

26
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DE UN FACTOR DE EMBARAZO
TEMPRANO POR PRUEBA DE INHIBICION
DE ROSETAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

MARIA ANGELINA BENAVIDES BADILLO



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.

INDICE GENERAL

	PAG
I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION	
a) Relaciones madre-feto.....	2
b) Antecedentes del factor de embarazo temprano (FET).....	13
c) Importancia Biológica del FET.....	17
d) Células y moléculas involucradas en la formación de rosetas.....	18
e) Sistemas de apareamiento de <u>Mus musculus</u> en el laboratorio.....	20
f) Parámetros reproductivos de <u>Mus musculus</u> en condiciones de laboratorio.....	21
g) Objetivo.....	22
h) Hipótesis.....	22
III.- MATERIAL Y METODOS.....	23
IV.- RESULTADOS.....	34
V.- DISCUSION.....	53
VI.- CONCLUSIONES.....	61
VII.- APENDICE DE REACTIVOS.....	62
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	64

I.- RESUMEN

La existencia de una proteína denominada factor de embarazo temprano (FET) brinda la posibilidad de hacer diagnóstico de gestación a partir de las 24 hrs post-fecundación en el humano, el ratón y en algunos animales domésticos, en los cuales es de interés para estudios de fertilidad y reproducción.

En el presente trabajo se utilizó el modelo experimental del ratón para tratar de detectar a un posible factor de embarazo temprano en suero de hembras gestantes. Se empleó la especie Mus musculus cepa BALB/c.

Mediante la prueba de inhibición de rosetas inducidas se pudo determinar una diferencia estadísticamente no significativa entre el número de rosetas formadas con los linfocitos de bazo de ratones machos incubados tanto con suero normal de ratones machos como de ratones hembras y el número de rosetas formadas con linfocitos incubados con suero anti-timocitos (SAT) ($0.05 < P < 0.1$).

Asimismo, se pudo comprobar una diferencia entre el número de rosetas formadas con los linfocitos incubados con suero de ratones hembras de 24 hrs y 7 días de gestación y el número de rosetas formadas con linfocitos incubados con suero anti-timocitos, siendo estadísticamente significativa ($0.01 < P < 0.025$).

Esta prueba también fue aplicada a muestras de sueros humanos y a gonadotropina coriónica humana (HGC) comercial.

En los sueros de varones se obtuvieron valores de inhibición de rosetas similares a los encontrados por SAT, mientras que en los sueros de mujeres en el 1er. trimestre de embarazo se evidenció una inhibición de rosetas comparable a la encontrada con el suero de ratones hembras gestantes.

Con la HGC comercial sólo se logró observar una tendencia a aumentar la inhibición de rosetas a medida que se aumentaron las concentraciones de esta hormona.

Así, fue posible desarrollar una técnica cualitativa de inhibición de rosetas tanto en un sistema autólogo como en uno heterólogo.

II.- INTRODUCCION.

Dados los propósitos del trabajo de detectar la actividad "inmunomoduladora" del factor de embarazo temprano (FET) en el suero de hembras gestantes, se hace mención de los aspectos que se han considerado más relevantes en relación con la inmunidad en el embarazo.

a) Relaciones madre-feto.

Uno de los enigmas de la inmunología reproductiva es la sobrevivencia del feto en las distintas especies de mamíferos, los cuales presentan fertilización interna y viviparidad (1).

El embarazo implica la coexistencia de dos organismos durante el período de gestación (2) y a pesar de que el feto hereda antígenos de Histocompatibilidad paternos y esto lo constituye como un aloinjerto para la madre, normalmente el proceso de rechazo no ocurre (3,4), logrando sobrevivir el período de gestación intrauterina (5).

Así pues, en todas las especies no consanguíneas la gestación es un hecho que parece transgredir las leyes del trasplante y aunque el proceso del parto es muy semejante al rechazo inmunitario, actualmente no hay pruebas de que el nacimiento sea una consecuencia de la terminación de la tolerancia inmunológica entre feto y madre (6).

Medawar en 1953 enfocó su atención hacia la paradoja inmunológica del embarazo proponiendo posibles teorías para tratar de explicar la sobrevivencia del feto: a) no existe un reconocimiento materno hacia el feto, b) la carencia de inmunogenecidad de la placenta y del feto, c) un mecanismo de aumento en la respuesta inmune humoral y d) la presencia de una inmunosupresión materna. Ha sido descartada la posibilidad de considerar al útero

como un sitio privilegiado inmunológicamente (7).

Al principio del embarazo el embrión se implanta en la pared del útero en una zona llamada decidua, progresivamente los tejidos embrionarios pertenecientes a la futura placenta invaden a la decidua materna y se diferencian en citotrofoblasto la capa interna y sincitiotrofoblasto la capa externa, esta última desarrolla vellosidades que atacan a la mucosa uterina y también aumentan considerablemente la superficie de contacto entre el feto y la sangre materna; hacia la quinta semana de gestación la placenta en formación es invadida por vasos sanguíneos procedentes del cordón umbilical del feto (8,9) hacia las dieciocho semanas ha alcanzado su forma madura, aunque su expansión circunferencial continúa hasta término (7).

El tejido trofoblástico sirve como barrera anatómica entre los tejidos maternos y fetales, constituyendo una defensa contra la aloinmunidad antifetal materna; y a pesar de que el feto y la madre están burdamente separados, durante la gestación pueden pasar células al igual que sustancias solubles a través de la placenta en ambas direcciones, lo cual establece condiciones adecuadas para que los antígenos fetales sensibilicen a la madre (6).

Sin embargo, las placentas de ratón y de humano tienen considerable capacidad selectiva para absorber anticuerpos antifeto, permitiendo a la vez el paso de anticuerpos (IgG) con otras especificidades diferentes de éste (1, 10).

También Bardawill & Toy han mostrado que una capa fibrinoide rodea completamente al sincitiotrofoblasto, mientras que Broadbury y cols. han demostrado que esta capa consiste de sialoproteínas altamente sulfatadas, las

cuales podrían repeler electrostáticamente a los linfocitos maternos cargados negativamente (7, 11).

Así, el feto es protegido por una barrera parcial y selectiva; el acceso de antígenos fetales hacia la madre es alto pero no totalmente prevenido, mientras que la transferencia de anticuerpos anti-feto es bloqueada selectivamente y cualquier célula materna que entra a la circulación fetal puede ser incapacitada (1), por lo que el concepto de la placenta como barrera mecánica no parece sostenible (8).

Se ha suscitado debate en torno a la placenta, ya que se le considera una barrera carente de antigenicidad, una verdadera muralla inmunológica en la interfase feto-madre; para su efecto, la placenta de origen embrionario no debería poseer antígenos de histocompatibilidad característicos del feto y susceptibles de ser reconocidos como extraños por el organismo materno (8).

En el ratón, las células gigantes del trofoblasto expresan antígenos no CMH, mientras que algunos investigadores infieren la presencia de antígenos CMH en el espongiotrofoblasto y otros encuentran su expresión sobre el trofoblasto que recubre los sinusoides laberínticos; en la placenta humana los antígenos CMH (HLA-A, B, C) están ausentes del trofoblasto vellosos y del corión extraplacental aunque posiblemente están expresados débilmente sobre el trofoblasto no vellosos, el antígeno Ia también está ausente, aunque unas pocas células Ia+ se encuentran dentro del estroma de la placenta tardía (1).

El grupo inglés de Peter Johnson en Liverpool admite la presencia de antígenos no CMH en las partes externas de la placenta humana y los antígenos ligados al sexo (HY) característicos de los tejidos masculinos, capaces de

producir rechazo de injerto están presentes igualmente a este nivel, por lo que la teoría de una barrera neutra formada por la placenta es difícil de sostener en la presencia de los antígenos menores de histocompatibilidad y de sexo (8).

La expresión de los antígenos de trasplante sobre los trofoblastos al parecer depende de las diversas etapas de gestación, mediante estudios serológicos y de trasplante se ha demostrado que los antígenos H2 están expresados débilmente en el trofoblasto murino en etapa temprana mientras que se han encontrado cantidades considerables en las últimas etapas de gestación (6).

Hacia la preimplantación los embriones de ratón llevan antígenos de varios tipos incluyendo autoantígenos ováricos residuales y otros antígenos restringidos a los embriones tempranos (T-t) y a células de ciertas líneas tumorales, siendo uno de ellos el antígeno teratocarcinoma que aparece en el estadio de segmentación, mórula y blastocisto y está ausente en los estadios tardíos (1).

Los antígenos menores de histocompatibilidad han sido demostrados sobre la superficie del trofoblasto en cigotos de 4-8 células, la mórula y el blastocisto temprano murinos por marcado de inmunoperoxidasa, por lo que la teoría de la no inmunogeneidad del feto tampoco es apoyada (5).

Durante un tiempo el útero fue considerado como un sitio inmunológicamente privilegiado, pero las evidencias actuales indican que los extremos aferentes y eferentes de la respuesta inmunitaria operan en el área de este órgano reproductor.

La implantación de aloinjertos de tejido normal no invasivo en el útero de una mujer no embarazada da por resultado un rechazo rápido semejante al de los injertos cutáneos extraños; y la introducción en el útero de células epidérmicas, leucocitos o espermatozoides alogénicos inmuniza a la receptora dando como consecuencia la hipertrofia de los ganglios linfáticos de drenaje parasórtico, así como un estado de aloinmunidad. Esta sensibilización intrauterina puede conducir a una respuesta secundaria cuando hay un desafío local con material tisular de la misma especificidad antigénica (6).

Al respecto, Beer & Billingham han demostrado que la presencia de la decidua en el útero permite la implantación y prolonga la sobrevivencia de los injertos (8).

Además, la aloinmunización local en el ambiente uterino tiene un efecto muy serio sobre la capacidad reproductora posterior; en los humanos el peso de la placenta y el neonato aumentan con la paridad y estas observaciones son congruentes con un proceso de sensibilización materna (12).

Por último, son considerados los mecanismos de inmunosupresión materna específica y no específica, los que tienen más aceptación.

Kaliss & Dagg sugieren que un "aumento" en la respuesta humoral puede ser operativo durante el embarazo y esta hipótesis es apoyada por las investigaciones de Hellstrom y cols. quienes mostraron que el suero de ratones hembras BALB/C embarazadas por machos C3H era capaz de interaccionar in vitro con células embrionarias C3H previniendo su destrucción por linfocitos BALB/C presensibilizados (5).

Estos "anticuerpos bloqueadores" son característicamente IgG no fijadores de complemento y pueden funcionar a nivel periférico uniéndose a los antígenos fetales blanco sobre las superficies celulares y ocultándolos de la atención de los linfocitos maternos efectores o aloanticuerpos, o alternativamente muy pocas cantidades de tales anticuerpos en asociación con antígeno soluble forman complejos y se unen a receptores sobre los linfocitos potencialmente reactivos evitando el inmunoreconocimiento y respuesta, y facilitan la eliminación de estas células mediante fagocitosis; los anticuerpos capaces de aumentar específicamente el crecimiento de tumores de cepas paternas en cepas maternas hospederas pueden ser eluidos de la placenta de ratón (1).

Rocklin y cols. encontraron que las abortadoras crónicas carecían de esta IgG bloqueante, la cual apareció en el suero durante subsecuentes embarazos exitosos; y ha sido detectada en el suero de 80% de las mujeres primigrávidas entre las 16-24 semanas de embarazo (7).

La disminución de la respuesta inmune de la madre durante el embarazo puede explicar parcialmente la sobrevivencia del feto como injerto (13). Existe la observación clínica de que ciertos desórdenes autoinmunes parecen aumentar durante el embarazo y permiten una mayor susceptibilidad materna hacia ciertos tipos de infecciones y aumentan ciertos neoplasmas malignos (14).

Asimismo, estudios in vitro con linfocitos maternos han mostrado una disminución en su respuesta a aloantígenos y mitógenos (15).

Una de las enfermedades que comunmente es notada durante el embarazo es la artritis reumatoide, que aparece durante el primer trimestre y desaparece a los dos

meses post-parto y es asociada con la presencia de "factores inmunosupresores" detectados en el suero de mujeres embarazadas (16).

También se ha demostrado el efecto inmunorregulador de sustancias propias de embarazo sobre la actividad de las células "Natural Killer" (NK) humanas, en donde el líquido amniótico es más supresivo que el suero de embarazo (17).

Ciertamente existe una ligera inmunodepresión durante el embarazo, pero si el sistema inmunitario materno estuviera tan deprimido como parecen indicar las experiencias realizadas in vitro, una mujer embarazada debería aceptar cualquier tejido extraño o revelarse incapaz de protegerse de una infección vírica (8).

Se ha propuesto que la supresión materna no específica es debida a la influencia de hormonas las cuales tienen un efecto local más que sistémico (8).

La mayoría de sustancias específicas de embarazo con propiedades inmunosupresoras se encuentran en el suero o plasma e interfieren con la función de los linfocitos in vitro o in vivo (1).

Varias de estas sustancias no son hormonales (Gill and Repetti, 1979) y son de dos tipos: α_2 globulinas y β_1 globulinas; las α_2 globulinas son proteínas de peso molecular alto, algunas de ellas alcanzan niveles altos en el suero hacia el tercer trimestre y son conocidas como proteínas de zona de embarazo, proteína del plasma asociada al embarazo A, B y C y macroglobulinas asociada al embarazo. En las mujeres estas proteínas probablemente son producidas por los linfocitos de sangre periférica bajo estimulación estrogénica; mientras que las β_1 globulinas son glicoproteínas que aparecen muy temprano en el embarazo y son indicadores existosos de éste,

después aumentan su concentración y hacia el parto sus niveles disminuyen precipitadamente, aparentemente son sintetizadas por tejidos materno y trofoblasto (1, 18).

La α_2 macroglobulina tiene efectos inhibitorios sobre el MIF* y en respuestas linfoproliferativas hacia mitógenos y antígenos; la β_1 glicoproteína ha sido reportada con capacidad para suprimir respuestas a PHA*(5).

La gonadotropina coriónica humana (HGC) y el lactógeno placentar humano (LPH) son glicoproteínas sintetizadas por el sincitiotrofoblasto; en la mujer embarazada la HGC puede ser detectada tan temprano como a los 24 días (día 1 es el primer día de menstruación) y origina un pico de 100 a 120 IU/ml de suero cerca del día 50, permanece en esta concentración alrededor de 14 días y entonces baja a 5 ó 35 IU/ml de suero y permanece en esta concentración a través del embarazo (19). Estudios realizados con extractos comerciales de HGC de orina de embarazo sugieren un papel inmunosupresor (20, 21), in vivo la inyección de HGC cruda disminuye la hipersensibilidad retardada a PPD en cobayos, pero no interfiere con el rechazo de injertos intrauterinos de piel en ratas. La secreción de LPH se eleva progresivamente a través del embarazo y no hay evidencias de que posea un efecto inmunosupresor (5).

La alfa feto proteína (AFP) es un componente normal del líquido amniótico y suero fetal en varias especies, en humanos el nivel declina de 3 mg/ml en el cuarto mes de gestación a menos de 80 ug/ml a las seis semanas post-parto por lo que, es una proteína del suero dominante en la vida fetal temprana. Murgita & Tomasi mostraron un efecto marcado de la AFP de ratón para inhibir respuestas blastogénicas de células B a lipopolisacáricos y las respuestas de las células T

* Factor inhibidor de la Migración de Macrófagos.

**Fitoheماغلوتينina.

a PHA y ConA también fueron disminuidas, se sugiere que puede jugar un papel importante para la implantación y el crecimiento embrionario (7).

En el plasma los niveles de transcortina y cortisol se incrementan progresivamente durante el segundo y tercer trimestre de embarazo (22), las células y tejidos maternos son expuestos diariamente a una concentración promedio de cortisol del doble de la normal; provoca retardo al rechazo de injertos en animales (5); los corticosteroides son usados clínicamente en humanos con trasplantes renales y tienen efectos citolíticos sobre las células linfoides de ratón, conejo y rata pero no en cobayos y primates, in vivo son requeridas dosis extremadamente altas para borrar la memoria inmunológica hacia los aloantígenos de tejido (1).

La placenta sintetiza estrógenos a partir de precursores maternos y fetales incrementando su concentración a medida que el embarazo avanza (22), los niveles del estrógeno más activo, estradiol son de ~20 ug/ml hacia término y la concentración intervellosa es de ~50 ug/ml; recientemente ha sido demostrado que el estradiol prolonga injertos de piel en el ratón e inhibe el rechazo de córnea en conejos presensibilizados, también se especula que el estrógeno disminuye el desarrollo o proliferación de células tímicas y el estradiol involuciona al timo en animales experimentales adultos (6).

La progesterona es sintetizada y secretada por las células del trofoblasto hacia la sangre materna, siendo su concentración de 886 ug/ml en la sangre intervellosa y de 160 ug/ml en sangre periférica en el embarazo tardío; la progesterona a alta concentración local tiene dramáticas propiedades anti-inflamatorias y puede prolongar la sobrevivencia de aloinjertos de piel (1, 6).

De las sustancias asociadas al embarazo expuestas anteriormente solamente la gonadotropina coriónica humana y la β_1 glicoproteína han sido utilizadas para detectar embarazo temprano debido a que su presencia es precoz, mientras que las demás aparecen en fases avanzadas de la gestación. También cabe mencionar que tanto el estrógeno como la progesterona no son producidas únicamente durante el embarazo.

El lactógeno placentar es detectado en tejido placentario de oveja hacia los 16 días de gestación, en el "conceptus" bovino entre los 17 y 25 días de gestación.

La progesterona no es específica de embarazo y sus niveles son medidos en sangre o leche hacia el tiempo en el cual se esperaría una disminución en animales no gestantes. Diagnostica embarazo en ovejas, vacas y cerdos con un 87-88% de seguridad.

La gonadotropina coriónica humana puede ser detectada alrededor de las 6 semanas después del último período menstrual, mediante métodos de aglutinación, ensayo para radioreceptores y radioinmunoensayos con antiseros contra la subunidad β beta.

Los primates no humanos también producen gonadotropina coriónica y puede ser detectada en el suero y orina; las moléculas de GC de diferentes primates tienen estructura química similar y dan reacción cruzada con la HGC así, un ensayo de inhibición de hemaglutinación para la HGC diagnostica embarazo en chimpancé, gorila y orangután.

En las yeguas el embarazo puede ser detectado midiendo la gonadotropina coriónica de caballo o gonadotropina de suero de yegua, entre los 40 y 130 días de gestación y no provee una prueba para embarazo muy temprano.

La β_1 glicoproteína ha sido detectada en el suero tan temprano como a los 7 días después de la ovulación y su concentración en el suero es más baja en mujeres con abortos espontáneos.

Una prueba potencial para la detección de embarazo temprano en humanos y otras especies de mamíferos es la medición del factor de embarazo temprano (FET), el cual ha sido detectado dentro de las 24 hrs post-fecundación en el ratón, en el humano y en la oveja (1).

El FET ha sido descrito como una función inmunosupresora, la cual persiste durante los dos primeros trimestres de gestación en la mayoría de las especies estudiadas.

b) Antecedentes del Factor de Embarazo Temprano (FET).

Se ha sugerido que el éxito del feto como aloinjerto puede depender en parte de una depresión del sistema inmune materno y esto es apoyado por la demostración de una supresión en la actividad de los linfocitos maternos durante el embarazo (23), éstos muestran una alteración en su actividad después de la incubación con suero de mujer embarazada, indicando que esta respuesta puede ser causada por un factor del suero (24).

El descubrimiento del factor de embarazo temprano fue llevado a cabo por Morton y cols. en 1974, quienes detectaron la presencia de una proteína a las 24 hrs post-fecundación en el suero de ratón hembra (25) y actualmente su detección ha sido lograda también en el suero de humano (24, 26, 27) y de oveja (28).

El FET ha sido diferenciado de otras sustancias las cuales aparecen en fases tardías del embarazo y que pueden estar involucradas en la supresión de la respuesta materna (24).

En el ratón, la naturaleza del FET aún no es clara, aunque puede ser inactivado a 72°C y no es dializable, lo cual sugiere que es un polipéptido grande o una proteína (28).

El FET humano es estable a -20°C al menos durante 19 semanas, y a no más de 72°C y su estabilidad no es afectada por pH bajo y no es específico de especie (29).

Se han realizado una serie de estudios acerca del FET para entender sus propiedades y algunas de sus características han sido reportadas.

El fraccionamiento del FET de ratón a través de Ultrogel AcA34 muestra dos picos de actividad, uno de 180 000 y otro de 40 000 daltones cuyas concentraciones varían con el tiempo de gestación. El factor de peso molecular alto aparece en el suero después de que la fecundación ha ocurrido y va disminuyendo a medida que avanza el embarazo y se sugiere que es responsable para la actividad en el estado temprano de gestación, mientras que el factor de peso molecular bajo aparece con la formación del trofoblasto y su presencia es relacionada con la actividad en estadios tardíos de gestación (23).

La caracterización preliminar de la actividad del FET de suero de oveja mediante precipitación diferencial por sulfato de amonio al 40% da dos componentes los cuales han sido designados FET-A presente en el sobrenadante y FET-B presente en el precipitado; probados por separado no muestran actividad en el título de inhibición de rosetas, pero la actividad es observada cuando actúan juntos (30).

La presencia del FET en sueros dentro de las 24 hrs post-fecundación indica que su producción no depende de la presencia de tejidos de placenta o de feto.

Las investigaciones realizadas para determinar el sitio de producción del FET en ratón fueron hechas por Morton y cols. mediante la incubación in vitro de ovarios y oviductos de ratón hembra con 24 hrs de apareamiento y han mostrado que el FET está formado por 2 componentes separados los que son muy similares a los obtenidos por sulfato de amonio al 40%. El componente A es producido por el oviducto durante el estro y embarazo; y el componente B es producido por los ovarios durante el embarazo. También se logró establecer que su producción no es iniciada por el acto de apareamiento o por la presencia de esperma o semen en el tracto reproductor, sino que las condiciones necesarias para su producción es que se dé la ovulación y que el óvulo haya sido fecundado (31).

Cavanagh ha realizado la purificación del FET obtenido del cultivo in vitro de ovarios y oviductos de ratones hembras, mediante inmunoadsorción, electroenfoque y gel filtración. El FET al ser tratado con un buffer no desnaturante eluye como un solo pico de proteína y conserva toda la actividad de la muestra, posteriormente al ser tratado con un agente disgregante (CHAPS) se obtiene una forma más pequeña de 21 000 daltones con actividad y al ser fraccionado con un agente desnaturador (SDS) da 3 péptidos que carecen de actividad. Así, el FET parece estar constituido por 3 subunidades que han sido relacionadas por su actividad al FET-A y FET-B (32).

En contraste los péptidos activos en el título de inhibición de rosetas, caracterizados bioquímicamente por Wilson y cols. tienen pesos moleculares de 67 y 21 Kd y presentan en su estructura anillos disulfuro internos y son totalmente resistentes al rompimiento proteolítico sin previa reducción y han mostrado que la actividad del

FET de oveja de 1-2 meses de gestación no es afectada por la precipitación con sulfato de amonio (33).

Los procedimientos para la caracterización, producción y purificación del FET han provisto solamente un poco de material en el cual han sido realizados análisis limitados y a medida que se usan metodologías más adecuadas en su estudio, es mayor la controversia acerca de su caracterización. Su actividad ha sido valorada con la prueba de inhibición de rosetas.

La prueba de inhibición de rosetas surgió inicialmente como una prueba necesaria para valorar in vitro la actividad inmunosupresora del suero antilinfocitos humanos (SAL). Las investigaciones realizadas por Bach y cols. en 1969 permitieron comprobar la correlación existente entre la capacidad inmunosupresora del SAL humano para prolongar la sobrevivencia de injertos de piel en primates subhumanos (chimpancé y macaco) y el título de inhibición de rosetas (33).

Más tarde, Gordon & Brain (1971) obtuvieron resultados similares al probar in vivo varios SAL por administración regional a monos con injertos de piel, encontrando que el título de inhibición de rosetas podía proveer un buen índice de la actividad inmunosupresora del SAL (34).

La prueba de inhibición de rosetas que había sido utilizada para mostrar que la actividad de los linfocitos es modificada in vivo por terapia después del trasplante, fue usada para detectar una posible inmunosupresión durante el embarazo (25).

Morton y cols. adaptan esta técnica para detectar inmunomodificadores presentes durante el embarazo y en consecuencia describen al FET presente tanto en el suero como en los linfocitos (27).

El fundamento de la prueba asume que los receptores para los eritrocitos de carnero, presentes sobre los linfocitos, son modificados en presencia de SAL y complemento, dando como resultado una inhibición parcial de la formación de rosetas, la cual a su vez depende de la concentración de SAL (27, 29, 35).

El grado de inhibición por SAL es reflejado en el título de inhibición de rosetas (TIR) que es el \log_2 del recíproco de la más alta dilución de SAL dando un 75% o menos de rosetas formadas, en comparación con el testigo (solución de Hank); el TIR obtenido de un suero particular depende de los linfocitos usados, la prueba in vitro da títulos altos cuando son usados linfocitos de animales embarazados ó cuando los linfocitos de animales normales son incubados en suero de embarazo (29).

La prueba ha sido aplicada a sueros de ratón, de humano y de oveja y los resultados indican que puede ser utilizada para detectar fecundación, muerte temprana del embrión y embarazo continuo (24).

Finalmente, Rolfe y cols. (1984) comprueban que la actividad del FET sobre la prueba de inhibición de rosetas no es específica de especie; por lo que, el FET de una especie puede modificar la actividad de los linfocitos en otra. Modifican la prueba de inhibición de rosetas para la detección del FET humano, empleando linfocitos de bazo de ratón y suero de mujer embarazada (35).

c) Importancia biológica del FET.

Al factor de embarazo temprano se le ha implicado un papel inmunosupresor con respecto a la tolerancia materna hacia el feto antigénicamente extraño, especialmente durante la preimplantación.

Es de particular relevancia la producción del FET en el sitio de rechazo, muchos factores inmunosupresores específicos y no específicos han sido descritos durante el embarazo y varios de ellos se han concentrado en la interfase feto-madre, sin embargo, ninguno es producido en cantidades significativas hacia el estado de implantación por lo que el FET posiblemente tendría un papel único en prevenir el rechazo del embrión cigocelular (29).

La disminución del FET antes del parto y aborto espontáneo apoya la sugerencia de que la inmunosupresión reducida y el rechazo inmunológico pueden contribuir al aborto y al parto (25, 29).

Es posible que el FET y la HGC forman las bases de un sistema de dos fases, las cuales pueden jugar un papel importante en la protección del feto, del sistema inmune materno; el FET puede proteger al huevo fecundado hasta que la placenta es establecida y es capaz de producir HCG para mantener deprimido el estado inmunológico de la madre (22).

d) Células y moléculas involucradas en la formación de Rosetas.

Es conocido que los linfocitos T de varias especies de mamíferos presentan la característica de formar agregados espontáneos llamados rosetas con eritrocitos heterólogos o autólogos (36, 37).

Los linfocitos T humanos forman rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero en una reacción fortuita sin ningún fundamento inmunológico (3), no son específicas del antígeno y su formación se inhibe con sueros anti-T (38).

Dichos linfocitos presentan un marcador de superficie que sirve como receptor específico para los eritrocitos de carnero (receptor E) permitiendo la formación de rosetas en ausencia de anticuerpos y complemento (39).

El receptor E es un polipéptido de 45 000 daltones y porta al marcador T11; mientras que el ligando es una glicoproteína de superficie presente en los eritrocitos, de aproximadamente 42 000 daltones a la cual se le ha dado el nombre preliminar de estructura blanco de T11 y que es reconocida tanto en la formación de rosetas xenogénicas como autólogas (36).

Actualmente se ha demostrado que el receptor E reconoce al ligando presente en los eritrocitos de carnero (estructura blanco de TST11) así como al ligando presente en los eritrocitos humanos (antígeno 3 asociado a la función de los linfocitos AFL-3)(40).

La reacción cruzada que da este receptor E entre AFL-3 en humanos y TST11 en el carnero, sugiere que son ligandos homólogos (41).

Asimismo, parece tener al menos 3 distintos epitopes, siendo uno de ellos el sitio de unión de los eritrocitos (42).

Tomando como base al fenómeno de formación de rosetas espontáneas se han desarrollado métodos que permiten el rosetamiento y comprenden desde el uso de anticuerpos monoclonales unidos a eritrocitos bovinos para detectar antígenos sobre las membranas celulares de los linfocitos (43, 44, 45) hasta la sensibilización de los linfocitos con un antígeno dado (eritrocitos de carnero) que permite obtener un receptor que interactúa específicamente con este antígeno dando la imagen de rosetas (38).

El modelo experimental del ratón fue elegido debido a

que Mus musculus presenta determinadas características para satisfacer los requerimientos experimentales (tipo de cepa, edad, peso y sexo) y a la vez el número de variables ambientales (temperatura, alimentación) puede ser controlado; y así como por la reacción cruzada que da el FET humano con los linfocitos de bazo de ratón.

También son conocidos los sistemas de apareamiento en el laboratorio, así como los parámetros reproductivos (Tabla 1).

e) **Sistemas de apareamiento de Mus musculus en el laboratorio.**

Los sistemas de apareamiento han sido definidos con base en el número de consortes que un sexo pueda reunir con fines reproductores. Básicamente son 3 los sistemas empleados:

I) **Monogámico (Pareja).**- Implica exclusividad en el apareamiento de un macho y una sola hembra. Este método se usa comunmente en la producción de líneas endogámicas de ratas y ratones.

Las desventajas de este sistema son que tienen que mantenerse un gran número de machos, se necesita mucho espacio, equipo y trabajo aún para una colonia pequeña.

II) **Poligámico (Harem).**- participan un individuo de un sexo con 2 ó más del sexo contrario. Comprende a la poliginia o harem (donde un macho se aparea con más de una hembra) y a la poliandria (donde una hembra se aparea con más de un macho).

Este sistema tiene ciertas ventajas; si una hembra no está receptiva, entonces el macho podrá aparearse con otra que si lo esté, se utilizan menos machos y se requiere de poco espacio.

III) Colectivo (promiscuo).- Los machos y las hembras no están restringidos a un solo consorte sexual. A diferencia del harem, supera la inapetencia y la impotencia sexual y/o esterilidad de un solo macho, al disponer de dos o más de ellos para el apareamiento.

La principal desventaja de este sistema es que un macho se establece como dominante y realiza la mayor parte de los apareamientos (46).

f) Parámetros reproductivos de Mus musculus en condiciones de laboratorio.

MACHOS

Edad al apareamiento (semanas)	6
Peso al apareamiento (gr)	18-25
Peso promedio del adulto (gr)	25-40

HEMBRAS

Edad al apareamiento (semanas)	6
Peso al apareamiento (gr)	18-25
Peso promedio del adulto (gr)	25-35
Tipo de ciclo estral	Poliestro
Duración del estro (horas)	10-20
Mecanismo de ovulación	Espontáneo
Tiempo de ovulación (horas después de iniciado el estro)	2-3
Epoca reproductora	Todo el año
Sistema de apareamiento	Monogámico, Harem
Tiempo de implantación (día)	5 temprano
Período de gestación (días)	19-21
Duración de pseudopreñez (días)	12
Edad de destete (días)	21
Peso al destete (gr)	10-12
Estro post-parto	+

Datos tomados de: Foster, H.L. et al (1983); Austin, C.R. y Short, R.V. (1982); Tienhoven, Van Ari (1968); Nalbandov A.V. (1969).

g) OBJETIVO.

Desarrollar y estandarizar una técnica adecuada para la formación de rosetas, así como hacer modificaciones a la técnica de inhibición de la formación de rosetas para obtener una prueba más estable en la detección de un posible factor de embarazo temprano.

h) HIPOTESIS.

Si el suero de hembras gestantes contiene sustancias inmunomoduladoras sobre la actividad inmunológica de los linfocitos, entonces al actuar sobre ellos aumentará la capacidad del suero anti-timocitos de ratón (SAT) para inhibir la formación de rosetas.

III.- MATERIAL Y METODOS.

Animales.

80 ratones machos y 55 ratones hembras de dos a cuatro meses de edad de la cepa BALB/c, de 22 a 40 gr de peso, se mantuvieron en el bioterio en jaulas con rejilla metálica y a una temperatura de 20-22°C. Se alimentaron con agua y nutricubos (purina S.A. de C.V.).

Dos conejos machos de la raza Nueva Zelanda dorados, de seis a siete meses de edad, se mantuvieron en el bioterio en jaulas metálicas, a una temperatura de 20-22°C. Se alimentaron con agua y purina (Purina S.A. de C.V.).

Un borrego macho de 6 meses de edad, se mantuvo en el bioterio. Se alimentó con agua, alfalfa y purina (Purina S.A. de C.V.).

1.- Obtención de linfocitos de bazo de ratón.

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c, los cuales fueron anestesiados con éter, sangrados y mediante una incisión en la línea media abdominal se les extrajo el bazo. El órgano extraído asépticamente fue macerado en una malla fina de tela sobre una caja de Petri con Solución de Hank*, durante 5 min, se dejó reposar esta suspensión para permitir la sedimentación de fragmentos de tejido. La suspensión celular fue cosechada con una pipeta Pasteur en un tubo estéril de tapón de rosca y centrifugada a 1 800 rpm durante 10 min. Para eliminar los eritrocitos, el paquete celular fue tratado con cloruro de amonio amortiguado*, resuspendiendo y dejando reposar las células durante 10 min, luego fue lavado dos veces más por centrifugación con Solución de Hank a 1 800 rpm durante 10 min y finalmente fue llevado a un volumen de 1 ml.

Las células contenidas en 1 ml de Solución de Hank fueron contadas y ajustadas a una concentración de 30×10^6 /ml, en la cámara de Neubauer.

2.- Obtención de eritrocitos de carnero.

La sangre fue colectada en Solución de Alsever* (vol 1/1) a períodos de 20 días. Los eritrocitos de carnero en Alsever fueron almacenados por 7 días antes de ser utilizados en los ensayos, asimismo, la sangre no se utilizó más de tres semanas.

La sangre fue conservada a 4°C durante su uso.

* Ver Apéndice de Reactivos.

3.- Obtención de linfocitos de timo de ratón.

Se utilizó un ratón macho de la cepa BALB/c, el cual fue anestesiado con éter para practicarle una timectomía. El timo fue extraído asépticamente y macerado en una malla fina de tela sobre una caja de Petri conteniendo Solución de Hank*. La suspensión celular obtenida fue cosechada en un tubo estéril con tapón de rosca y centrifugada a 1 800 rpm durante 10 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante. Para eliminar los eritrocitos, el paquete celular fue tratado con cloruro de amonio amortiguado*, resuspendiendo y dejando reposar las células durante 10 min, luego fue lavado dos veces más con Solución de Hank y por último resuspendido en un volumen final de 1 ml.

Las células contenidas en 1 ml de Solución de Hank, fueron contadas y ajustadas a una concentración de 1×10^7 céls./ml. Este procedimiento se hizo en una Cámara de Neubauer.

4.- Obtención de un suero anti-timocitos de ratón (SAT).

Los conejos fueron inmunizados con linfocitos de timo de ratones machos, a intervalos semanales, cubriendo un total de cuatro inmunizaciones.

1ª inmunización. 1×10^7 linfocitos/ml de Solución de Hank.

1 ml de adyuvante completo de Freund (vía intramuscular).

2ª, 3ª y 4ª inmunización. 1×10^7 linfocitos/ml de Solución de Hank (vía intravenosa).

El suero anti-timocitos se obtuvo a los 7, 9 y 11 días después de la última inmunización. El suero fue inactiva-

do a 56⁰C durante 30 min, titulado, fraccionado y conservado a -20⁰C

5.- Titulación del suero anti-timocitos (SAT). Método de Citotoxicidad.

Se obtuvieron linfocitos a partir del timo de un ratón macho, procediendo a hacer el conteo y ajuste del número de células a 33×10^6 linfocitos/ml de Solución de Hank. A continuación se preparó un juego de tubos que fueron etiquetados con las diluciones para el SAT; las cuales fueron desde 1:10 hasta 1:2560. Se adicionaron a cada tubo 100 ul de la suspensión de linfocitos + 100 ul de la respectiva dilución de SAT. Las células con el SAT fueron incubadas a 37⁰C durante 30 min; después de este período de incubación se agregaron 50 ul de complemento de cobayo diluido 1:2 en Solución de Hank y se incubó durante 30 min. Finalmente se hizo la prueba de viabilidad celular, agregando azul de tripano* a la suspensión celular.

6.- Conteo y Viabilidad Celular.

El número de células, así como el porcentaje de viabilidad celular fueron determinados por dilución de la suspensión celular en Solución de Hank y azul de tripano al 0.2% en solución salina isotónica*, contando las células en la cámara de Neubauer.

La viabilidad celular fue determinada mediante la incorporación de azul de tripano por la célula, ya que éste por ser un colorante de exclusión, sólo es incorporado por las células muertas.

El número total de células se obtuvo con la siguiente

* Ver apéndice de Reactivos.

fórmula:

$$\frac{\text{No. Total de céls.} \times \text{dilución} \times 1000}{0.4} = \text{No. céls./ml.}$$

7.- Obtención de los sueros humanos.

Las muestras fueron obtenidas de 2 mujeres embarazadas (dentro de los 3 primeros meses de gestación) y de 2 hombres sanos. Las edades estaban comprendidas entre los 20-34 años. La sangre fue colectada en tubos de vidrio de 13 x 100 mm, se permitió la formación de coágulo y a continuación se centrifugó a 1 800 rpm durante 10 min. Posteriormente el suero fue removido, inactivado a 56°C durante 30 min, fraccionado en pequeños volúmenes de 0.5 ml y conservado a -20°C.

El suero solamente fue descongelado antes de realizar el ensayo.

8.- Obtención de los sueros de ratones hembras gestantes.

a) Selección de las hembras.

En 2 jaulas con rejilla metálica se mantuvieron 12 hembras (6 en cada jaula) de la cepa BALB/c de aproximadamente un mes y medio de edad. Se revisaron periódicamente hasta el momento que se observó la apertura de la vagina, que de acuerdo a lo reportado por Foster y cols. (47) es una evidencia para poder efectuar su apareamiento.

b) Realización de las uniones.

Las hembras que presentaban apertura vaginal fueron puestas en presencia de ratones machos de la cepa BALB/c. Se empleó el sistema de apareamiento por harem, descrito

por Juergen Hoth (46) quien menciona que las proporciones machos a hembras pueden variar desde 1:2 hasta 1:6 ó 1:7 y que regularmente se aparean cuatro hembras por un macho, por lo que el número de hembras se limita a la capacidad del macho. La primera serie de apareamientos fue de 1 ratón macho x 2 ratones hembras (1:2) y posteriormente fueron de 1 macho por 3 hembras (1:3).

c) Determinación de los apareamientos y tiempos de gestación.

Una vez realizadas las uniones, las hembras fueron revisadas diariamente hasta observar la presencia de tapón vaginal, el cual se tomó como evidencia de copulación, según lo reportado por Foster y cols. (47) y Malvando (49).

Se establecieron los tiempos de gestación de 24 hrs y 1 semana los cuales se tomaron a partir del día que se observó el tapón vaginal (día 0).

d) Obtención de los sueros.

Las hembras fueron anestesiadas con éter y sangradas mediante punción cardíaca. Como el volumen de sangre obtenida por hembra es muy pequeño y no era suficiente para poder realizar un experimento, se optó por hacer mezclas de los sueros de las hembras encontradas apareadas el mismo día y con el mismo tiempo de gestación.

La sangre fue colectada en tubos de tapón de rosca, se permitió la formación de coágulo, luego fue centrifugado a 1 800 rpm durante 10 min. Los sueros fueron removidos, inactivados a 56°C durante 30 min, fraccionados en volúmenes de 0.5 ml y conservados a -20°C.

Cada muestra solamente fue descongelada antes de realizar el ensayo.

8.1.- Obtención de sueros normales de ratones machos y hembras.

Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 2-4 meses de edad. Los ratones fueron anestesiados con éter y sangrados mediante punción cardíaca. Se hicieron mezclas tanto de sueros de ratones machos como de hembras. Los sueros fueron inactivados, fraccionados en volúmenes de 0.5 ml y conservados a -20°C

9.- Modificaciones a la técnica de la formación de rosetas.

Para lograr la estandarización de esta técnica se modificaron una serie de parámetros como son: inmunización de los ratones, tiempo de incubación, temperatura y la centrifugación de células.

Los días probados después de la inmunización fueron: 3,4,7,9 y 11 días, mientras que los tiempos de incubación fueron de 30 min y 1 hr, las temperaturas de 37°C y Temperatura Ambiente, así como la opción de centrifugar o no a las células.

Los linfocitos de bazo fueron obtenidos de ratones machos de la cepa BALB/c, fueron inmunizados con eritrocitos de carnero (1×10^8) vía intraperitoneal. El número de linfocitos fue ajustado a $30 \times 10^6/\text{ml}$. A continuación se preparó una suspensión de eritrocitos de carnero al 1%, los cuales fueron previamente lavados tres veces con Solución de Hank. En tubos de vidrio de 13 x 100 mm se pusieron 100 μl de la suspensión de linfocitos, agregándoles posteriormente 100 μl de eritro-

citos de carnero al 1%, los tubos fueron tapados con papel parafilm y las células ya homogeneizadas fueron sometidas a los diferentes tiempos de incubación y temperatura, al igual fueron centrifugadas o no.

Ya cumplido el tiempo de incubación, los tubos fueron agitados suavemente y con la ayuda de una pipeta Pasteur se puso una muestra en la Cámara de Neubauer. El conteo de rosetas fue realizado en el área reglamentaria de la cámara. El criterio tomado para considerar una roseta, fue la presencia de un linfocito con 3 ó 4 eritrocitos de carnero adheridos a su membrana celular.

El número de rosetas por unidad de volumen se obtuvo de la siguiente manera:

No. total de rosetas formadas x 1000 = No. de rosetas/ml.

0.4

10.- Inhibición de la formación de rosetas por Suero Anti-timocitos (SAT).

Se obtuvieron linfocitos de bazo de ratón inmunizado con eritrocitos de carnero 7 días antes de realizar el experimento, las células fueron lavadas tres veces por centrifugación con Solución de Hank a 1 800 rpm durante 10 min; preparando una suspensión final de 60×10^6 céls./ml.

Los eritrocitos de carnero colectados en Alsever fueron lavados tres veces con Solución de Hank, haciendo una suspensión al 1%.

El SAT inactivado fue diluido mediante diluciones seriadas dobles desde 1:200 hasta 1:12 800, por lo que fueron probadas éstas 7 diluciones, así como el tubo control conteniendo células y Hank para la formación de rosetas

entre los linfocitos de bazo de ratón y los eritrocitos de carnero.

A un tubo estéril de tapón de rosca con 60×10^6 céls/ml se le agregó 1 ml de Solución de Hank. Las células fueron incubadas a 37°C durante 30 min, después se lavaron por centrifugación dos veces más con Solución de Hank a 1 800 rpm durante 5 min. Posteriormente se agregó 1 ml de Solución de Hank para tener el volumen y número de células iniciales. Se preparó un juego de 8 tubos de vidrio de 13 x 100 mm en los cuales se agregaron 100 ul de la suspensión de linfocitos y 100 ul de las respectivas diluciones de SAT, asimismo, se preparó el tubo control con 100 ul de células y 100 ul de Hank, luego fueron incubados a 37°C durante 90 min. Después se agregaron 200 ul de eritrocitos de carnero al 1% a cada tubo, se homogeneizaron las células y se incubaron durante 30 min a 37°C .

Finalmente las células fueron resuspendidas moviendo lentamente los tubos, con una pipeta Pasteur se puso una muestra en la Cámara de Neubauer y se procedió a contar el número de rosetas en cada dilución.

11.- Inhibición de la formación de rosetas por Suero Anti-timocitos (SAT)* + Factor de Embarazo Temprano (FET) Murino.

Se obtuvieron linfocitos de bazo de ratón inmunizado con eritrocitos de carnero 7 días antes de realizar el experimento, las células se ajustaron a una concentración final de 60×10^6 céls/ml.

Los eritrocitos de carnero colectados en Alsever fueron lavados tres veces con Solución de Hank haciendo una suspensión al 1%.

Para detectar la presencia de FET se probaron sueros de ratones hembras de 24 hr y 1 semana de gestación, y sueros normales de ratones machos y ratones hembras.

Se usaron 7 diluciones seriadas dobles de SAT, que fueron desde 1:200 hasta 1:12 800, así como dos tubos controles; uno con células + Hank y otro con células + FET murino.

Para realizar la inhibición de rosetas se utilizaron dos tubos estériles de tapón de rosca (1 y 2), poniendo un volumen de 1 ml de la suspensión de linfocitos (60×10^6) en cada tubo, luego fueron sometidos a centrifugación y el sobrenadante fue desechado. A continuación en el tubo 1 se agregaron 800 ul de Solución de Hank y en el tubo 2 se añadieron 800 ul de FET murino diluido 1:2 en solución de Hank. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 30 min, después se lavaron por centrifugación dos veces a 1 800 rpm durante 5 min. Posteriormente se agregó a cada tubo 1 ml de Solución de Hank para tener el volumen y número de células iniciales. Luego se prepararon 2 juegos de tubos de vidrio de 13 x 100 mm (8 tubos/juego):

Juego 1: se agregaron 100 ul de la suspensión de linfocitos + 100 ul de las respectivas diluciones de SAT, el tubo control contenía 100 ul de la suspensión de linfocitos + 100 ul de Hank.

Juego 2: se agregaron 100 ul de la suspensión de linfocitos incubados con FET murino + 100 ul de las respectivas diluciones de SAT el tubo control contenía 100 ul de las células incubadas en el FET murino + 100 ul de Hank.

Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 90 min. Después se adicionaron 200 ul de eritrocitos de carnero al 1% a cada uno de los tubos, las células fueron homoge-

neizadas e incubadas durante 30 min a 37°C.

Finalmente las células fueron resuspendidas moviendo lentamente los tubos, con una pipeta Pasteur se tomó una muestra, poniéndola en la Cámara de Neubauer para proceder al conteo de rosetas formadas en cada dilución, así como en los tubos controles.

*Esta técnica también fue utilizada para probar los sueros humanos y la Gonadotropina Coriónica Humana (HGC) comercial.

12.- Inmunización de los ratones.

Los eritrocitos de carnero de 2 ml de sangre en Alsever fueron lavados tres veces con Solución de Hank a 1 800 rpm durante 10 min, la capa de linfocitos sobre el paquete de eritrocitos fue aspirada y eliminada con una pipeta Pasteur después de la primera centrifugación. La suspensión se preparó tomando 100 ul del paquete de eritrocitos los cuales fueron puestos en un tubo de tapón de rosca con 3 ml de solución salina isotónica (0.85%) estéril. Para inmunizar a los ratones se tomaron 120 ul de la suspensión ($\sim 1 \times 10^8$ eritrocitos de carnero). El procedimiento se hizo en condiciones de esterilidad.

IV.- RESULTADOS.

Obtención de linfocitos de bazo.- La población celular obtenida a partir de los bazos de ratones machos BALB/c comprende valores de $52-110 \times 10^6$ linfocitos/bazo. Se encontró necesario sangrar al ratón antes de la extracción del bazo, ya que se disminuye la contaminación por eritrocitos en la suspensión celular. Debido a que el bazo representa una buena fuente de obtención de células solamente fueron utilizados 2 ratones machos por ensayo ($106-199 \times 10^6$ linfocitos/2 bazos).

Obtención de linfocitos de timo.- La población celular obtenida comprende valores de $24-49 \times 10^6$ linfocitos/timo. Un inconveniente de utilizar este órgano es la presencia de tejido conectivo, cuya eliminación puede implicar la pérdida de células.

Titulación del suero Anti-timocitos (SAT).- Se probó la especificidad del antisuero con linfocitos de timo y de bazo. Mediante la prueba de exclusión de azul de tripano se pudo observar que los linfocitos de timo fueron los más afectados en su viabilidad, encontrando que a una dilución de SAT de 1:10 la viabilidad fue de 19%, mientras que a una dilución de SAT de 1:2 560 fue de 72%. En los linfocitos de bazo el efecto fue menos evidente, ya que, a una dilución de SAT de 1:10 la viabilidad fue de 56% y a una dilución de SAT de 1:2 560 fue de 78% (Fig. I). La viabilidad del testigo fue de 82%.

El título de citotoxicidad para los linfocitos de timo fue de 1:320 y para los linfocitos de bazo de 1:10. El título de citotoxicidad se obtuvo de acuerdo a la metodología reportada por Bach y cols. (33), como la más alta dilución del SAT en la cual se observó un 25% o más de muerte celular.

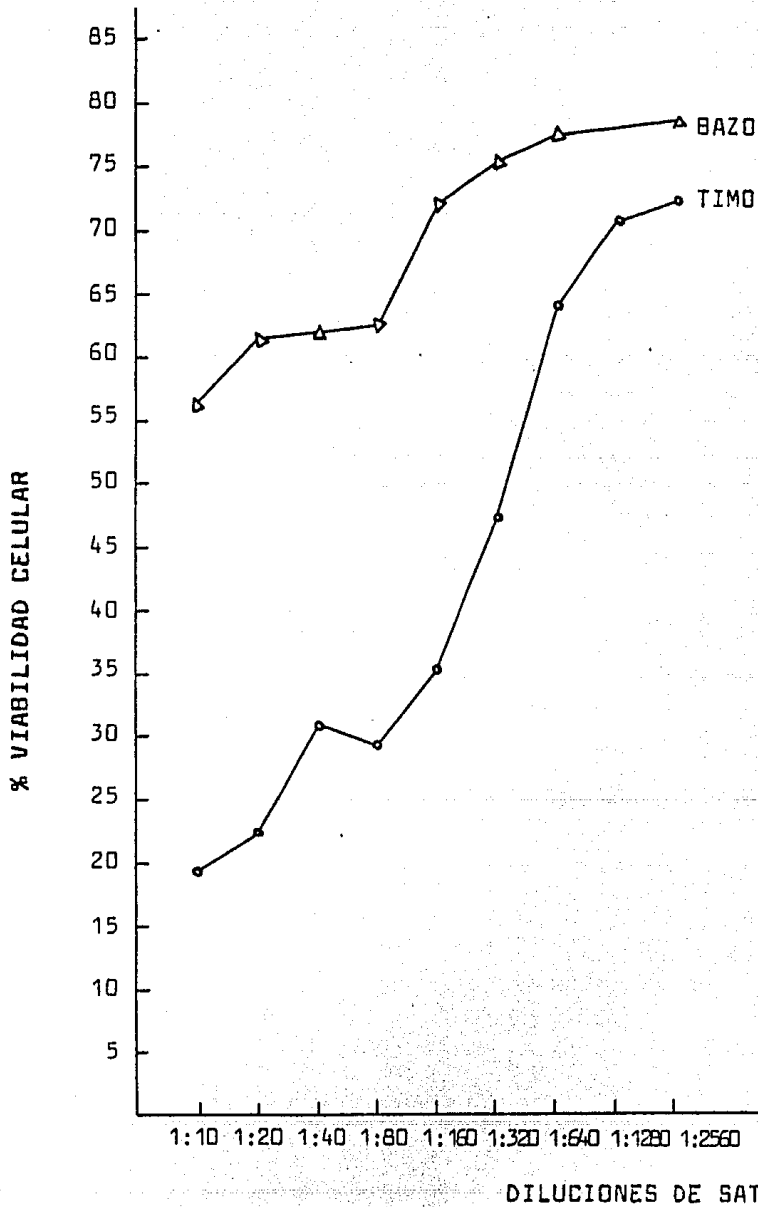


Fig. 1.- Titulación del Suero Anti-timocitos de Ratón (SAT) por citotoxicidad en el cual se probó la especificidad tanto para linfocitos de bazo como para linfocitos de timo de ratón.

Conteo y Viabilidad Celular.- La viabilidad celular fue cuantificada mediante la prueba de exclusión de azul de tripano. En los linfocitos de bazo la viabilidad obtenida a través de la serie de ensayos fue de 87-92%, y para los linfocitos de timo fue de 83-92%. Los linfocitos muertos presentaban en su interior al colorante, así como un aumento en su tamaño.

Obtención de sueros de ratones hembras gestantes.-

a) Suero de 24 hrs.- La edad de las hembras usadas en los apareamientos fue de 2-3 meses y con un peso de 21.5-29.5 gr, y la edad de los machos fue de 2-4 meses y su peso de 23.5-38.5 gr. El total de hembras utilizadas fue de 24, entre apareadas y descartadas. El fin de semana fueron descartadas las hembras que en el transcurso de la misma no se habían apareado. Un problema muy importante que se presentó en esta primera parte de obtención de sueros fue el del tiempo empleado en lograr los apareamientos necesarios para cubrir la cantidad de suero requerido para los ensayos (500 ul de suero/ensayo).

b) Suero de 7 días de gestación.- La edad de las hembras fue de 3 meses y con un peso de 28.0-36.0 gr, la edad de los machos fue de 3-4 meses y su peso de 32.5-38.0 gr. Ya con previa experiencia en la obtención de los sueros de 24 hrs de gestación, se optó por hacer uniones de 1 ratón macho x 3 ratones hembras (1:3) para dar mayor oportunidad de apareamiento y reducir el tiempo de obtención de sueros. Fueron utilizadas 15 hembras entre apareadas y descartadas.

Obtención de suero normal de ratones hembras.- La edad estuvo comprendida entre 2-3 meses y su peso fue de 22.5-35.5 gr. Fueron sangradas 8 hembras mediante punción cardíaca, el suero fue inactivado y alicuotado en 500 ul

y conservado a -20°C .

Obtención de suero normal de ratones machos.— Su edad estuvo comprendida entre 3-4 meses de edad y su peso fue de 30.0-41.0 gr. Fueron sangrados 8 machos por punción cardíaca, el suero fue inactivado y alicuotado en 500 μl y conservado a -20°C .

Modificaciones a la técnica de la formación de rosetas.— Inicialmente fueron utilizados linfocitos de bazo de ratón normal y eritrocitos de carnero, para obtener la formación de rosetas activas, sin embargo, el número de éstas fue demasiado bajo $44.0 \pm 7.34/1 \times 10^6$ linfocitos. Esta técnica no podía ser empleada ya que la cantidad tan baja de rosetas no permitiría comprobar posteriormente una inhibición en su formación. Por ello se optó por inmunizar a los ratones con eritrocitos de carnero y trabajar de este modo con linfocitos sensibilizados hacia los eritrocitos de carnero, lo que implicó un aumento en la formación de rosetas.

Los resultados obtenidos al manejar los parámetros de inmunización de los ratones, tiempo de incubación de las células, temperatura y centrifugación de las mismas, están dados en la tabla 1, en donde se puede ver que el tiempo óptimo de sensibilización de los linfocitos para la formación de rosetas es el día 7.

En la figura 2 se puede observar que además del tiempo de inmunización de los ratones, la formación de rosetas también es favorecida por la temperatura de 37°C y la centrifugación de las células, sin embargo, este parámetro fue descartado ya que propiciaba la formación de acúmulos de eritrocitos que hacían difícil identificar a las verdaderas rosetas, el tiempo de incubación de 1 hr también favoreció el rosetamiento, pero prolonga demasiado la técnica.

La técnica de formación de rosetas inducidas se estableció con un tiempo de inmunización de 7 días, temperatura de 37°C y un tiempo de incubación de 30 min.

Posteriormente esta técnica fue desarrollada; obteniéndose una gran diferencia en la formación de rosetas inducidas $543.7 \pm 89.48/1 \times 10^6$ linfocitos en comparación de las rosetas activas $44.0 \pm 7.34/1 \times 10^6$ linfocitos (Tabla II).

TABLA I

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA LA FORMACION DE ROSETAS INDUCIDAS.

Tiempo de inmunización (días)	Temperatura 37°C			Temperatura ambiente		
	Centrifugación	1 hr.	30 min.	Centrifugación	1 hr.	30 min.
3	656.6	310.0	300.0	450.0	356.6	320.0
4	750.0	593.3	491.6	841.6	703.3	525.0
7	1100.0	893.3	720.0	1016.6	803.3	770.0
9	740.0	420.0	426.6	670.0	633.3	420.0
11	650.0	383.3	453.3	573.3	460.0	336.6

Los resultados están dados en No. de rosetas/ 1×10^6 linfocitos.

Valores obtenidos de 2 ensayos por grupo.

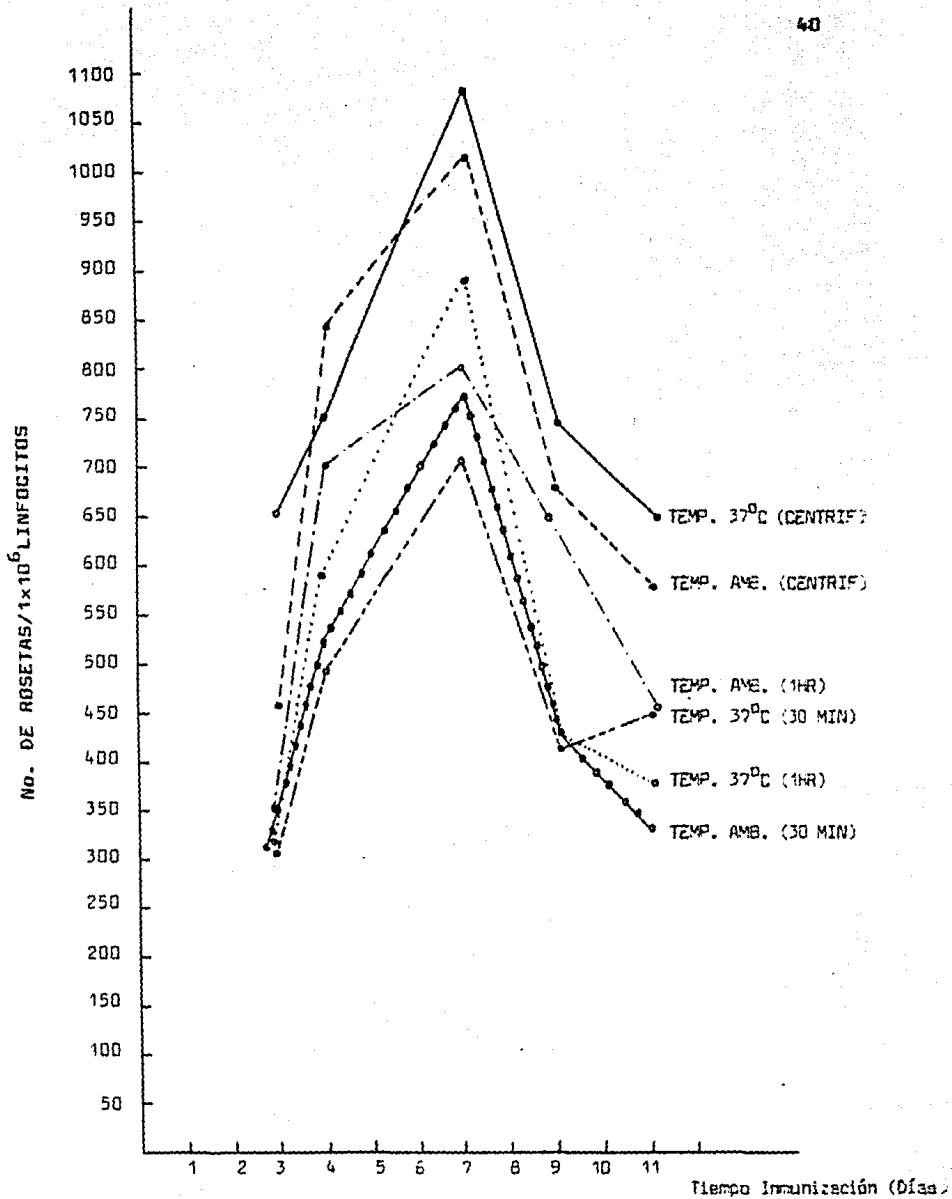


Fig. 2.- Determinación de las condiciones adecuadas para la formación de rosetas inducidas entre linfocitos de bazo de ratón macho y eritrocitos de carnero.

TABLA II

COMPARACION ENTRE ROSETAS ACTIVAS Y ROSETAS INDUCIDAS.

No. de experimentos	Rosetas Activas/ 1×10^6 linf	Rosetas Inducidas/ 1×10^6 linf
1	50.0	696.6
2	41.6	527.0
3	33.3	541.6
4	58.3	562.3
5	41.6	518.6
6	41.6	510.3
7	41.6	675.0
8		520.6
9		379.0
10		506.0
$\bar{X} + s$	44.0 ± 7.34	543.7 ± 89.48

\bar{X} = Promedio de los valores obtenidos en 7 y 10 ensayos respectivamente.

Efecto del suero anti-timocitos (SAT) sobre la formación de Rosetas Inducidas.- En la tabla III la formación de rosetas está dada como un porcentaje respecto al control (Hank) para cada dilución del SAT. El efecto del SAT sobre la formación de rosetas se ve reflejado a bajas diluciones, encontrándose que a una dilución de 1:200 su efecto inhibitorio es de $40.8 \pm 12.5\%$ y a diluciones altas su efecto es perdido, en la dilución 1:12 800 es de $-4.1 \pm 9.1\%$ indicando que incluso a esta dilución el número de rosetas formadas es un poco mayor que en el control.

La fig. 3 muestra que a diluciones bajas de SAT su actividad afecta la formación de rosetas, pero a medida que las diluciones son altas, la formación de rosetas aumenta y el efecto inhibitorio del SAT desaparece.

Se estableció como significativa una inhibición en la cual se dió el mayor porcentaje de inhibición de rosetas respecto al control (Hank). Se tomó como significativa una inhibición comprendida en el rango de 28.3-53.3% que corresponde a la dilución 1:200.

Influencia del sexo en los Sueros de Ratonos Normales sobre la Prueba de Inhibición de Rosetas.- El porcentaje de inhibición de rosetas por SAT no fue aumentado de manera importante cuando se probaron los sueros de ratones machos y de ratones hembras; sugiriendo que estos sueros no contenían ningún factor capaz de inhibir la formación de rosetas (Tabla IV y Fig. 4).

Estos resultados fueron analizados estadísticamente por aplicación de la prueba de t de Student, para ambos grupos de sueros normales se encontró que no había una diferencia estadísticamente significativa ($0.05 < P < 0.1$) en comparación con el grupo de SAT.

La inhibición para los grupos de ratones machos y hembras fue de 33.5-51.55% y de 41.8-46% respectivamente, para las diluciones 1:200 las cuales caen dentro del 53.3% de inhibición significativa causada solamente por SAT.

TABLA III
EFECTO DEL SAT SOBRE LA FORMACION DE ROSETAS INDUCIDAS.

Diluciones de SAT*	$\bar{X}_{\pm s}$ de formación de Rosetas (%)	$\bar{X}_{\pm s}$ de inhibición rosetas (%)
CONTROL (Hank)	100%	0%
1 : 200	59.6 \pm 12.5	40.8 \pm 12.5
1 : 400	73.7 \pm 14.9	26.3 \pm 14.9
1 : 800	77.8 \pm 11.0	22.2 \pm 11.0
1 : 1 600	86.9 \pm 8.3	13.1 \pm 8.3
1 : 3 200	94.6 \pm 10.8	5.4 \pm 10.8
1 : 6 400	98.8 \pm 11.2	1.2 \pm 11.2
1 : 12 800	104.1 \pm 11.2	14.1 \pm 9.1

\bar{X} = Promedio de los valores obtenidos de 14 ensayos.

*SAT = Suero anti-timocitos.

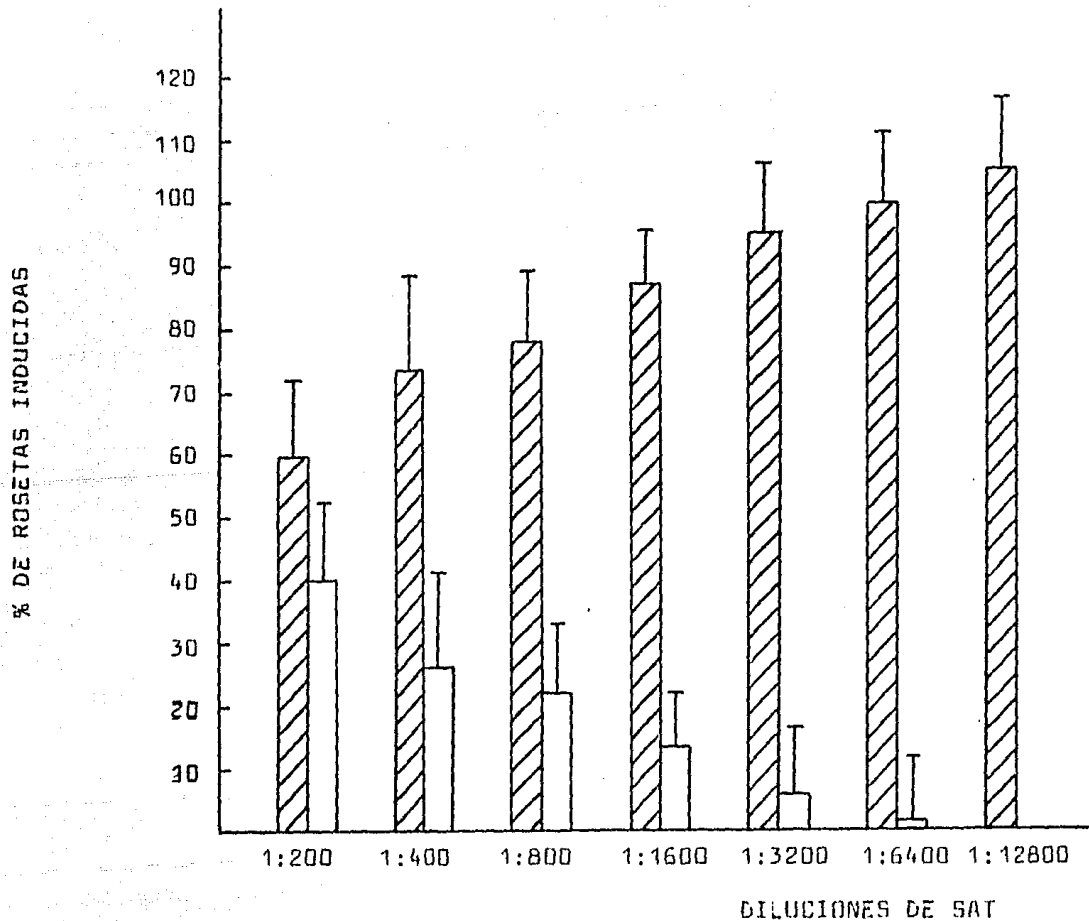


Fig. 3.- Efecto de varias diluciones de SAT sobre el porcentaje de rosetas observadas.

▨ Formación de rosetas □ Inhibición de rosetas

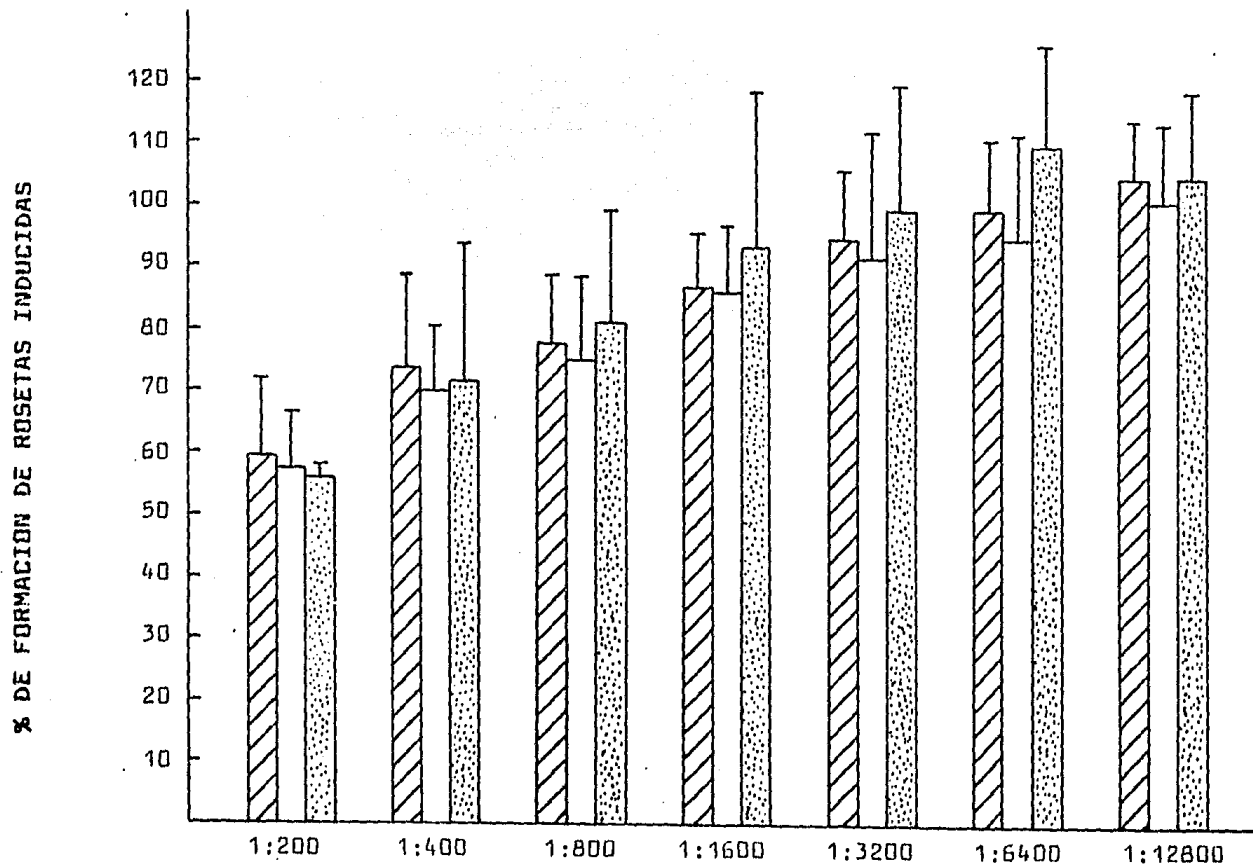


Fig. 4.- Influencia del sexo en los sueros de ratones normales sobre la prueba de inhibición de la formación de rosetas.

▨ SAT

□ SAT + Suero Ratón Macho

▤ SAT + Suero Ratón Hembra

Influencia del tiempo de gestación en el suero de ratones hembras gestantes.- El efecto inhibitorio del SAT fue modificado en presencia de los sueros de ratones hembras gestantes, siendo más notorio el aumento de inhibición de rosetas con el suero de 24 hrs. de gestación en las dos primeras diluciones (Tabla V), esto sugirió la presencia de alguna sustancia en los sueros, capaz de interactuar con el SAT y aumentar la inhibición de rosetas (Fig. 5).

En ambos grupos de sueros de hembras gestantes se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($0.01 < P < 0.025$) en las medias de la dilución 1:400 comparadas cada una con la media de la dilución 1:400 del grupo de SAT, mientras que en las demás diluciones no hubo diferencia estadísticamente significativa.

La inhibición de rosetas para el suero de 24 hrs. se dió en un rango de 34.54-73.50% mientras que para el suero de 7 días de gestación fue de 36.1-56.7% en las diluciones 1:400. Con esto se estableció una inhibición significativa de rosetas únicamente por SAT con valores menores de 53.3% y valores mayores de 53.3% ya implican la acción de algún otro factor presente en el suero de embarazo.

Efecto del SAT + Sueros Humanos sobre la Prueba de Inhibición de Rosetas.- No hubo un aumento en la inhibición de rosetas cuando se probó el suero normal de hombres, encontrando una inhibición del 32.77% en la dilución 1:400 que resultó ser significativa para la inhibición causada solamente por SAT. Mientras que con el suero de embarazo se observó un aumento en la inhibición de rosetas, la cual fue significativa con un 59.32% en la dilución 1:400 para el valor establecido (mayor de 53.3%) con el suero de ratones hembras gestantes.

TABLA IV
 INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS SUEROS DE RATONES NORMALES SOBRE
 LA PRUEBA DE INHIBICION DE ROSETAS

Diluciones de SAT*	$\bar{X}_{\pm s}$ de la formación de rosetas en presencia de SAT (%)		$\bar{X}_{\pm s}$ de formación de rosetas en presencia de SAT (%)
	Suero Normal Ratón Macho	Suero Normal Ratón Hembra	
CONTROL (Hank)	100%	100%	100%
1 : 200	57.55 \pm 9.1	56.1 \pm 2.1	59.6 \pm 12.8
1 : 400	69.9 \pm 10.3	71.5 \pm 22.1	73.7 \pm 14.9
1 : 800	75.1 \pm 13.3	81.0 \pm 18.0	77.8 \pm 11.0
1 : 1 600	86.0 \pm 10.6	93.0 \pm 25.0	86.9 \pm 8.3
1 : 3 200	91.35 \pm 20.2	99.2 \pm 20.3	94.6 \pm 10.8
1 : 6 400	94.25 \pm 16.5	109.0 \pm 16.3	98.8 \pm 11.2
1 : 12 800	100.25 \pm 12.5	104.1 \pm 13.3	104.1 \pm 9.1

\bar{X} = Promedio de los valores de 4 ensayos por grupo de ratones normales.

*SAT = Suero anti-timocitos.

TABLA V

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GESTACION EN EL SUERO DE RATONES
HEMORAS GESTANTES.

Diluciones de SAT*	$\bar{X} \pm s$ de la formación de rosetas en presencia de SAT (%)		$\bar{X} \pm s$ de la formación de rosetas en presencia de SAT (%)
	Suero de ratón hembra gestante (24 hrs.)	Suero de ratón hembra gestante (7 días)	
CONTROL (Hank)	100%	100%	100%
1 : 200	40.125 \pm 20.82	57.3 \pm 12.8	59.6 \pm 12.8
1 : 400	45.975 \pm 19.48	53.6 \pm 10.3	73.7 \pm 14.9
1 : 800	65.85 \pm 17.38	61.7 \pm 16.2	77.8 \pm 11.0
1 : 1 600	74.07 \pm 15.06	74.7 \pm 14.7	86.9 \pm 8.3
1 : 3 200	83.35 \pm 7.19	77.6 \pm 14.4	94.6 \pm 10.8
1 : 6 400	88.67 \pm 11.18	87.0 \pm 13.5	98.8 \pm 11.2
1 : 12 800	89.95 \pm 20.69	93.8 \pm 12.7	104.1 \pm 9.1

\bar{X} = Promedio de los valores obtenidos de 4 ensayos por grupo de hembras gestantes.

*SAT = Suero anti-timocitos.

% FORMACION DE ROSETAS INDUCIDAS

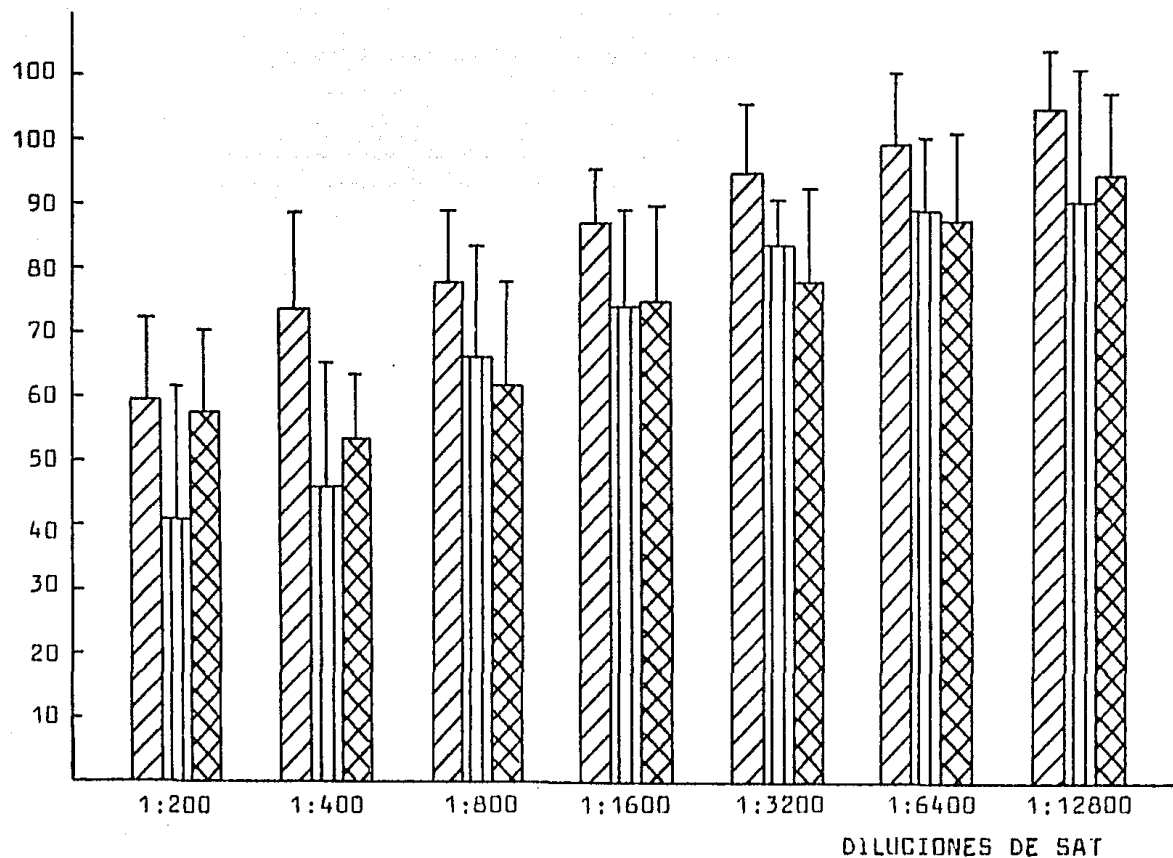


Fig. 5.- Influencia del suero de ratones hembras gestantes sobre la prueba de inhibición de la formación de rosetas.

▨ SAT

▨▨▨ SAT + Suero de 24 hrs

▨▨▨ SAT + Suero de 7 días

TABLA VI

EFECTO DE SAT + SUEROS HUMANOS SOBRE LA PRUEBA DE INHIBICION DE ROSETAS.

Diluciones de SAT*	% de formación de rosetas en presencia de SAT + Suero Normal de Hombre		% de formación de rosetas en pre- sencia de SAT ($\bar{X} \pm s$).	
	Suero de Mujer Em- barazada (1er. trimestre).			
Control (Hank)	100%	100%	100%	
1 : 400	67.23	40.68	73.7 \pm 14.9	
1 : 800	88.31	62.23	77.8 \pm 11.0	
1 : 1 600	90.92	86.60	86.9 \pm 8.3	
1 : 3 200	93.16	88.85	94.6 \pm 10.8	
1 : 6 400	92.20	90.40	98.8 \pm 11.2	
1 : 12 800	108.63	98.74	104.1 \pm 9.1	

Promedio de los valores de 2 ensayos con sueros humanos.

*SAT = Suero anti-timocitos.

Efecto de la HGC sobre la prueba de Inhibición de la Formación de Rosetas.- Para estos ensayos se probaron diferentes concentraciones de HGC y aún a diluciones altas de SAT se observa cierta inhibición (Tabla VII). Asimismo, se ve que hay una tendencia a aumentar la inhibición de rosetas a medida que se aumenta la concentración de HGC comercial y a pesar de que las diluciones de SAT son más altas que las empleadas en los ensayos anteriores, el efecto ejercido por la HGC es fuerte.

TABLA VII

EFFECTO DE LA HGC SOBRE LA PRUEBA DE INHIBICION DE ROSETAS

Diluciones de SAT*	% F O R M A C I O N D E R O S E T A S			
	C O N C E N T R A C I O N E S D E H G C			
	20 IU/ML	30 UI/ML	60 IU/ML	120 IU/ML
1 : 7000	81.02	61.26	68.18	48.41
1 : 11000	80.03	78.06	62.25	56.32
1 : 15000	79.05	81.02	64.22	71.14
1 : 19000	82.01	83.0	70.15	72.13
1 : 23000	90.9	80.03	76.08	76.08
1 : 27000	90.9	84.98	83.0	80.03

* SAT = Suero anti-timocitos.

V.- DISCUSION.

Con base en las evidencias que sugieren la presencia de un factor inmunosupresor en el suero de embarazo, se empleó un modelo animal para la detección del FET, siendo los ratones un recurso disponible de células.

El bazo constituyó la fuente de obtención de linfocitos y la metodología empleada en la extracción del órgano fue rápida y práctica.

Para la evaluación de la viabilidad celular se empleó el método de exclusión de azul de tripano, éste ha sido utilizado en la determinación de la viabilidad de las células, en las cuales el colorante puede ser excluido cuando están vivas, no así en las células donde la membrana está dañada. Se encontró que la viabilidad de los linfocitos de timo fue un poco menor que la de los linfocitos de bazo, lo cual fue una consecuencia de una obtención más laboriosa al ir eliminando el tejido conectivo que se precipitaba de la suspensión celular después de cada lavada, sin embargo, para el objetivo que se perseguía que era el de inmunizar al conejo, fue más importante el obtener una población celular libre de tejido contaminante.

Por otro lado, los títulos de citotoxicidad del suero anti-timocitos fueron bajos, presentando una menor interacción con el anti-suero los linfocitos de bazo, sugiriendo que los anticuerpos eran específicos para células T. Hay que considerar que en el bazo el 65% son linfocitos B y el 35% son linfocitos T, según lo reportado por Bach (38) y de acuerdo a Fudenberg (6) hay un 50% de linfocitos B y un 50% de linfocitos T, lo cual puede correlacionar con el título de citotoxicidad más bajo para los linfocitos de bazo.

Además no se ha encontrado una correlación entre el título de citotoxicidad del antisuero y su capacidad

inmunosupresora, que es reflejada en el título de inhibición de rosetas (RIT), por lo que, un antisuero con título alto no necesariamente es inmunosupresor (33).

Por consiguiente, Brain & Gordon (34) reportan que un suero anti-linfocitos empleado por ellos, el cual mostró ser inmunosupresor mediante la prolongación de injerto de piel tuvo un título de citotoxicidad de 1:1 600 en su sistema. La titulación del antisuero fue importante ya que permitió comprobar la especificidad de éste.

Con respecto a las rosetas, en primera instancia se trabajó la técnica de la formación de rosetas activas, que fue una modificación del método empleado por Bach (33) en el que se trabajan linfocitos humanos; para ello fueron utilizados linfocitos de bazo de ratones normales y eritrocitos de carnero, pero sólo un pequeño número de linfocitos formaron rosetas en un $0.4 \pm 0.07\%$ lo cual concuerda con lo reportado por Morton y cols. (35), en donde mencionan una formación baja de rosetas activas con 10-20 rosetas/ 10^4 células de bazo, esto con el mismo tipo de células usadas en nuestro sistema y cuando sustituyeron a los eritrocitos de carnero por eritrocitos humanos se incrementó el número de rosetas a 5-20 rosetas/ 10^3 linfocitos de bazo. Se considera que estas rosetas de alta afinidad pueden representar a una subpoblación de células T que funcionan principalmente como linfocitos efectores en la respuesta celular (6).

Esta técnica fue descartada debido a la dificultad que representaba el evidenciar una inhibición de rosetas con un número tan bajo de éstas. Sólo se logró establecer el número de linfocitos empleados por ensayo que fue de 30×10^6 linfocitos/ml y la proporción de linfocitos-eritrocitos de carnero de 1:8.

Posteriormente los ratones fueron inmunizados vía intraperitoneal con eritrocitos de carnero, ya que con esta vía de inmunización se obtiene principalmente una respuesta celular y así aumentó el número de rosetas formadas a $5.39 \pm 0.08\%$ y la formación de rosetas se consideró específica en el sentido de que ocurrió con linfocitos sensibilizados hacia los eritrocitos de carnero.

En el método empleado por Bach también se reporta la centrifugación una vez que se ha hecho la mezcla de linfocitos y eritrocitos de carnero y posteriormente la resuspensión del botón celular en un disco rotador a 10 rpm. Este paso fue sustituido en nuestra técnica ya que se producían acúmulos de células, principalmente de eritrocitos que hacían difícil la cuantificación de las verdaderas rosetas, por ello, se permitió la formación de rosetas incubando los linfocitos y los eritrocitos durante 30 min a 37°C , obteniendo los resultados ya mencionados.

Asimismo, la técnica de inhibición de la formación de rosetas realizada en este trabajo fue una modificación de la técnica de Morton y cols. (35), cuyas principales modificaciones están dadas por el uso de linfocitos de ratón sensibilizados hacia los eritrocitos de carnero (rosetas inducidas), el uso de suero anti-timocitos (SAT) la incubación de las células durante 30 min a 37°C para obtener la formación de rosetas, así como el no emplear complemento.

También fue variada la manera de interpretar los resultados; así en lugar de manifestar los valores de inhibición mediante el título de inhibición de rosetas (TIR) se dieron como un porcentaje significativo de inhibición de rosetas.

Este porcentaje significativo de inhibición de rosetas fue obtenido a partir de la dilución de SAT en la que se encontró la mayor inhibición en comparación con el control (Hank). El valor significativo de inhibición de rosetas causada solamente por SAT fue establecido en un rango de 28.3-53.3% para la dilución 1:200, de esta manera valores mayores de 53.3% fueron tomados como positivos para embarazo.

Al respecto, en el sistema empleado, la naturaleza de la inhibición de rosetas por SAT aún no es clara, se sabe que la capacidad que tiene una célula para formar rosetas es perdida si muere y también desaparece en incubaciones prolongadas con solución salina, por lo que se podría esperar que el efecto del suero antilinfocitos fuera el de matar a las células (33), sin embargo, las diluciones usadas en los ensayos fueron desde 1:200 hasta 1:12 800 siendo mayores que las utilizadas en la titulación del SAT, y en las que a una dilución de 1:2 560 la viabilidad de los linfocitos de bazo es poco afectada.

También se considera que este fenómeno no es de enmascaramiento de receptores gamma globulinas sobre la superficie celular, ya que un suero anti-gamma globulinas no aumenta la inhibición de la formación de rosetas (33).

En relación a esto último, no se puede considerar que la inhibición de rosetas obtenida aquí se deba a la presencia de anticuerpos anti-gamma globulinas, debido a que al inmunizar a los ratones vía intraperitoneal con eritrocitos de carnero, se usaron linfocitos T y éstos no presentan inmunoglobulinas de superficie que pudieran permitir la inhibición de rosetas.

Así, aún cuando un pequeño porcentaje de células B de bazo (0.1%) forma rosetas y éstas también aumentan al

inmunizar a los ratones (38), la inhibición de rosetas va a estar dada principalmente por los linfocitos T.

En algunos trabajos se sugiere que el mecanismo de inhibición de rosetas posiblemente involucra la unión del anticuerpo anti-receptor E al receptor E, así como un impedimento estérico al interaccionar el suero heterólogo con determinantes antigénicos poco espaciados (39).

Con respecto a los sueros normales tanto de ratones hembras como de ratones machos, así como los de las hembras gestantes, al realizar primero la incubación de los linfocitos en el suero, se trató de reflejar una situación in vivo, en la cual los linfocitos posiblemente se ven sujetos a algún agente inmunosupresor y con la segunda incubación en SAT ya se puede observar la inhibición de la formación de rosetas incrementada in vitro.

No se observó gran diferencia entre los valores obtenidos para el suero de ratones machos y hembras normales comparados con el grupo de SAT, en ambos grupos se manifestó únicamente la inhibición de rosetas causada por el efecto del SAT.

Mientras que los sueros de ratones hembras gestantes modificaron la inhibición de rosetas por SAT al aumentarla; en algunos trabajos mencionan que el FET aumenta el efecto bloqueador del SAT probablemente por saturación de algunos receptores para eritrocitos, sobre los linfocitos (29).

La inhibición significativa mayor del 53.3% sugiere que aparte de la actividad inmunosupresora del SAT está actuando algún otro factor, posiblemente el FET.

Al realizar las uniones de los ratones se tomó en consideración que la duración del ciclo estral en las hembras es de 4-5 días, por lo que se dió el tiempo de 1 semana para lograr los apareamientos posibles, los cuales

fueron escasos y tardados. Los apareamientos obtenidos se dieron principalmente a los 3 ó 4 días después de hacer las uniones y se consideraron como positivos en gestación.

Foster (47) menciona al respecto que de los apareamientos que tienen lugar inmediatamente después de hacer las uniones, una gran proporción son estériles; indicando que han tenido lugar fuera del estro.

Para el suero de 24 hrs de gestación sólo se tomó como evidencia del apareamiento la presencia del tapón vaginal (19, 49) ya que al efectuarse las disecciones, las astas uterinas presentaron el mismo aspecto que el de las hembras normales (no apareadas).

En el suero de 7 días de gestación además de la presencia del tapón vaginal se tomó como evidencia de embarazo la presencia de los embriones.

De esta manera, consideramos que se pudo detectar la presencia de un posible factor de embarazo antes de la implantación en el suero de 24 hrs. de gestación y asimismo, su presencia a través del embarazo en el suero de 7 días de gestación.

Varios autores reportan una depresión en la actividad de los linfocitos de ratones hembras gestantes tan temprano como a las 6 hrs después de un apareamiento exitoso y la cual persiste hasta los 4 ó 6 días antes del parto (23).

Por otra parte, Morton y cols. (24) encontraron que el número de células formadoras de rosetas no disminuye en el embarazo, sino que el número de sitios de unión sobre éstas células, disponibles para la actividad inmunosupresora del suero antilinfocitos es disminuido.

Una vez establecida la técnica de la inhibición de rosetas inducidas en el sistema del ratón, se procedió a

probar muestras de sueros humanos, ya que de acuerdo a Morton y cols. (35) se menciona que el FET no es específico de especie, por lo que se esperaba encontrar una reacción cruzada con los linfocitos de ratón.

En los sueros normales de hombres no se encontró variación en cuanto a la inhibición de rosetas, sólo se conservó el efecto inhibitorio por SAT, lo cual fue considerado como normal.

En los sueros de mujeres embarazadas se pudo observar un aumento en la inhibición de rosetas cuyos valores caen dentro de la inhibición significativa para sueros de ratones hembras gestantes. En estos resultados no se puede asegurar hasta el momento, que el efecto de inhibición sea debido al FET, ya que a este tiempo de gestación ya existe una serie de proteínas propias del embarazo, las cuales tal vez puedan tener un efecto sobre los linfocitos. Sin embargo, estos resultados sugieren que si se da una interacción entre los linfocitos de bazo de ratón y alguna proteína presente en el suero de embarazo humano.

También existía interés respecto al efecto que podría ejercer la HGC comercial sobre la técnica, debido a que se ha considerado que la HGC cuya presencia es temprana en el embarazo, tiene una posible actividad inmunosupresora contra los linfocitos, y en donde se han encontrado resultados positivos con concentraciones tan bajas de la hormona como son 5 pg/ml, pero existe controversia al respecto (23). También es reportado que la inhibición de rosetas causada por preparaciones de HGC, más bien es debida a un factor contaminante que se ha sugerido es el FET (21).

Con base en los resultados obtenidos se puede decir que se ha logrado parcialmente el objetivo, principalmente

en lo que se refiere a la técnica de inhibición de rosetas; ya que sólo se pudo comprobar de una manera cualitativa el efecto que tiene el suero de hembras gestantes sobre la actividad de los linfocitos de ratón, por lo que sería importante dilucidar el fenómeno de la inhibición de la formación de rosetas por medio de la caracterización de las moléculas presentes en los linfocitos y en los eritrocitos de carnero y que están involucradas en la formación de rosetas inducidas.

Para completar el estudio también sería conveniente en el caso de sueros humanos, aislar a las proteínas propias del embarazo y probar su actividad biológica en la técnica de inhibición de rosetas aunque ya se han probado algunas de ellas, con resultados negativos.

Se hace mención a esto, debido a que lo que se pretende es tratar de establecer una técnica adecuada que permita la detección de fecundación en humanos, que sería un método precoz de detectar la gestación, incluso más temprano que la detección de embarazo por gonadotropina coriónica.

El interés por lograr la detección de fecundación en humanos mediante un sistema heterólogo, está dado principalmente por la estabilidad que representa el trabajar con ratones, de los cuales se obtiene el número de linfocitos necesarios para los ensayos, lo que evita el coleccionar sangre de personas (20 ml) y el problema de obtener la concentración de células requeridas, así como el uso de reactivos más caros para su obtención.

Finalmente, algunas críticas para esta técnica son, el que es laboriosa y prolongada y el número de muestras que se pueden probar por ensayo es muy bajo.

VI.- CONCLUSIONES.

La presente investigación permite concluir que es posible desarrollar la detección del factor de embarazo temprano (FET) utilizando un sistema heterólogo.

El incremento en la inhibición de la formación de rosetas con el suero de embarazo es debido a la presencia de algún factor inhibidor de la formación de rosetas en el suero de hembras gestantes.

La técnica modificada de la inhibición de la formación de rosetas es un método cualitativo, el cual puede ser mejorado para lograr un método cuantitativo, lo que requiere de la caracterización de las moléculas implicadas en la formación de rosetas y el uso de anticuerpos monoclonales.

Es conveniente continuar el estudio sobre humanos, donde se tenga control de la fecundación y tratar de evidenciar así, la efectividad del ensayo sobre fecundación.

VII.- APENDICE DE REACTIVOS.

Solución de Hank.

NaCl	8.0 gr
KCl	0.4 gr
CaCl ₂	0.14 gr
MgSO ₄	0.20 gr
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	0.12 gr
KH ₂ PO ₄	0.06 gr
NaHCO ₃	0.35 gr
MgCl ₂	0.1 gr
Dextrosa	1.0 gr
Rojo de fenol	0.020 gr

Ajustar el pH a 7.2 y aforar con agua destilada a 1 litro.

Cloruro de Amonio Amortiguado.

i) cloruro de amonio (NH ₄ Cl).....	4.15 gr
Aforar con agua destilada	500 ml
ii) Tris (Base)	2.06 gr
Aforar con agua destilada	100 ml

Mezclar:

Solución i	450 ml
+ Solución ii	50 ml

Ajustar el pH a 7.2 con HCl concentrado.

Esterilizar por filtración.

Solución de Aloeever.

Glucosa	2.05 gr
Citrato de Sodio	0.8 gr
Cloruro de Sodio	0.42 gr
Agua destilada	100 ml

Ajustar el pH a 6.2 con ácido cítrico al 10%.

Esterilizar por filtración.

Solución Salina Isotónica.

Cloruro de Sodio	0.85 gr
Agua destilada	100 ml

Azul de Tripano (0.2%)

Azul de tripano	0.2 gr
Sol. salina isotónica	100 ml

Solución de Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) al 5.6%.

Bicarbonato de Sodio	5.6 gr
Agua destilada	100 ml

Acido Clorhídrico 1 N.

HCl	8.5 ml
Agua destilada	100 ml

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- CRIGHTON, D.B. (1984). "Immunological Aspects of Reproduction in Mammals". 1ª edición. Butterworths. London. pp. 35-100.
- 2.- STANKOVA, JANA and PLESZCZYNSKY, MAREK. (1984). "Suppressor Cells in the Human Maternal-Fetal Relationship". Journal of Reproductive Immunology. 6:49-59.
- 3.- ROITT, IVAN. (1977). "Essential Immunology". 3ª edición. Blackwell Scientific Publications. Oxford. England. pp. 248-250.
- 4.- FINN, R. et al. (1977). "Feto-Maternal Bidirectional Mixed Lymphocytes Reaction and Survival of Fetal Allograft". The Lancet. 10:1200-1202.
- 5.- ROCKLIN, R.E.; KITZMILLER, J.L. and KAYE, M.D. (1979). "Immunobiology of the Maternal-Fetal Relationship". Ann. Rev. Med. 30:373-404.
- 6.- STITES, D.; FUDENBERG, H.; STOBO, J. and WELLS, J. (1984). "Inmunología Básica y Clínica". Cap. 21. "Inmunología de la Reproducción". 5ª edición. El Manual Moderno. México. pp. 325-333.
- 7.- LAWRENCE, R. et al (1980). "Immunological Mechanisms in the Maintenance of Pregnancy". Annals of Allergy. 44:166-173.
- 8.- CHAQUAT, GERARD. (1987). "La Defensa del Feto Contra su Madre". Mundo Científico. Vol. 6 No. 60 pp. 718-730.

- 9.- HAM, ARTHUR. (1970). Tratado de Histología. Cap. 29. "Sistema Reproductor Femenino". 6ª edición. Interamericana. pp. 869-976.
- 10.- RACHMAN, F.; CASIMIRI, V. and BERNARD, D. (1984). "Maternal Immunoglobulins G, A and M in Mouse Uterus and Embryo During the Post-implantation Period". Journal of Reproductive Immunology". 6:39-47.
- 11.- TEKELIOGLU-UYSAL, M.; EDWARDS, R.G. and KISNISCI, H.A. (1975). "Ultrastructural Relationships between Decidua, Trophoblast and Lymphocytes at the beginning of Human Pregnancy". J. Reprod. Fert. 42:431-438.
- 12.- KUMATE, R. JESUS. (1975). "La Inmunidad en la Reproducción". Memoria del Colegio Nacional. pp. 90-116.
- 13.- CALDERON, J. ERNESTO. (1984). "Tuberculosis y Riesgo Perinatal" Infectología. Organo de la Asociación Mexicana de Infectología A.C. No. 8 pp. 196-201.
- 14.- CHENEY, RICHARD et al. (1984). "Subpopulations of Lymphocytes in Maternal Peripheral Blood during Pregnancy". Journal of Reproductive Immunology. 6:111-120.
- 15.- YOUTANANUKORN, V. and MATANGKASOMBUT, P. (1972). "Human Maternal Cell Mediated Immune Reaction to Placental Antigens". Clin. Exp. Immunol. 11:549-556.
- 16.- HOLLAND, D. BRETSCHER, P. and RUSSELL, A. (1984). "Immunologic and Inflammatory Responses During Pregnancy". J. Clin. Lab. Immunol. 14:177-179.

- 17.- TODER, VLADIMIR et al. (1984). "Studies of Natural Killer Cells in Pregnancy. II. The Immunoregulatory Effect of Pregnancy Substances". J. Clin. Lab. Immunol. 14:129-133.
- 18.- GIRONNET, I. and LEVRIER, M. (1985). "La Dépression Immunitaire Non Spécifique de la Grossesse". J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 14:959-964.
- 19.- TIENHOVEN, VAN A. (1968). "Reproductive Physiology of Vertebrates". Chapter 9. "Cyclic Reproductive Phenomena". W.C. Saunders Company. USA. pp. 269-296.
- 20.- FUCHS, T. et al. (1981). "In Vitro Induction of Human Suppressor T Cells by a Chorionic Gonadotropin Preparation". Journal of Reproductive Immunology. 3:75-84.
- 21.- ROLFE, B.E.; MORTON, H. and CLARKE, M. (1983). "Early Pregnancy Factor is an Immunosuppressive Contaminant of Commercial Preparations of Human Chorionic Gonadotropin". Clin. Exp. Immunol. 51:45-52.
- 22.- TEPPERMAN, JAY. (1970). Fisiología Metabólica y Endocrina. 3ª edición. Interamericana. pp. 81-100.
- 23.- CLARKE, F.M. et al. (1978). "Detection and Separation of Two Serum Factors Responsible for Depression of Lymphocyte Activity in Pregnancy". Clin. Exp. Immunol. 32:318-323.
- 24.- MORTON, HALLE; ROLFE, BARBARA and CLUNIE, G.J.A. (1977). "An Early Pregnancy Factor Detected in Human Serum by -- The Rosette Inhibition Test". The Lancet. 1:394-397.

- 25.- MORTON, HALLE; HEGH, VALERIE and CLUNIE, G.J.A. (1974). "Immunosuppression Detected in Pregnant Mice by Rosette Inhibition Test". *Nature*. 249:459-461.
- 26.- SMART, Y.C.; ROBERTS, T.K.; FRASER, I.S.; CRIPPS, A.W. and CLANCY, R.L. (1982). "Validation of the Rosette Inhibition Test for the Detection of Early Pregnancy in Women". *Fertility and Sterility*. Vol.37 No. 6 pp.779-785.
- 27.- MORTON, HALLE; TINNEBERG, A.R.; ROLFE, BARBARA; WOLF, MARIANNE and METTLER, LILO. (1982). "Rosette Inhibition Test: A multicentre Investigation of Early Pregnancy Factor in Humans". *Journal of Reproductive Immunology*. 4:251-261.
- 28.- MORTON, H.; NANCARROW, C.D.; SCARAMUZZI, R.J.; EIVSON, B.M. and CLUNIE, G.J.A. (1979). "Detection of Early Pregnancy in Sheep by the Rosette Inhibition Test". *J. Reprod. Fert.* 56:75-80.
- 29.- SMART, Y.C.; ROBERTS, T.K.; CLANCY, R.L. and CRIPPS, A.W. (1981). "Early Pregnancy Factor: Its Role in Mammalian Reproduction-Research Review". *Fertility and Sterility*. Vol. 35 No. 4 pp. 397-402.
- 30.- WILSON, SHANN; McCARTHY, ROBYN and CLARKE, FRANK. (1984). "In Search of Early Pregnancy Factor: Characterization of Active Polypeptides Isolated from Pregnant Ewes Sera". *Journal of Reproductive Immunology*. 6:253-270.
- 31.- MORTON, HALLE; ROLFE, B.E.; McNEILL, L.; CLARKE, P.; CLARKE, F.M. and CLUNIE, G.J.A. (1980). "Early Pregnancy Factor: Tissues Involved in Its Production in the Mouse". *Journal of Reproductive Immunology*. 2:73-82.

- 32.- CAVANAGH, ALICE. (1984). "Production In Vitro of Mouse Early Pregnancy Factor and Purification to Homogeneity". J. Reprod. Fert. 71:581-592.
- 33.- BACH, J.F.; DORMONT, J.; DARDENNE, M. and BALNER, H. (1969). "In Vitro Rosette Inhibition by Antihuman Antilymphocyte Serum". Transplantation. Vol. 8 No. 3 pp. 265-280.
- 34.- BRAIN, P. and GORDON, J. (1971). "Rosette Formation by Peripheral Lymphocytes". Clin. Exp. Immunol. 8:441-449.
- 35.- ROLFE, B.; CAVANAGH, A.; FORDE, C.; BASTIN, F.; CHEN, C. and MORTON, H. (1984). "Modified Rosette Inhibition Test with Mouse Lymphocytes for Detection of Early Pregnancy Factor in Human Pregnancy Serum". Journal of Immunological Methods. Vol. 70 No. 1 pp.1-11.
- 36.- HUNING, THOMAS R. (1986). "The Ligand of the Erythrocyte Receptor of T Lymphocytes: Expression on White Blood Cells and Possible Involvement in T Cell Activation". Journal of Immunology. Vol. 36 No. 6 pp. 2103-08.
- 37.- BENACERRAF, B. and UNANUE, E.R. (). Textbook of Immunology. Chapter 5. "The Cellular Basis of Immunity". Williams & Wilkins. Baltimore/London. pp. 76-98.
- 38.- BACH, JEAN FRANCOIS. (1984). Inmunología. Cap. 4 "Linfocitos B y T". 1ª edición. Limusa. México. pp. 65-99.
- 39.- HOWARD, F.D. et al (1981). "A Human T Lymphocyte Differentiation Marker Defined by Monoclonal Antibodies that Block E-Rosette Formation". Journal of Immunology. Vol. 126 No. 6 pp. 2117-2122.

- 40.- FOX, DAVID; SCHLOSSMAN, STUART and REINHERZ, E. (1986). "Regulation of the Alternative Pathway of T Cell Activation by Anti-T3 Monoclonal Antibody". Journal of Immunology. Vol. 136 No. 6 pp. 1945-1950.
- 41.- SELVARAJ, PERIASAMY et al. (1987). "Rosetting of Human T Lymphocytes with Sheep and Human Erythrocytes". Comparison of Human and Sheep Ligand Binding Using Purified E. Receptor. Journal of Immunology. Vol. 138 No. 8 pp. 2690-2695.
- 42.- TIEFENTHALER, GEORG, et al. (1987). "Serologic Cross-Reactivity of T11 Target Structure and Lymphocyte Function-Associated Antigen 3". Evidence for Structural Homology of the Sheep and Human Ligand of CD2. Journal of Immunology. Vol. 139 No. 8 pp. 2696-2701.
- 43.- ROSE and FRIEDMAN. (1980). Manual of Clinical Immunology. Chapter 26. "Methods for Enumerating Lymphocyte Populations". Second Edition. American Society for Microbiology. pp. 213-227.
- 44.- WILHEM, M. et al. (1986). "Direct Monoclonal Antibody Rosetting an Effective Methods for Weak Antigen Detection and Large Scale Separation of Human Mononuclear Cells". Journal of Immunological Methods. 90:89-96.
- 45.- WILSON, ANNE. et al. (1986). "Direct Antibody Rosette-Forming Reaction Using Monoclonal Markers of Lymphocyte Subpopulations" Journal of Immunological Methods. 92:241-249.

- 46.- HOTH, VON DER MEDEN KARL JUERGEN. (1986). "Estudio Sobre Tres Sistemas de Apareamientos sobre el Ratón de los Volcanes (Neotomodon alstoni) Silvestre en el Laboratorio". Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. PP. 7-9.
- 47.- FOSTER, H.L.; SMALL, D.J. and FOX, J.G. (1983). "The Mouse in Biomedical Research. Normative Biology, Immunology and Husbandry". Academic Press. U.S.A. Vol. 3 pp. 138-158.
- 48.- AUSTIN, C.R. and SHORT, R.V. (1982). Procesos de Reproducción en los Mamíferos. "Células Germinales y Fertilización ". La Prensa Médica Mexicana. Vol. 1 pp. 89.106.
- 49.- NALVANDOV, A.V. (1969). Fisiología de la Reproducción. Cap. 4 "Reproducción en las Hembras (Mamíferos y Aves) Editorial Acribia. España. pp. 124-155.