, B. The nude mouse in experimental and clinical research. Acad. Press. New York, 1978.
2. Pierpaoli, W. y Sorkin, E. Relationship thymus and hypophysis. Nature 215:834-837, 1967.
3. Rosen, F. S. The lymphocyte and the gland thymus-congenital and hereditary abnormalities. New Eng. J. Med. 279:643-648, 1968.
4. Broder, S. y Waldman, A. The supressor-cell network in cancer. New Eng. J. Med. 299:1281-1284, 1978.
5. Shiriashi, A.; Nakagaki, K. y Arai, T. J. Experimental sporotrichosis in congenital athymic (nude) mice. Reticuloendoth. 26: 333-336, 1978.
6. Holub, M.; Rossman, P.; Tlaskalova, H. y Vdmarova, H. Thymus rudiment of the athymic nude mouse. Nature 256:491-493, 1975.
7. Komuro, K. y Boise, E. A.: Induction of T lymphocytes from precursor cells in vitro by product of the thymus. J. Exp. Med. 138:479-482, 1973.
8. Chervenak, R.; Moorhead, J. W. y Cohen, J. J. Prethymic T cells precursors express receptors for antigen. J. Immunol. 134:695-698, 1985.
9. Beatie, G. M.; Baird, S. M. y Lipsick, J. S. Induction of T and B lymphocyte responses in antigenically stimulated athymic mice. Cancer Res. 41:2322-2327, 1981.

10. Komuro, K. y Boyse, E. A. In vitro demonstration of thymic normal in the mouse by conversion of precursor cells into lymphocytes. *Lancet* 1:740-743, 1973.
11. Gotoff, S. P. Neonatal Immunity. *J. Pediatrics* 85:149-154, 1974.
12. Stites, D. P.; Stobo, J. D.; Funderberb, H. H. y Wells, J. V. *Basic & Clinical Immunology*. Lange Med. Pub., 1982.
13. Barret, J. T. *Textbook of Immunology. An introduction to Immunochemistry and Immunobiology*. Ed. C. V. Mosby Co., 1974.
14. Haaijman, J. J.; Micklem, H. S. y Ledbetter, J. A. T cell ontogeny. Organ location of maturing populations as defined by surface antigen markers is similar in neonates and adults. *J. Exp. Med.* 153:605-614, 1981.
15. Cancro, M. P. y Klinman, N. R. B cell repertoire diversity in athymic mice. *J. Exp. Med.* 151:761-766, 1980.
16. Misfeldt, M. L. y Hanna, E. E. Complementation of the plaque foraing cell responses of T-cell-deficient nude mice by a T cell hybridoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:1813-1817, 1981.
17. Singer, A.; Hathcock, K. S. y Hodes, R. J. Self recognition in allogenic thymic chimeras. Self recognition by T helper cells from thymus-engrafted nude mice is restricted to thymic H-2 ha plotype. *J. Exp. Med.* 155:339-344, 1982.

18. Unanue, E. R. Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. *New Eng. J. Med.* 303:977-985, 1980.
19. Fitzgerald, M. G. The establishment of a normal human population dose-response curve for lymphocytes cultured with PHA (phytohemagglutinin). *Clin. Exp. Immunol.* 8:421-425, 1971.
20. Jondal, M.; Holm, G. y Wigzell, H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 136:207-215, 1972.
21. Dwyer, J. M. y Kantor, P. S. Regulation of delayed hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 137:32-41, 1973.
22. Ross, G. D. Surface markers of B and T cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 101:337-341, 1977.
23. Muchmore, A. V.; Decker, J. M. y Blaese, R. M. Spontaneous cytotoxicity of human peripheral mononuclear cells toward red blood cell targets in vitro. 1. Characterization of the killer cell. *J. Immunol.* 119:1680-1685, 1977.
24. Allardyce, R. A.; Hunt, J. S. y Stewart, R. J. A micro macrophage migration inhibition test for the detection of cellular immunity in vitro. *J. Immunol. Meth.* 27:9-18, 1979.
25. Janossy, G.; Tidman, N.; Papageorgiou, E. S.; Kung, P. C. y Goldstein, G. Distribution of T lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: An analysis with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 126:1608-1613, 1981.

26. Van Kessel, K. P. M.; Visser, M. R. y Van Strijp, J. A. G. Cytotoxicity reactions by different cell populations. Immunology 58:291-296, 1986.
27. Cunningham, A. J. y Szenberg, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. Immunology 14:599-600, 1968.
28. Seeger, R. C. y Stiehm, E. R. T and B lymphocyte subpopulations. Pediatric 55:157-159, 1975.
29. Semezato, G.; Amadori, G.; Sarasin, P. y Gasparotto, G. Active E Rosette formation by human lymphoblasts. Immunology 34:721-724, 1978.
30. Wybran, J.; Carr, M. C. y Fudenberg, H. H. The human rosette forming cell as a marker of a populations of thymus derived cells. J. Clin. Invest. 51:2537-2543, 1972.
31. Sia, D. Y. y Parish, C. R. Anti-self receptors. I. direct detection of H-2 L region restricted receptor on murine thymocytes. J. Exp. Med. 151:553-565, 1980.
32. Steel, C. M.; Evans, J. y Smith, M. A. The sheep-cell rosette test on human peripheral blood lymphocytes: An analysis of some variable factors in the technique. J. Haematol. 28: 245-251, 1974.
33. Jo Florey, M. y Peetoom, P. Modified E-rosette test for detection of total and active rosette forming lymphocytes. J.

34. Ramos-Zepeda, R.; Puebla-Pérez, A. M.; Siordia-Hernández, J. y González-Mendoza, A. Influencia del suero de ternera fetal en la formación de rosetas E activas y totales. Arch. Invest. Med. 14:39-42, 1983.
35. Hobart, M. J. y McConell, I. The immune system. A course on the molecular and cellular basis of immunity. Blackwell, Sc. Pub. Oxford, London. 1980.
36. Jerne, N. K. y Nordin, A. A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140:405, 1963.
37. Abruzzo, L. V. y Rowley, D. A. Homeostasis of the antibody response: Immunoregulation by NK cells. Science 222:581-585, 1983.
38. Bach, J. F.; Dardenne, M. y Salomon, J. C. Studies on thymus products. IV. Absence of serum "thymus activity" in adult NZB and (NZB X NZW) DI mice. Clin. Exp. Immunol. 14:247-256, 1973.
39. Dosch, H. M.; White, D. y Grant, C. Reconstitution of nude mouse T cell function in vivo: IL-2 Independent effect of human T cells. J. Immunol. 134:336-342, 1985.
40. Gordon, J. y Yu, H. Relationship of T cells involved in cell-mediated immunity and antibody synthesis. Nat. New Biol. 244:21-22, 1973.
41. Ikehara, S.; Pahwa, R. N. y Fernandez, G. Functional T cells in athymic nude mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:886-888, 1984.

42. L'Age-Stehr, y Herzenberg, L. A. Immunological memory in mice. I. Physical separation and partial characterization of memory cells for different immunoglobulin classes from each other and from antibody-producing cells. J. Exp. Med. 131:1093-1108, 1970.

43. Eðyum, A. Isolation of mononuclear cells and lymphocytes from human blood. Scand J. Clin. Lab. Invest. 21(Suppl. 97): 77-89, 1968.

44. Scott, D. W. Bases celulares del sistema inmune e inmunorregulación. En: Zinsser Microbiología. Ed. Médica Panamericana pp. 348-367, 1983.

45. Márquez M., H. y Hernández G., A. El ratón desnudo atímico como modelo experimental. Patología 15:119-141, 1977.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 923/86

Srita. Yolanda Ramos Zepeda
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
tema de Tesis "Determinación de Linfocitos T y B en ratones desnudos --
(nu/nu) y Heterozigotos (nu/+) por las pruebas de formación de rosetas"
para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Docencia.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como -
Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora Galindo.



ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Septiembre 25 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdiel.

c.c.p. El M. en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Al contestar este oficio sirvase citar fecha y número

Guadalajara, Jal., Diciembre 4 de 1986.

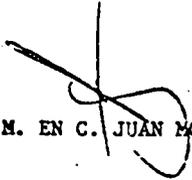
DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara
P r e s e n t e.

Estimado doctor Astengo Osuna:

Por este conducto hago constar que la Pasante de la Carrera de Licenciado en Biología, YOLANDA RAMOS ZEPEDA, ha concluido la tesis titulada DETERMINACION DE LINFOCITOS T y B EN RATONES DESNUDOS (nu/nu) Y HETEROZIGOTOS POR LAS PRUEBAS DE FORMACION DE ROSETAS, y después de haber revisado el manuscrito de la misma, considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad para que se imprima.

Sin otro particular quedo de usted.

Atentamente,


M. EN C. JUAN MORA GALINDO