



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD Y CINETICA  
DE RESPUESTA EN LA SOBREVIDA DE LOS  
ALOINJERTOS EN UN MODELO DE RATAS  
TRANSFUNDIDAS CON SUERO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A N:

NORMA LETICIA PEREZ HERNANDEZ

TRINIDAD OLIVERIA TENORIO VAZQUEZ



MEXICO, D. .F

1985.



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

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

## C O N T E N I D O

1.- INTRODUCCION

2.- GENERALIDADES

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.- OBJETIVOS

5.- HIPOTESIS

6.- MATERIAL

7.- METODOS

8.- RESULTADOS

9.- DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

10.-CONCLUSIONES

11.-BIBLIOGRAFIA

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

La información que se tiene sobre trasplantes data desde hace miles de años, siendo los injertos de piel los primeramente utilizados para corregir defectos congénitos. Hoy en día, el trasplante de órganos ha sido muy variado, dentro de estos tenemos los de hígado, corazón, piel, etc., y con mayor frecuencia se efectúan a nivel de riñón por ser las nefropatías enfermedades muy comunes (1).

A pesar de la experiencia cada día mayor en el campo del trasplante de órganos, todavía se padece de grandes incertidumbres. Esto se debe a que no se conocen bien los diversos aspectos bioquímicos e inmunológicos del trasplante.

Uno de los obstáculos mayores para llevar a cabo el trasplante de órganos, es la respuesta inmune del receptor para con el órgano donado. Dicha respuesta está dirigida hacia los antígenos de histocompatibilidad del donador. En el humano la respuesta humoral está dirigida contra los antígenos de histocompatibilidad HLA-ABC (antígenos definidos serológicamente) mientras que la respuesta celular involucra los antígenos de histocompatibilidad HLA-DR (antígenos definidos por linfocitos), (2) para tratar de evitar dicha respuesta se han utilizado inmunosupresores como: azotioprina, ciclofosfamida, metrotexane, corticosteroides y suero antilinfocítico, cuyo efecto no es específico y por lo tanto acarrea complicaciones que con frecuencia conducen a la muerte.

Para evitar el uso de inmunosupresores hace algunos años se empezaron a realizar estudios para ver el efecto de las transfusiones de sangre en los trasplantes.

Los resultados eran claramente mejores en los trasplantes a receptores que habian recibido varias transfusiones, que en los que no habian recibido ninguna (3,4).

También se ha visto que se produce una inducción de no respuesta mediante el uso de inyecciones repetidas de sangre o de suero, y últimamente se registro un estudio en el cual se demostro que la sobrevida de los aloinjertos era mayor cuando se utilizaba suero en vez de sangre (23).

Con base en estos últimos conocimientos nos motivamos para estudiar la especificidad y cinética de respuesta que presenta la sobrevida de los aloinjertos.

Esta determinación es importante para el avance de las ciencias implicadas en el proceso de trasplatación y práctica clínica, ya que, determinando un método específico para la prolongación de la sobrevida de los aloinjertos que puede ser reproducible en humanos se evitaría la aplicación de drogas inmunosupresoras como único método terapéutico el cual trae multiples alteraciones secundarias en el paciente tratado.

## GENERALIDADES

### MECANISMOS DE LESION TISULAR EN LA DESTRUCCION DEL INJERTO

Se han propuesto varios procesos para el mecanismo de destrucción de un aloinjerto, el cual no ha sido explicado por completo. Las siguientes combinaciones pueden estar implicadas en él: activación de linfocitos, citotoxicidad de células T, citotoxicidad por mediación celular con colaboración de anticuerpos, citotoxicidad de los macrófagos, citotoxicidad por mediación de anticuerpos y complemento, y lesión tisular iniciada por las linfocinas (24).

### CITOTOXICIDAD DE LAS CELULAS T

Los linfocitos T activados pueden ser por si mismos directamente citotóxicos para las células "objetivo". In vivo, los linfocitos T citotóxicos aparecen una semana después del injerto y destruyen específicamente las células portadoras de los antígenos apropiados.

Los linfocitos T también pueden destruir de manera indirecta proporcionando un arma a los macrófagos: el factor soluble específico (SMAF), se sugiere que el SMAF puede ser la molécula receptora de los linfocitos T (25).

### EL PAPEL DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos pueden jugar un papel importante después de la hiperinmunización mediante injertos de piel o inyecciones repetidas de células, aumentando la intensidad de rechazo. Los injertos son destruidos rápidamente, en un proceso agudo y son denominados injertos "blancos". Existen muchos otros casos en los que los anticuerpos intervienen activamente: rechazo sobreagudo de injerto de riñón en el hombre provocado por una incompatibilidad sanguínea (sistema ABO), o

cuando un aloinjerto HLA incompatible es trasplantado en un paciente preinmunizado y con anticuerpos citotóxicos antiinjerto circulantes. Este tipo de rechazo se presenta asociado con microtrombosis y ocurre tan pronto como se establece la circulación a través del órgano trasplantado.

El rechazo por mediación de anticuerpos ocurre poco después del trasplante, o varias semanas más tarde. Puede presentarse en forma de lesiones capilares, glomerulares y arteriolas, provocadas por el anticuerpo y el complemento, o en forma insidiosa y lenta, con depósitos subendoteliales del complejo antígeno-anticuerpo y de complemento y trombos de plaquetas.

#### CITOTOXICIDAD POR MEDIACION CELULAR CON COLABORACION DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos pueden causar lesiones tisulares en la ausencia de complemento si se encuentran presentes células normales, no sensibilizadas de tipo "K". La célula K es un linfocito no T con un receptor Fc, pero carente de los otros marcadores en la superficie de células B. Las células K pueden destruir células objetivo sólo cuando éstas se encuentran cubiertas de ciertas subclases de IgG; entonces las células K se adhieren al objetivo mediante sus receptores Fc (26). Sin embargo, para que los anticuerpos funcionen se requiere una inmunización previa extensa y, como algunos huéspedes son mejores productores de anticuerpos que otros, el mecanismo puede ser más eficaz en unos individuos que otros.

#### LINFOCINAS Y MACROFAGOS

El factor de inhibición de la migración (MIF) y probablemente otros factores (linfocinas) son producidos por la interacción in vitro de células alogénicas. El MIF evita la mi

gración de macrófagos fuera de los capilares. Se piensa que este factor asociado a las linfocinas, juega un papel "in vivo" en el rechazo de aloinjertos; la prueba del MIF ha sido recientemente aplicada con éxito en el diagnóstico preventivo de rechazo de trasplante renal en el humano. Las linfocinas pueden ayudar a acumular diversos tipos de leucocitos, incluyendo macrófagos, en el sitio de rechazo del aloinjerto y, probablemente, también participar en la destrucción de células alogénicas (24).

#### PAPEL DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL HOMBRE (MHS) EN LAS REACCIONES ALOINMUNITARIAS

##### EFFECTOS DEL MHS EN LA HISTOCOMPATIBILIDAD

Se concluyó desde hace mucho tiempo que las incompatibilidades del sistema H-2 oponen una barrera de histocompatibilidad más fuerte contra el éxito de un trasplante (de piel), que cualquier otro locus de histocompatibilidad del ratón (5). Esto es válido en el hombre para el sistema principal de histocompatibilidad MHS (HLA). Cuando se introdujeron nuevas pruebas de las interacciones aloinmunitarias (reacción en cultivo mixto de linfocitos, reacción del injerto contra el huésped, linfolisis con mediación celular), la fuerza dominante de la barrera H-2 (HLA) fué evidente una vez más y se supuso que éstas pruebas valúan un tipo de reacción la reacción del aloinjerto, y que sus manifestaciones variaban en función de las condiciones experimentales. Así se consideró que la reacción del injerto contra el huésped difería de la reacción del aloinjerto únicamente en el número desproporcionadamente pequeño de células efectoras comparado con la cantidad de tejidos "objetivo" disponibles. De manera similar, las reacciones de linfocitos en cultivo mixto fueron popularizadas como el modelo in vitro del rechazo del aloinjerto. Se sabe ahora que esta interpretación es inadecuada y



que cada una de las reacciones posee sus características biológicas propias así como sus requisitos genéticos. Se descubrió que el extremo K de H-2 produce reacciones más fuertes en cultivos mixto de linfocitos que el extremo D (6). Estas evidencias fueron particularmente interesantes por sus claras diferencias con los resultados obtenidos con injertos de piel en los que las incompatibilidades K y D tiene un vigor similar (7). Los genes de histocompatibilidad clásicos resultarán ser diferentes de los genes cuyos determinantes estimulan las reacciones de linfocitos en cultivo mixto. Se sabe que las diferentes reacciones aloinmunitarias pueden ser estimuladas por diferentes tipos de estructuras objetivo-antígenos de histocompatibilidad determinantes de la activación de linfocitos, etc., controladas por diferentes genes del complejo H-2.

#### GENES DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL COMPLEJO H-2

Las incompatibilidades totales de un haplotipo H-2 son causa de rechazo rápido de un injerto de piel de 9-14 días. Cuando la incompatibilidad se limita a una parte del complejo H-2 (y el resto es idéntico en el receptor y el donador), la importancia del obstáculo depende de la región comprometida.

La región K presenta un gran obstáculo: los injertos de piel son rechazados habitualmente entre 14 y 21 días; los injertos en segundo intento son rechazados en forma acelerada.

Se piensa que el locus H-2K es el gen de la histocompatibilidad en esta región.

La subregión I-A contiene también un locus fuerte de histocompatibilidad: H-2I; los injertos de piel incompatible I-A son rechazados generalmente entre 14 y 21 días. Injertos repetidos (segundo intento) son rechazados rápidamente en algunas combinaciones (6 a 10 días) pero no en otras.

El resto de la región I posee propiedades débiles de histocompatibilidad. Cuando la región D es incompatible, los efectos de la histocompatibilidad son fuertes y similares a los de la región K o de la subregión H-21. Los injertos son rechazados en un término de 14 a 21 días; injertos repetidos incompatibles en la región D son destruidos rápidamente. Se cree que el locus H-2D es por sí mismo un locus de histocompatibilidad.

#### GENES DEL COMPLEJO H-2 IMPLICADOS EN LA REACCION DE LINFOCITOS EN CULTIVO MIXTO

#### DETERMINANTES DE LA ACTIVACION LINFOCITARIA QUE ESTIMULAN LA REACCION DE LINFOCITOS MIXTOS (MLR)

En el MHS del ratón, los estimuladores de la reacción de linfocitos en cultivo mixto y los determinantes de la actividad linfocitaria (Lads) estén controlados por numerosos genes dispersos en el complejo H-2.

Región I. Los genes que cifran los determinantes de las MLR más fuertes, se sitúan en la subregión I-A, mientras que las subregiones I-B e I-C cifran Lads que son comparativamente menos estimulantes. Todas estas subregiones contienen especificidades Ia y/o genes Ir, y aunque la MLR puede ser bloqueada con antisueros producidos contra varias subregiones I (a veces llamados anti-Ia), la relación exacta entre ese tipo de determinantes aún no ha sido establecida.

Los determinantes de las regiones K y D también estimulan la MLR pero son débiles y por lo tanto difíciles de detectar. No se sabe todavía si estos Lads son las propias especificidades antigénicas H-2.

EL COMPLEJO H-2 Y LA REACCION DE INJERTO CONTRA HUESPED  
(GVHR)

Una GVHR es provocada cuando se inyectan linfocitos T a huéspedes incapaces de rechazar el inóculo por razones funcionales (animales recién nacidos o irradiados) o genéticas (cuando huéspedes híbridos  $F_1$  reciben células linfoides parenterales en inyección intraperitoneal o intravenosa). Las células inyectadas son estimuladas por los aloantígenos del huésped y producen esplenomegalia o, si las diferencias inmunológicas son importantes, pueden provocar su muerte. Si las células son inyectadas en las patas, causan adenopatías de los ganglios poplíteos.

Se observó que la incompatibilidad del extremo K proporcionaba un estímulo más fuerte que la incompatibilidad del extremo D (8). Los Lads más potentes en la estimulación de GVHR situados en el extremo K, son producidos por los genes de la región I, en particular los de la subregión I-A. Estos deben ser diferentes de los Lads que estimulan las reacciones de linfocitos en cultivo mixto, ya que las células linfoides de quimeras tetraparenterales pueden responder a los Lads apropiados en la MLR in vitro, pero no producen GVHR in vivo en ratones  $F_1$  con la misma incompatibilidad (9).

REQUISITOS GENETICOS QUE ORIGINAN LA CAPACIDAD EFECTORA EN  
LA LINFOLISIS POR MEDIACION CELULAR EN EL RATON Y EN EL HU  
MANO

El factor más importante en el rechazo de aloinjertos es la acción de linfocitos sensibilizados específicamente, que se convierten en células efectoras. La incompatibilidad en el producto de un gen de histocompatibilidad produce el rechazo del aloinjerto y el fenómeno es capaz de originar la producción de células efectoras. Esto es válido, para cual-

quiera de las regiones del complejo H-2 con potenciales de histocompatibilidad. La sensibilización in vitro en condiciones óptimas debería aproximarse a la claridad de los resultados in vivo: se producen células efectoras en cualquier incompatibilidad que provoca rechazo de un aloinjerto. Sin embargo algunas incompatibilidades inducen rechazos más fácilmente que otras, para estas, los análisis in vitro apropiados deberían reflejar las diferencias cuantitativa y también cualitativamente, permitiéndose evaluar la fuerza del antígeno. Los análisis de estas diferencias mejoran la comprensión de la naturaleza de la generación de capacidad efectora así como de los papeles individuales de cada una de las regiones. Estos problemas son estudiados in vitro con la prueba de la linfólisis por mediación celular (CML).

Esta prueba de inmunidad (CML) consiste en dos etapas:

- 1.- Etapa de sensibilización. Un cultivo mixto de linfocitos (MLC) en un solo sentido.
- 2.- Etapas efectoras. Cuando las células de la MLC son mezcladas con células objetivo marcadas radiactivamente.

La prueba es positiva si hay células letales K (killer) presentes, lo cual se manifiesta por la liberación del radioisótopo de las células objetivo destruidas.

Los requisitos genéticos en la producción de las células letales contra los objetivos propuestos son variados. En el humano se demostró que la incompatibilidad para las células objetivo, cifrada por las regiones HLA-A o HLA-B, debe estar presente en la etapa de sensibilización (MLC) y en la etapa efectora (CML), además la incompatibilidad de la región HLA-D debe existir durante la primera etapa, si no la producción de efectores contra las regiones HLA-A o HLA-B no se lleva a cabo. En la segunda etapa los efectores pueden destruir las células objetivo incompatibles correspondientes,

sea HLA-A o HLA-B, en ausencia de la incompatibilidad HLA-D original (10).

En el ratón se demostró en forma similar que la incompatibilidad de la región I es esencial en la producción de efectores, aún cuando los objetivos eran productos cifrados por las regiones H-2K y H-2D. En el ratón la incompatibilidad específica de la región I en la generación de efectores es la región estimuladora de células efectoras (ECS), situadas entre las regiones I-A y S, separada de los genes estimuladores fuertes de MLR de la subregión I-A (11).

Sin embargo esto no es absoluto, en algunos experimentos se ha demostrado que la incompatibilidad de la región I es suficiente (sin K ni D). En condiciones apropiadas, se puede lograr la destrucción celular con ciertas incompatibilidades externas a H-2.

#### EL COMPLEJO H-2

La sobrevivencia de los aloinjertos incompatibles H-2 puede ser prolongada inyectando a los receptores dosis pequeñas de antisuero contra la totalidad del complejo H-2. Se ha demostrado que el antisuero con el extremo K es el más eficaz y el efecto del extremo K en las combinaciones estudiadas se debe a anticuerpos antiregión I. Los anticuerpos facilitadores pueden no estar dirigidos contra los antígenos de histocompatibilidad de la región I, sino, contra las incompatibilidades de potenciación del aloinjerto (AP) que pueden actuar como determinantes estimulantes de las células efectoras. Pueden prepararse sueros facilitadores contra ciertas incompatibilidades fuertes de las regiones K y D. Por ejemplo, anti-H-2D.13 y anti-H-2K.19 facilitan y es posible que estos antisueros estén dirigidos contra los determinantes AP es el mecanismo por el que las transfusiones anteriores al trasplante mejoran el pro

nóstico de los injertos de riñón de cadáver en el humano.

#### GENES Ir Y FUERZA ANTIGENICA

La acción de los genes Ir es otro factor importante que determina la fuerza de las interacciones aloinmunitarias. Se demostró que estos genes influyen específicamente en la respuesta inmunitaria del receptor a los antígenos H-2. También en la rata, se ha demostrado que al cambiar el fondo genético común no-MHS (H-I) de los genes se mejora la sobrevivencia de aloinjertos de riñón en casos particulares de incompatibilidad H-I (12).

P L A N T E A M I E N T O  
D E L P R O B L E M A

Desde hace varios años se han venido haciendo estudios para prolongar la sobrevivida de los aloinjertos (tejido u órgano injertado entre dos individuos genéticamente diferentes pero de la misma especie), estos estudios se han basado en aplicaciones de hemotransfusiones pre y post-operativas obteniéndose como resultado variaciones en el tiempo de sobrevivida del aloinjerto. Algunos estudios no observaron cambio alguno en la sobrevivida (13, 14, 15), pero la gran mayoría llegaron a resultados positivos donde se observó un efecto benefico para la prolongación de la sobrevivida de los aloinjertos (16, 17).

Con base en estos estudios han surgido diversas hipótesis para explicar el efecto de prolongación de la sobrevivida del aloinjerto, estas hipótesis suponen que las hemotransfusiones además de promover la formación de anticuerpos citotóxicos pueden producir otros anticuerpos o complejos de antígeno-anticuerpo que protegen al injerto.

Para ser mas específico este estudio han trabajado con paquetes de linfocitos y con células de bazo obteniéndose resultados poco satisfactorios (18), con plasma el resultado fue mas significativo (19).

El efecto de prolongación de sobrevivida del aloinjerto observado con transfusiones de suero lo explican con la suposición de que en el suero, se encuentran factores bloqueadores (factores como los descritos por Hellstrom en un sistema de cultivo mixto de linfocitos), que se transfieren del donador al receptor y que de alguna manera bloquean la respuesta inmune de rechazo del injerto, aumentando su sobrevivida (20, 21).

Motivados por los estudios anteriores nos planteamos el problema de determinar la especificidad de respuesta inmune de aloinjertos de piel en un modelo de ratas con transfusiones de suero observando el efecto de rechazo o de prolongación en la supervivencia de estos, así como también determinar la cinética de respuesta que presenten los aloinjertos al hacer transfusiones de volúmenes variables de suero.



## O B J E T I V O S

- a) Determinar la especificidad y cinética de respuesta en la sobrevida de los aloinjertos, utilizando un modelo de ratas transfundidas con suero.
- b) Determinar si es o no necesario, que la rata donadora de suero sea la misma que done el injerto.
- c) Realizar transfusiones de suero con volúmenes diferentes para obtener un volumen con el cual la sobrevida del aloinjerto sea mayor.

## H I P O T E S I S

Se propone que el efecto de las transfusiones de suero sobre la sobrevida del aloinjerto no es específico. Se sugiere, que con una cantidad óptima de suero permanecerá constante dicho efecto.

M A T E R I A L

Gradilla  
Bulbos  
Matraz aforado  
Cajas de Pe ri estériles  
Termómetro  
Tubos de ensaye 13 X 100  
Jeringas de plástico estériles 1ml  
Jeringas de plástico estériles 5ml  
Cámara de anestesia  
Tabla de disección  
Guantes  
Espátula  
Marcadores  
Micropipetas de 0.025ml  
Placas de microtitulación  
Gasa  
Jaulas para ratas  
Algodón  
Palillos

R E A C T I V O S

Cloruro de Benzalconio  
Eter etílico  
Solución Salina Amortiguadora (SSA)  
Solución amortiguadora de fosfatos (SAF)

E Q U I P O

	MARCA	MODELO
Refrigerador	Philips	4107-C
Balanza Analítica	Mettler	Mettler H80
Estufa	Riossa	EO
Centrífuga	Solbat	J-12
Autoclave	Presto	5-121
Equipo de disección	Stainless	

M A T E R I A L B I O L O G I C O

35 ratas híbridas CIIZV (Long Evans x Wistar) macho  
35 ratas prog nitoras Wistar macho

## M E T O D O S

### OBTENCION DE SUERO:

- 1.- Se anestesia la rata donadora en un frasco que contenga éter etílico.
- 2.- Se extrae por punción cardiaca entre 1.5 y 2ml de sangre la cual se coloca en tubos de vidrio y se deja coagular.
- 3.- Se separa el coágulo y se centrifuga durante 15 minutos a 4000 rpm.
- 4.- Se separa el suero con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de ensaye.

Nota: Todo el material que se utilice para esta obtención debe estar estéril.

### PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD

Se realizarán pruebas de compatibilidad cruzada, mayor directa e indirecta, entre ratas donadoras y receptoras de la siguiente manera:

#### PRUEBA MAYOR DIRECTA:

- 1.- Tanto la rata donadora como la receptora son sangradas con la ayuda de una pipeta Pasteur del seno retroorbital del ojo, extrayendo aproximadamente 1ml de sangre.
- 2.- La sangre de la rata donadora se lava dos veces con solución salina amortiguadora (SSA) y se ajusta el paquete obtenido a una suspensión al 5% en solución amortiguada de fosfatos (SAP).
- 3.- La sangre de las ratas receptoras se deja coagular y se obtiene el suero.
- 4.- Realizar combinaciones entre los sueros de las recepto

ras y las suspensiones celulares de las donadoras, usando volúmenes de 0.025ml.

5.- Las mezclas son incubadas a 37°C por 30 minutos, y posteriormente a 4°C durante toda la noche.

6.- Buscar la ausencia de aglutinación y escoger las parejas donador-receptor compatibles.

#### PRUEBA MAYOR INDIRECTA:

1.- Proceder de igual manera que con la prueba mayor directa hasta el paso número 4.

2.- A la mezcla de suero-eritrocitos adicionar 0.025ml de suero de conejo antigamagl bulina de rata.

3.- Proceder de igual manera que con la prueba directa.

#### REALIZACION DE INJERTOS (22).

1.- Se anestesia la rata donadora en un frasco que contenga éter etílico.

2.- Se lava cuidadosamente la cola con cloruro de benzalco nio al 30%.

3.- Se presiona ligeramente la cola cortando la piel en forma de rebenada, el corte de piel debe ser de alrededor de 1cm., se cortan 4 injertos.

4.- Se recolectan los injertos en una caja de Petri que contenga 10ml de SSA.

5.- Se anestesia la rata receptora al igual que la donadora al igual que la donadora y se lava la cola de igual manera que antes se describió.

6.- Se presiona ligeramente la cola y se corta alrededor de 1cm de piel. El corte no debe ser profundo o que la cola sangre ya que esto dificultará la colocación del injerto.

7.- Se reemplaza este último con el injerto de piel obtenido de la rata donadora, dando un giro de  $180^{\circ}$  de acuerdo a su posición original, para que queden los pelos en sentido contrario.

8.- Se presiona el injerto con una gasa con el fin de eliminar el aire y evitar el sangrado.

9.- Los injertos son protegidos con tubos de vidrio de aproximadamente 4 a 5cm de largo, bastante anchos para que se deslicen en las colas de las ratas.

10.- Separar los tubos de 24 a 36 horas después de realizado el injerto.

#### METODOS PARA LA OBTENCION DE LA ESPECIFICIDAD

Se utilizarán 20 ratas donadoras híbridas CIIZV (Long Evans x Wistar) macho y 20 ratas receptoras Wistar macho. Tanto las ratas donadoras como las receptoras se dividen en dos grupos, tomándose uno de ellos para el testigo y el otro para el problema.

Se efectúan pruebas cruzadas para obtener parejas donador-receptor compatibles. El grupo testigo se trabaja al mismo tiempo que el grupo problema, pero este no recibe transfusión de suero sino únicamente el injerto. Al grupo problema se le efectúa una transfusión de suero de 0.3ml 3 días antes de rea

lizar el injerto, posteriormente se realizarán transfusiones de 0.3ml semanales durante 1 mes a partir del día en que se realizaron las primeras transfusiones. La rata que dona el in jerto no es la misma que dona el suero.

Se determina la sobrevida de los aloinjertos durante 60 días, se considera como rechazado cuando el injerto se ha desprendido totalmente.

#### METODO PARA LA DETERMINACION DE LA CINETICA DE RESPUESTA

Se utilizarán 15 ratas donadoras híbridas CIIZV (Long Evans x Wistar) macho como donadoras y 15 ratas Wistar como receptoras.

Tanto las ratas donadoras como las receptoras se subdividen en grupos de 3. por lo tanto, obtendremos 5 subgrupos. Se efectúan pruebas cruzadas para obtener parejas donador-receptor compatibles. A cada subgrupo de las receptoras se les transfundirá un volumen diferente de suero, éstos volúmenes serán 0.4, 0.8, 1.2, y 1.6ml. Estas transfusiones se llevarán a cabo 3 días previos al injerto, y posteriormente se les vol verán a realizar transfusiones semanales, con el volumen correspondiente a la primera transfusión de suero.

Durante 1 mes se realizan las transfusiones a partir del día en que se efectúa la primera transfusión, las ratas que

donan el suero no son la mismas que donan el injerto.

Se determinó la sobrevivencia de los aloinjertos durante 130 días, se considera como rechazado el aloinjerto cuando este se ha desprendido totalmente.



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

Las diferentes lecturas de la sobrevida de los aloinjertos se tomaron en base al número de ratas que presentaban el injerto en función del tiempo dado en días. Los datos fueron trabajados en por cien debido al número tan pequeño de la población; este es en sí uno de los principales problemas para el estudio de trasplante de injertos tanto en modelo de animales como en humanos.

### ESPECIFICIDAD DE RESPUESTA

Se utilizaron ratas Wistar como receptoras de suero y de aloinjerto de piel y como donadoras a la cepa  $F_1$  (Wistar x Long Evans).

Se observa un efecto benéfico en la sobrevida de los aloinjertos en las ratas transfundidas con suero, en cambio el lote de ratas no transfundidas (testigo) el rechazo es de 36 días.

También se observa una inespecificidad de respuesta a la sobrevida de los diferentes aloinjertos para los donadores de una misma cepa.

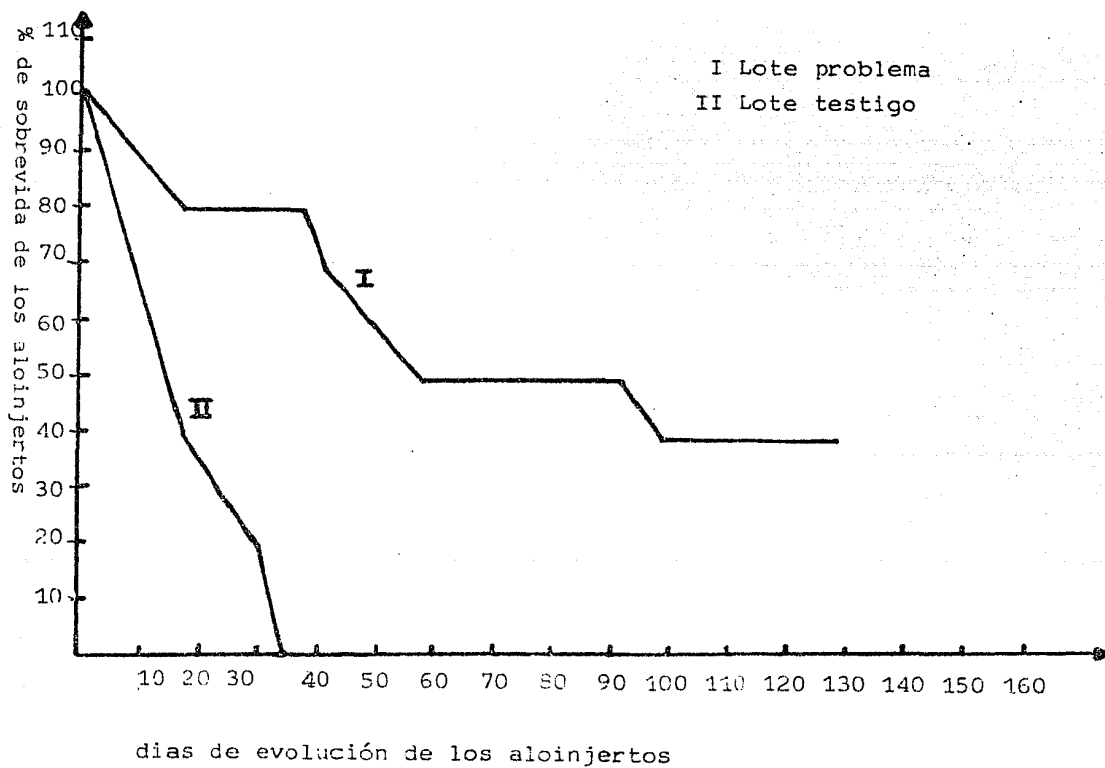
#### CINETICA DE RESPUESTA

Se realizaron injertos de piel a ratas transfundidas con 0.4ml, 0.8ml, 1.2ml, y 1.6ml de suero, usando un lote para cada volúmen.

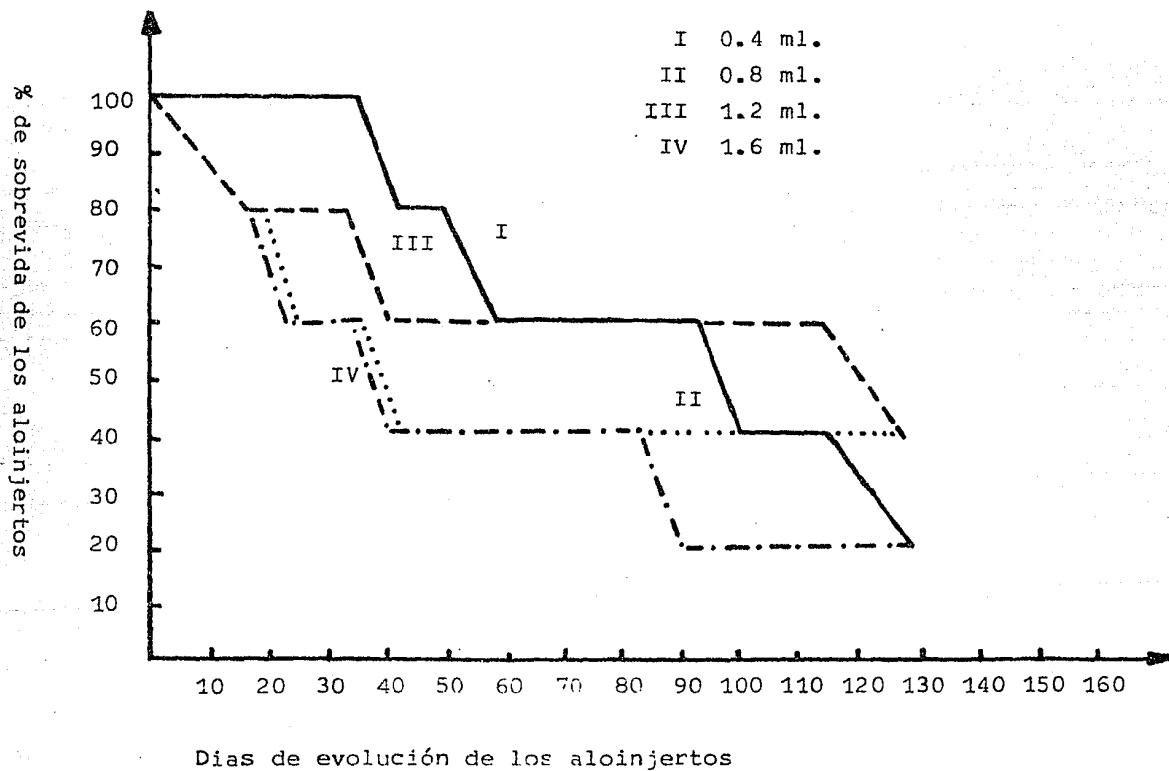
Se observó que el volúmen de 0.4ml tuvo una influencia positiva en la sobrevida de los aloinjertos mayor que los volúmenes de 0.8ml, 1.2ml, y 1.6ml.

La observación de la sobrevida de los aloinjertos se suspendió a los 130 días, los cuales consideramos suficientes para resultados significativos y reproducibles para las determinaciones realizadas.

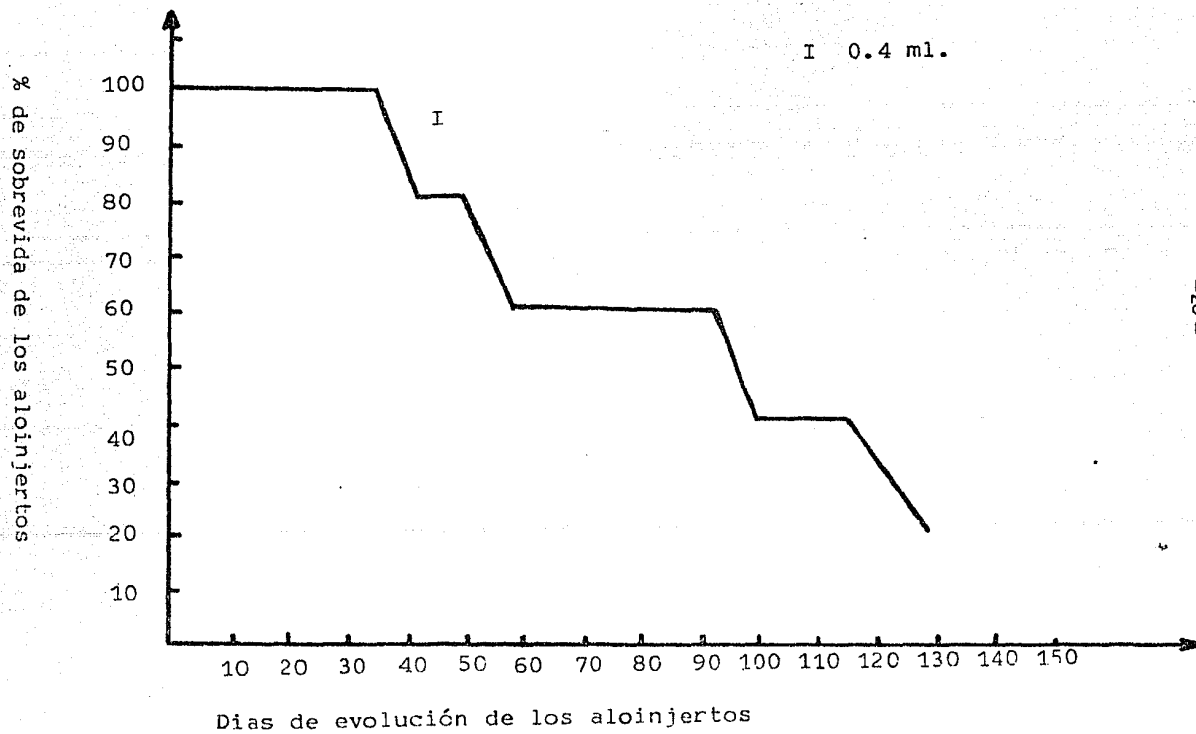
Gráfica No. 1 ESPECIFICIDAD DE RESPUESTA EN LA SOBREVIVENCIA DE LOS ALOINJERTOS



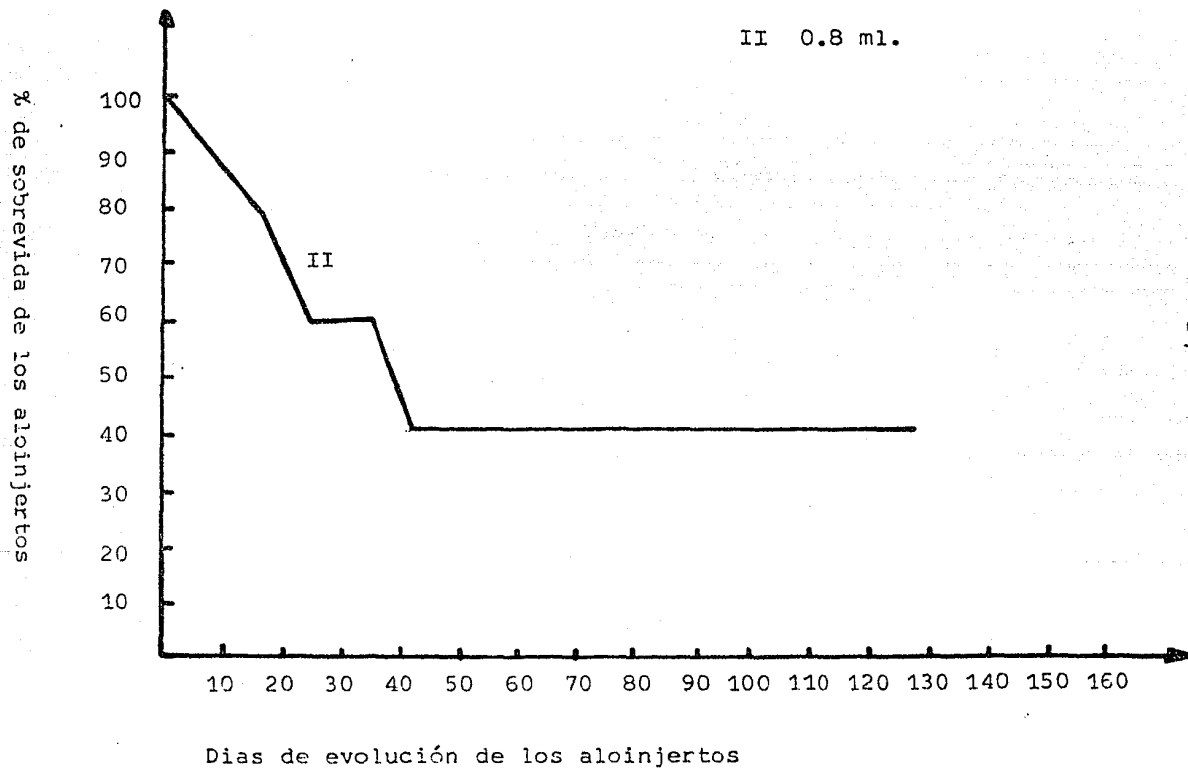
Gráfica No. 2 CINETICA DE RESPUESTA EN LA SOBREVIDA  
DE LOS ALOINJERTOS



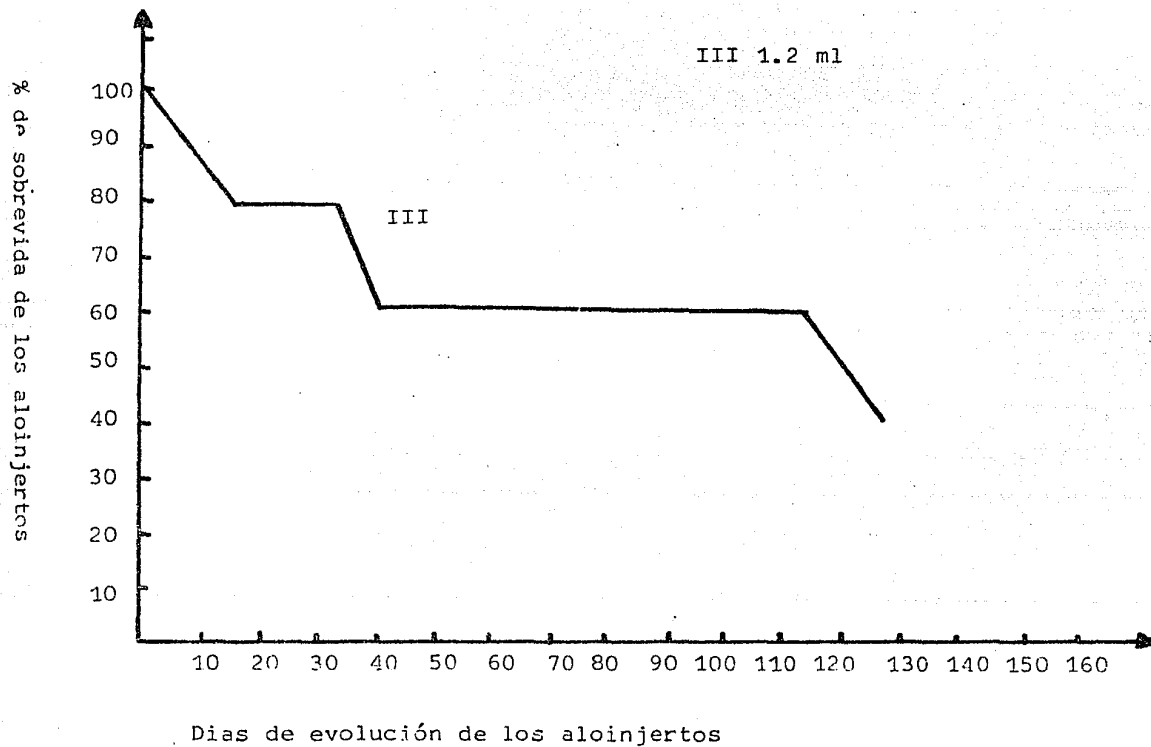
Gráfica No. 3 CINETICA DE RESPUESTA EN LASOBREVIDA  
DE LOS ALOINJERTOS



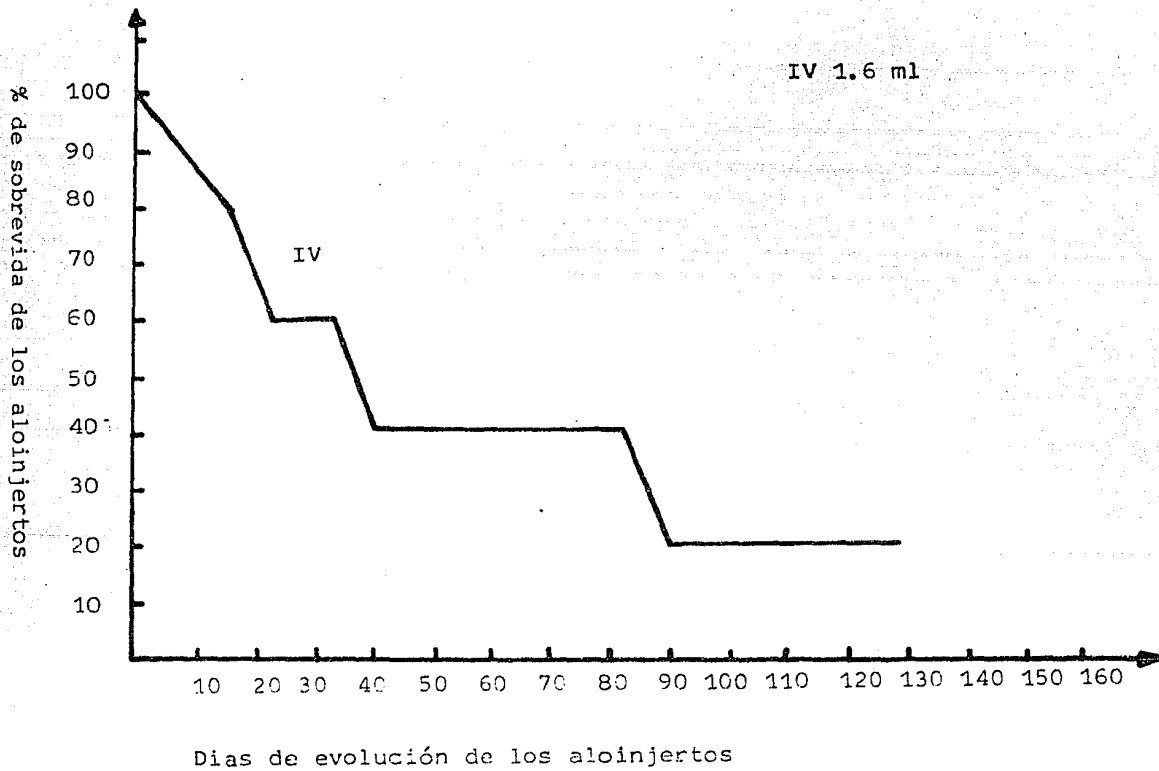
Gráfica No. 4 CINETICA DE RESPUESTA EN LA SOBREVIDA DE LOS ALOINJERTOS



Gráfica No. 5 CINÉTICA DE RESPUESTA EN LA SOBREVIDA DE LOS ALOINJERTOS



Gráfica No. 6 CINÉTICA DE RESPUESTA EN LA SOBREVIDA DE LOS ALOINJERTOS





## DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

### 1.- DETERMINACION DE ESPECIFICIDAD DE RESPUESTA

En la gráfica No.1 se observa claramente que la sobrevida de los aloinjertos de piel en ratas transfundidas tiene desde los primeros 10 días un aumento significativo, en comparación con el lote testigo (sin transfusión).

Al día 35 se observa un completo rechazo de los aloinjertos en el lote testigo, en cambio el lote con transfusiones permanece constante con una sobrevida del 80%.

Posteriormente se observa un ligero descenso en la sobrevida que permanece constante hasta el día 93 con un 50% de sobrevida.

La observación se suspendió en el día 130 hasta el cual la sobrevida del aloinjerto fué constante con un 40%.

Con la obtención de éstos resultados se puede inferir que el efecto de las transfusiones de suero no es específico para la sobrevida de los aloinjertos.

### 2.- DETERMINACION DE CINETICA DE RESPUESTA

En la gráfica NO.2 se observa una diferencia significativa en la sobrevida de los aloinjertos con la aplicación de los diferentes volúmenes de suero. En el día 15 después de realizado el injerto hay un descenso en la sobrevida a un 80% con las dosis de 0.8ml, 1.2ml, y 1.6ml, mientras que con 0.4ml permanece constante en un 100%.

Al día 24 las dosis de 0.8ml y 1.6ml sufren un descenso al 60% de sobrevida mientras que 0.4ml y 1.2ml permanecen constantes.

Para el día 34 se observa un descenso en las cuatro aplica

ciones de un 20% respectivamente, posteriormente permanecen constantes las sobrevidas de los aloinjertos de la manera siguiente: para 0.4ml con un 60% hasta el día 92, para 0.8ml hay un 40% de sobrevida que permanece constante hasta el día 130 (día límite de observación), para la dosis de 1.2ml se presenta una sobrevida de 60% hasta el día 114, y para la dosis de 1.6ml se presenta un 40% pero solo hasta el día 83.

Posteriormente hay un descenso de un 20% en las siguientes aplicaciones de 0.4ml, 1.2ml, y 1.6ml, permaneciendo constantes hasta el día 130 las dos últimas aplicaciones.

La dosis de 0.4ml sufre finalmente un descenso del 20% en el día 114 que permanece constante hasta el día 130.

En las gráficas 3, 4, 5, y 6 donde se muestra detalladamente la evolución de los aloinjertos con cada una de las diferentes aplicaciones, se observan los descensos que sufren estas.

Con estos resultados se puede augurar que existe una determinada potencia en el suero dado probablemente por "factores bloqueadores" de la respuesta inmunológica de rechazo del aloinjerto.

Consideramos importante determinar la cantidad de suero óptima para prolongar la sobrevida de los aloinjertos, ya que existe el riesgo ( en algunos pacientes) de que haya una pequeña incompatibilidad dada por antígenos débiles, lo que no justificaría transfusiones incontroladas.

### CONCLUSIONES

- 1).- Existe un aumento significativo en la sobrevivencia de los aloinjertos al realizar aplicaciones de suero en los pacientes receptores, éste efecto puede ser debido a la presencia de "factores bloqueadores" (de naturaleza desconocida) en el suero administrado, ó a una activación de linfocitos T supresores.
- 2).- Sugerimos que el factor bloqueador de la respuesta de rechazo es debido a un antígeno de histocompatibilidad que se encuentra libre en el suero.
- 3).- Por otro lado, no existe especificidad en la respuesta de rechazo de aloinjertos con aplicaciones de suero seriadas.
- 4).- En la evaluación de cinética de respuesta se concluye que existe un volúmen óptimo para la sobrevivencia de los aloinjertos y aunque este efecto no permanece constante como se esperaba, sí es muy significativo para la prolongación en la sobrevivencia de los aloinjertos.
- 5).- El volúmen óptimo determinado es de 0.4ml. Sin embargo, este volúmen, puede variar dependiendo de la cepa o el modelo en que se trabaje.
- 6).- Consideramos de relevante importancia lo que se ha determinado en este trabajo, por lo que esperamos que se siga investigando al respecto para así mejorar la cien-

cia del trasplante. En investigaciones futuras se puede llegar a descubrir la naturaleza de los "factores bloqueadores", evitando con esto el uso indiscriminado de inmunosupresores como método de elección para obtener un tiempo prolongado (generalmente de 3 a 4 años) de supervivencia del aloinjerto, trayendo como consecuencia un gran avance dentro de la Inmunología Clínica

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

- 1.- Gelgand, M. C.: "Trasplantes de Organos en Inmunología",  
Ed. 3a., Ed. Interamericana, México, 1976, pag. 467.
- 2.- Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Cadwell, J. L., Wells,  
V.: "Inmunología Clínica", 3a. ed., Ed. El Manual Moder-  
no, México, 1982, pags. 186-238.
- 3.- Kevin, R. B., Dai, D. N., Robert, J. C. (1982). Trans-  
plantation Rev. 34:6.
- 4.- Okazaki, H., Maki, T., Wood, M., Monaco, A. P. (1980).  
Transplantation Rev. 30:6.
- 5.- Counce, S., et al. (1956). Ann. Surg. Rev. 144:198.
- 6.- Rychlikova, M., Demant, P., Ivanyi, P. (1970). Folia.  
Biol. (Praha) Rev. 16:218.
- 7.- Klein, J., Shreffler, D. C. (1971). Transplant Rev. 6:3
- 8.- Demant, P. (1970). Folia Biol. (Praha) Rev. 16:273.
- 9.- Festenstein, H., Huber, B., Abbasi, K., Tuffrey, M.,  
Barnes, R. D. (1970). J. Immunogenet Rev. 2:351.
- 10.-Eijsvoogel, V. P., Du Bois, M. J. G., et al. (1972) His  
tocompatibility Testing Rev. 5:502.
- 11.-Festenstein, H., Abbasi, K., Demant, P. (1974). Immuno-  
genet Rev. 1:47.
- 12.-Stimoflig, J. H., Richardson, A. (1972). Genetics Rev.  
52:831.
- 13.-Opelz, G., Terasaki, P. I. (1980). Transplantation Rev.  
29:153.

- 14.-Van Es, A.A., Marquet, R. L., Van Rood, J. J., et al. (1978). *Transplantation Rev.* 26:325.
- 15.-Fasbinder, W., Fru, V. G., Persijn, et al. (1982). *Transplant Proc. Rev.* 45:164.
- 16.-Jeekel, J., Hersche, D., Marquet, R. (1981). *Transplantation Rev.* 32:453.
- 17.-Frisk, B., Berglin, E., Brynger, H. (1981). *Transplantation Rev.* 32:252..
- 18.-Perkins, H. A.: "Transplantation Immunology in Basic and Clinical Immunology", 2a. ed., Ed. El Manual Moderno, México, 1980, pags. 220-224.
- 19.-Allen, A. H., Dyer, P., Geoghegan, T., et al. (1983). *Transplantation Rev.* 35:425.
- 20.-Wegmann, T. G., Hellström, I., Hellström, K. E. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. Rev.* 69:1644.
- 21.-Hellström, I., Hellström, K. E. (1972). *Nature* 240:471.
- 22.-Hudson, L., Hay, F. C.: "Practical Immunology", 4a. ed. Ed. Blackell Scientifics Publications, México, 1976, pag. 84.
- 23.-Flores, M. H., Trujillo, V. A. R.: Efecto de las hemotransfusiones en la sobrevivencia de los aloinjertos en un modelo de ratas. Tesis para obtener el título de Q.F.B. E.N.E.P.-Zaragoza (1984).
- 24.-Festenstein, H., Demant, P.: "Inmunogenética Fundamen-

tal, Biología y Aplicaciones Clínicas de HLA Y H-2",  
2a. ed., Ed. El Manual Moderno, México, 1981, pags. 15  
-20.

25.- Evans, R., Alexander, P. (1970). Nature (Lond) Rev.  
228:620.

26.- Mc Clennan, I. C. M. (1974). Progress in Allergy 11  
Rev. 3:347.