



5  
2 ej.  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO  
CONTRA HOSPEDERO EN RATONES  
HÍBRIDOS B6D2 Y B6C.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACION  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A :  
GABRIELA HERNÁNDEZ HOYOS

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

## RESUMEN

En este trabajo los ratones B6D2 fueron trasplantados con  $5 \times 10^7$  ó  $1 \times 10^8$  CB de B6, hembra o macho. Aproximadamente un 10% de los ratones B6 - B6D2 desarrolló una pancitopenia progresiva y una disminución importante en el peso; esto ocurrió a tiempos muy variables a partir de la fecha del trasplante de CB. En la mayoría de los casos, la pancitopenia continuó agravándose hasta que el animal murió; la causa más probable de muerte es una infección. En los casos en los que los animales se recuperaron, los valores hemáticos también se recuperan, pero muy lentamente, y, al menos hasta 70 días después del trasplante, los valores hemáticos aún no habían alcanzado los valores de los animales control no trasplantados de la misma edad. Las necropsias de los animales que desarrollaron la enfermedad de ICH presentaron isquemia en bazo, hígado y riñón, e hipoplasia del bazo. Los cortes de MO realizados el día 20 después del trasplante de células de bazo mostraron hipoplasia de la MO. El ensayo de UFC-b indicó que la MO del día 20 presenta una capacidad disminuida para generar colonias.

El resto de los animales B6 - B6D2 no presentó ni pancitopenia, ni disminución en el peso.

Los híbridos B6C recibieron dosis de trasplante de  $1 \times 10^8$  ó  $2 \times 10^8$  CB, y los híbridos CB6 recibieron dosis de  $1.6 \times 10^8$  ó  $3 \times 10^8$  CB. Ninguna de estas dosis resultó mortal para estos híbridos. Sin embargo, casi el 100% de los animales trasplantados desarrollaron linfopenia, en algunos casos eritropenia, y sólo los B6 - CB6, plaquetopenia, las cuales se detectaron de manera muy sincrónica desde

entre 7 y 19 días después del trasplante de células de bazo. En algunos casos, las citopenias coincidieron con una disminución no muy grave en el peso. Casi el 100% de los ratones afectados logró recuperarse. Las necropsias realizadas 13 y 20 días después del trasplante de células de bazo, revelaron la presencia de esplenomegalia: el bazo se encontró infiltrado con células linfoides grandes. Las necropsias realizadas 100 días después del trasplante de CB indicaron que, al menos hasta 100 días después, el bazo no ha logrado recuperarse completamente. Los cortes de MO del día 20 no mostraron alteraciones y los resultados obtenidos en el ensayo de UFC-b fueron comparables con los obtenidos de los controles positivos.

## INDICE

### Introducción.

Importancia y Definición de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero ..... pg. 1

1. El Trasplante de Médula Osea
2. La Enfermedad de Injerto contra Hospedero

Conceptos Básicos de Inmunología ..... pg. 6

1. Anticuerpos y linfocitos B
2. Complejo Principal de Histocompatibilidad
3. Linfocitos T
4. Células Asesinas Naturales
5. Macrófagos

Estudio de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero en Modelos Murinos ..... pg. 22

1. Conceptos básicos de la enfermedad de Injerto contra Hospedero.
2. Modelos experimentales murinos utilizados en el estudio de la enfermedad de Injerto contra Hospedero.
3. Características generales de la enfermedad de Injerto contra Hospedero crónica y aguda en modelos murinos.
4. Identidad de la población celular que produce la reacción de ICH.
  - 4.1 Reacción de ICH inducida a través de antígenos del CPH, Clase I y/o Clase II y uso de subpoblaciones Lyt-2<sup>+</sup> y/o L3T4<sup>+</sup>: Modelos P - F1, P - F1(r) y A - B(r).
  - 4.2 Reacción de ICH inducida a través de antígenos menores: Modelo A - B(r).
5. Actividad de las células Asesinas Naturales.
6. Modelo aferente-eferente de la reacción de ICH aguda.
7. Factores solubles en la reacción de ICH.

Estímulo Antigénico ..... pg. 37

1. Principal estímulo antigénico en la reacción de ICH.
2. Reacción de ICH inducida a través de un antígeno tejido-específico.

Destino, Proliferación y Redistribución de los Linfocitos T Trasplantados ..... pg. 39

1. Destino de los linfocitos T trasplantados.
2. Proliferación de los linfocitos T trasplantados.
3. Circulación de los linfocitos T en proliferación.
4. Fin de la reacción de ICH aguda.
5. Reconstitución con Médula Osea alógena.

<b>Objetivos .....</b>	<b>pg. 45</b>
<b>Métodos .....</b>	<b>pg. 47</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>pg. 54</b>
<b>Discusión y Conclusión .....</b>	<b>pg. 74</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>pg. 87</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>pg. 88</b>
<b>Figuras y Gráficas.</b>	

## IMPORTANCIA Y DEFINICION DE LA ENFERMEDAD DE DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO

### 1. El Trasplante de Médula Osea

El trasplante de Médula Osea (MO) constituye potencialmente la terapia principal en la cura de enfermedades tales como leucemia, anemias aplásticas e inmunodeficiencias. Si un individuo con alguna de estas enfermedades recibe un trasplante de MO, y el trasplante resulta exitoso, se pueden restablecer por completo las funciones hemopoiéticas e inmunológicas.

Identificación de un donador compatible.- El problema principal al hacer un trasplante de MO es identificar a un donador que sea compatible con el receptor. Ser compatible significa que entre el donador y el receptor no existen diferencias moleculares que puedan ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune del otro. En base a esta definición, y dado el incalculable numero de las diferentes moléculas, y sus variantes (alelos), que pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune de cada individuo, el mejor donador de MO que existe para un individuo es él mismo. Sin embargo, cuando se pretende utilizar un trasplante para substituir una MO que no es funcional o que esta invadida por tejido canceroso, el trasplante de MO autólogo no es posible. La segunda mejor opción es utilizar como donador a un hermano gemelo

idéntico, pero normalmente no se dispone de uno. Por lo tanto, en la gran mayoría de los trasplantes de MO que se efectúan, se utiliza al donador que resulte más compatible con el receptor.

Criterios en la identificación de una donador de Médula Osea.- Para identificar al donador más compatible con un receptor se utilizan ciertos criterios. El primer criterio es identificar a los donadores que compartan los mismos alelos de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) con el receptor. Las moléculas del CPH son el blanco preferido en las reacciones de rechazo de trasplante. Así es que al seleccionar al mejor donador disponible, se intenta identificar aquel que coincida con el receptor en el mayor número de determinantes del HLA (CPH en humanos) que sea posible. Por lo tanto, el resultado de los trasplantes de MO mejora a medida que se hacen mas precisos los métodos de identificación de determinantes del HLA. Sin embargo, aunque las disparidades en el CPH son los estimuladores más potentes de las reacciones de rechazo, existen otros loci de histocompatibilidad que también son capaces de producir esta reacción. Debido a esto resulta preferible usar familiares cercanos como donadores, puesto que tienen la ventaja de compartir éstos y otros antígenos (1).



## 2. La Enfermedad de Injerto contra Hospedero

Se han logrado avances importantes en el terreno de los trasplantes de MO en humanos. Estos avances van desde la identificación del CPH (1960), el uso de antibióticos, transfusiones de plaquetas e inmunosupresores, hasta los ensayos para seleccionar a las parejas de donadores y receptores compatibles para HLA, como son el cultivo mixto de linfocitos (CML), aloantisueros para tipificar HLA, y actualmente el polimorfismo de los fragmentos de restricción y el uso de oligonucleótidos. Estos dos últimos ensayos permiten identificar de manera precisa cualquier diferencia que exista entre los determinantes del HLA. Desafortunadamente, la tecnología no es el único obstáculo: no siempre se dispone de un donador adecuado, y en ocasiones, aunque se cuente con él, el sistema inmune - que nunca se imaginó que algo extraño podría resultar benéfico - no logra ser engañado. En tales casos, los pacientes que reciben un trasplante de MO tienen que contender con la posibilidad de que el injerto sea rechazado o con la enfermedad de Injerto contra Hospedero (ICH) (2).

Descripción clínica de la enfermedad de Injerto contra Hospedero en humanos. - La enfermedad de ICH puede manifestarse como uno de dos síndromes clínicos: el tipo agudo y el tipo crónico (3).

La enfermedad de ICH aguda se inicia entre 7 y 21 días después del trasplante de MO y se caracteriza por una dermatitis eritematosa,

elevación de enzimas hepatocelulares, diarrea, y un síndrome de goteo capilar.

La enfermedad de ICH crónica se inicia entre 30 y 100 días después del trasplante y normalmente es precedida por la enfermedad de ICH aguda. La forma crónica se caracteriza por una deposición incrementada de la colágena, producción de auto-anticuerpos, e inmunodeficiencia. El depósito elevado de colágena produce cambios esclerodermatosos de la piel, fibrosis pulmonar, malabsorción gastrointestinal, motilidad esofaríngea disminuida, y otros síntomas clínicos similares a los observados en pacientes con enfermedades autoinmunes, tales como una incidencia incrementada en la producción de auto-anticuerpos contra tiroides, músculo, eritrocitos, y granulocitos. En contraste con la incidencia incrementada de auto-anticuerpos, los pacientes son incapaces de producir anticuerpos protectores contra patógenos ambientales, especialmente bacterias respiratorias encapsuladas.

Ahora, se sabe que los linfocitos T son las células responsables de la enfermedad de ICH. Como medida de prevención de la enfermedad de ICH, se han intentado hacer trasplantes de MO depletada de linfocitos T: antes de ser trasplantada, la MO es tratada con anticuerpos monoclonales que reconocen linfocitos T maduros, y con complemento. Este tratamiento reduce notablemente la incidencia de la enfermedad de ICH; sin embargo, también disminuye las posibilidades de que el trasplante resulte exitoso. Se piensa que

esto se debe i) a que existen algunos componentes de rechazo residuales en el receptor, que normalmente son mantenidos bajo control por los linfocitos T reactivos del donador, ii) o a que los linfocitos T maduros secretan factores de crecimiento que son necesarios para la MO.

## CONCEPTOS BASICOS DE INMUNOLOGIA

Antes de entrar en detalles, es necesario hacer un breve repaso de los conceptos de Inmunología básica que nos pueden ayudar a entender el fenómeno de la reacción de ICH.

El sistema inmune es un sistema biológico de vigilancia y ataque que protege y defiende a cada individuo contra la invasión de sustancias, microorganismos y tejidos no propios, o propios pero modificados. El sistema inmune se puede dividir en dos componentes principales: el humoral y el celular. Del componente humoral sólo se hará un repaso de los anticuerpos o inmunoglobulinas y las células que los producen, y del componente celular sólo se hará un repaso de los linfocitos T, los macrófagos y las células Asesinas Naturales, debido a que éstos son los elementos principalmente involucrados en la enfermedad de ICH.

### 1. Anticuerpos y Linfocitos B

**Anticuerpos.-** Los anticuerpos son moléculas formadas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos monómeros idénticos de una cadena pesada, y dos monómeros idénticos de una cadena ligera. Cada monómero está formado a su vez, por dos regiones: una región constante y una región variable. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras son diferentes en cada rearrreglo de inmunoglobulina (ver mas adelante), y son las responsables de la unión del anticuerpo al antígeno (4). Un antígeno puede definirse como cualquier sustancia (carbohidratos, fosfolípidos, ácidos

nucléicos y proteínas) que puede suscitar una respuesta inmune mediada por anticuerpos. El anticuerpo se une sólo a una porción específica del antígeno - epítopo.

Ontogenia de los linfocitos B.- Las células responsables de la producción de anticuerpos son los linfocitos B. Los linfocitos B, al igual que la mayoría de los componentes celulares de la sangre, provienen de las células madre de la MO. Dentro de la MO, los precursores de los linfocitos B pasan por varias etapas de maduración hasta diferenciarse a linfocitos B maduros, los que son liberados a la circulación.

Durante las etapas de maduración, el material genético de los linfocitos B sufre rearrreglos. Todas las células de un organismo cuentan con el material genético que codifica para varios juegos de segmentos (llamados V, D y J) de las regiones variables y para diferentes regiones constantes (llamadas M, D, G, E y A) de la cadena pesada; y para varios juegos de segmentos (llamados V y J) de las regiones variables y para diferentes regiones constantes ( $\kappa$  y  $\lambda$ ) de la cadena ligera (5). Pero sólo en los linfocitos B se llevan a cabo rearrreglos de este material genético, para generar una impresionante diversidad de anticuerpos. Cada linfocito B, sólo rearregla uno de sus dos alelos para cadena pesada, y uno de sus dos alelos para cadena ligera - exclusión alélica - de manera que todas sus inmunoglobulinas son idénticas (6).

Activación de los linfocitos B.- Inicialmente, un linfocito B expresa en su membrana inmunoglobulinas de isotipo M o D (IgM o IgD). Cuando un linfocito B reconoce un antígeno a través de sus inmunoglobulinas en la membrana, procesa y presenta fragmentos de este antígeno a través de sus moléculas de Clase II (ver sección 2. Complejo Principal de Histocompatibilidad). Entonces puede recibir las señales de ayuda necesarias (7: activación), para que éste prolifere y su progenie madure. En el proceso de maduración, el material genético sufre un nuevo rearrreglo que consiste en cambiar el isotipo de las inmunoglobulinas a G, E o A (IgG, IgE o IgA) (8,9). Posteriormente, los linfocitos siguen uno de dos caminos: la mayoría comienza a expresar esta nueva inmunoglobulina (sin cambio de especificidad) en la membrana, y a excretarla - célula plasmática; el resto de los linfocitos se diferencia a células B de memoria (10). Las células plasmáticas tienen un tiempo de vida media muy corto (semanas), mientras que las células de memoria tienen una vida media de años (11).

Respuestas primaria y secundaria.- Cuando una población de linfocitos B es estimulada por un determinado antígeno por primera vez, sólo los linfocitos que reconocen el antígeno son inducidos a producir anticuerpos - respuesta primaria. Cuando el sistema inmune se enfrenta a ese mismo antígeno por segunda ocasión, las células de memoria son activadas - respuesta secundaria. La respuesta secundaria es más rápida y presenta una mayor afinidad. El aumento de afinidad por un antígeno se debe a dos procesos: 1) las regiones

variables de los genes de inmunoglobulinas de las células B de memoria sufren mutaciones a una frecuencia mas alta de lo normal (12: hipermutación somática), y 2) las clonas de linfocitos B que han adquirido mayor afinidad por determinado antígeno, son inducidas a expandirse. Estos dos procesos pueden ocurrir cíclicamente para generar clonas de linfocitos B de alta afinidad.

**Tolerancia.**- Para que los linfocitos B puedan montar una respuesta eficiente de anticuerpos, estos necesitan presentar antígeno a través de sus moléculas de Clase II, y recibir señales de ayuda de linfocitos T específicos. Por lo tanto, la falta de autoanticuerpos podría explicarse en base a una delección de linfocitos T autorreactivos. Como sabemos, esta delección ocurre en el timo (ver sección 3. Ontogenia de los linfocitos T). Sin embargo, la delección de linfocitos T autorreactivos no es suficiente para que las clonas autorreactivas de linfocitos B no sean activadas. Hay experimentos que demuestran que la unión no covalente de un antígeno autólogo a uno no autólogo, o la existencia de reactividad cruzada (epitopes iguales) entre antígenos autólogos y no autólogos, puede resultar en una activación de linfocitos B autorreactivos. Esto se debe probablemente a que la activación de los linfocitos B autorreactivos es promovida por los linfocitos T específicos para antígenos no autólogos. Así es que deben existir mecanismos que generan tolerancia en el repertorio de los linfocitos B.

El repertorio de las inmunoglobulinas de los linfocitos B se genera en dos fases: en la primera los linfocitos B reorganizan sus genes de inmunoglobulinas, y en la segunda, las regiones variables de los genes de inmunoglobulinas sufren procesos de hipermutación. La hipermutación puede generar inmunoglobulinas con afinidades diferentes a las que originalmente presentaban.

Por lo tanto se piensa que existen dos mecanismos para inducir tolerancia: 1) un mecanismo que delecta células B inmaduras con receptores de alta afinidad, en la MO, y 2) un mecanismo que produce falta de funcionalidad (anergia) en los linfocitos B periféricos a través de una reducción de expresión de inmunoglobulinas en la superficie (13).

## 2. Complejo Principal de Histocompatibilidad

Descripción de las moléculas Clase I y Clase II.- El CPH es una región de genes altamente polimórficos. Sus productos se expresan en una gran variedad de tejidos, y son los principales responsables en el rechazo de tejidos. En humanos el CPH se conoce como HLA, y en el ratón como H-2 (14).

Existen tres tipos diferentes de productos del CPH llamados Clase I, Clase II y Clase III. Las moléculas de Clase III son componentes de la vía del complemento. Las moléculas de Clase I y Clase II son glicoproteínas membranales, que unen y transportan a la superficie de la célula fragmentos de proteínas - péptidos. Las moléculas de



Clase I están formadas por una cadena  $\alpha$  y una cadena de  $\beta$ -2 microglobulina. Las moléculas de Clase II están formadas por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ . Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de Clase II y la  $\alpha$  de Clase I presentan alelos polimórficos, mientras que la  $\beta$ -2 microglobulina, no presenta alelos polimórficos.

El CPH puede dividirse en regiones. Cada región contiene varios genes estructurales de Clase I, Clase II o Clase III. En humanos existen tres regiones de moléculas de Clase I: HLA-A, HLA-B y HLA-C; y tres regiones de moléculas de Clase II: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. En el ratón existen tres regiones de moléculas de Clase I: H-2K, H-2D y H-2L; y dos regiones de moléculas de Clase II: I-A e I-E. Las moléculas de Clase I y Clase II están involucradas en la presentación antígeno. En el ratón existen además las regiones Qa y Tla. Estas son moléculas semejantes a las de Clase I, sin embargo su función aún se desconoce; son menos polimórficas que las moléculas H-2K y H-2D, y presentan una distribución tisular más restringida.

Presentación de antígeno.- Tanto las moléculas de Clase I como las de Clase II presentan en su estructura tridimensional una hendidura para unir de manera no covalente péptidos de 8 a 17 aminoácidos. Cada molécula de Clase I y de Clase II puede unir una variedad de péptidos diferentes sin mucha especificidad, aunque con ciertas restricciones (15,16). Estos péptidos son productos de degradación parcial de proteínas sintetizadas dentro de la célula, o de

proteínas introducidas a la célula por fagocitosis o de manera específica a través de anticuerpos. La degradación parcial o procesamiento de antígenos propios y no propios se realiza a través de dos vías diferentes dentro de la célula, aunque físicamente no separadas del todo (17). Estas vías celulares determinan que los antígenos sintetizados dentro de la célula sean generalmente presentados por moléculas de Clase I, y que los introducidos sean presentados por moléculas de Clase II. Aparentemente, todos los tipos celulares expresan moléculas de Clase I en su superficie, mientras que solamente las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas y epiteliales del timo, macrófagos y linfocitos B, expresan moléculas de Clase II.

El papel central de las moléculas del CPH en la respuesta inmune radica en que los linfocitos T no reconocen antígenos en solución, sino que reconocen exclusivamente péptidos unidos a las moléculas de Clase I o Clase II. Como regla general, los linfocitos CD8<sup>+</sup> son estimulados por los péptidos presentados en el contexto de moléculas de Clase I, o por diferencias alélicas en las mismas moléculas de Clase I. En cambio, los linfocitos CD4<sup>+</sup> son estimulados por los péptidos presentados en el contexto de moléculas de Clase II, o por diferencias alélicas en las mismas moléculas de Clase II. Los receptores CD8 y CD4 se unen a las moléculas del CPH en regiones que se encuentran muy conservadas entre los diferentes alelos de Clase I y entre los de Clase II de la misma especie, respectivamente (ver Linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>).

### 3. Linfocitos T

Poblaciones de linfocitos T.- Los linfocitos T maduros expresan en su superficie un receptor conocido como Receptor de Célula T (RCT), y se dividen en dos poblaciones: los linfocitos con RCT  $\alpha\beta$ , y los linfocitos con RCT  $\gamma\delta$  (18). Los RCT  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  son heterodímeros formados por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ , o una cadena  $\gamma$  y una  $\delta$ , respectivamente. Estas cadenas están emparentadas con las inmunoglobulinas (19: superfamilia de las Inmunoglobulinas), y al igual que ellas, se forman por procesos de rearreglo de segmentos de DNA que codifican para regiones variables y constantes (V,D,J y C para  $\beta$  y  $\delta$ , y V,J y C para  $\alpha$  y  $\gamma$ ) (20). El RCT siempre se encuentra asociado de manera no covalente a un complejo de proteínas llamado CD3 (21). Los linfocitos con RCT  $\alpha\beta$  son los más abundantes y pueden dividirse a su vez en dos subpoblaciones: en el humano hay linfocitos que expresan en su superficie correceptor CD4 (linfocitos CD4<sup>+</sup>) y linfocitos que expresan en su superficie correceptor CD8 (linfocitos CD8<sup>+</sup>); en el ratón, linfocitos L3T4<sup>+</sup> y Lyt-2<sup>+</sup> respectivamente.

Linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos.- Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son en su mayoría linfocitos citotóxicos, cuya principal función efectora es la de lisar células blanco que portan antígenos "extraños" en su superficie (22). El correceptor CD8 y el RCT del linfocito T forman un complejo que reconoce fragmentos de péptidos unidos a moléculas de Clase I (ver CPH): la molécula CD8 se une a regiones no

polimórficas de las moléculas Clase I, mientras que el receptor  $\alpha\beta$  se une a regiones polimórficas de estas moléculas y al péptido (23). Después de unirse a su blanco, el linfocito T  $CD8^+$  secreta gránulos que contienen principalmente proteínas formadoras de poro (24: perforina) y/o secreta una toxina celular. Las proteínas formadoras de poro polimerizan en la membrana plasmática de la célula blanco, formando poros. Los poros actúan como canales permeables a iones. El paso libre de iones ocasiona que la célula se hinche y sea lisada. La toxina celular, en cambio, activa enzimas de la célula blanco que fragmentan el DNA nuclear. El linfocito citotóxico no resulta dañado en ninguno de los dos casos (25). Después de la secreción, el linfocito T es liberado.

Linfocitos T  $CD8^+$  supresores. - Los linfocitos T supresores tienen la función de inhibir la fase de activación de la respuesta inmune. El principal argumento que existe para postular su existencia, es el hecho de que en ratones pueda inducirse una falta de respuesta específica a un antígeno, y que esta falta de respuesta pueda ser transferida, con la misma especificidad a un animal normal, a través del trasplante de linfocitos Thy-1<sup>+</sup>. En humanos ha resultado difícil probar que la supresión es específica. En general, los linfocitos con actividad supresora son  $CD8^+$ . No se sabe si están restringidos por moléculas del CPH. Debido a que los efectos inhibitorios están mediados por proteínas secretadas, y a que estas proteínas deben actuar con especificidad, se ha postulado que los factores de supresión son una versión soluble del TCR  $\alpha\beta$  (26).

Linfocitos CD4<sup>+</sup>. - Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son, como regla general, linfocitos de ayuda, cuya principal función efectora es la secreción de citocinas (como IL-2, IL-4, IL-5, TNF, LT, IFN $\tau$ , etc.). Estas citocinas actúan sobre los mismos linfocitos T CD4<sup>+</sup> y sobre otras células, incluyendo linfocitos B, macrófagos, otros linfocitos T y leucocitos. El correceptor CD4 y el RCT del linfocito CD4<sup>+</sup> forman un complejo que reconoce fragmentos de péptidos unidos a moléculas de Clase II (ver CPH): se asume que la molécula CD4 se une a regiones no polimórficas de las moléculas Clase II, y que el receptor  $\alpha\beta$  se une a regiones polimórficas de estas moléculas y al péptido (23). Después de unirse a su blanco, el linfocito T CD4<sup>+</sup> libera citocinas que ejercen efectos que promueven y regulan las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y las mediadas por células, y los procesos inflamatorios (22).

Activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. - Los segmentos V,D,J o C usados en los rearreglos de los RCT  $\alpha\beta$  no determinan la restricción del linfocito T por moléculas de Clase I o Clase II. Esta restricción está determinada por las moléculas CDS y CD4, respectivamente. Para ser activados, tanto los linfocitos CD4<sup>+</sup> como los CD8<sup>+</sup> requieren ser estimulados a través de la unión de sus RCT's a moléculas del CPH más péptidos, y a través de citocinas liberadas por los linfocitos CD4<sup>+</sup> (principalmente IL-2 e IL-4). Como resultado de la activación, los linfocitos se diferencian para llevar a cabo funciones efectoras citotóxicas o de ayuda, y proliferan. Algunos de los linfocitos progenie se diferencian a

linfocitos T de memoria. La cooperación de los linfocitos CD4+ en la activación de los linfocitos CD8+ implica que para que exista una respuesta citotóxica fuerte, ambas poblaciones deben ser estimuladas por antígenos y las moléculas del CPH correspondientes.

Linfocitos T  $\alpha\beta$ - La mayoría de los linfocitos con receptor  $\alpha\beta$  expresan correceptor CD3, pero no expresan CD4 ni CD8. Los linfocitos  $\alpha\beta$  predominan en tejidos epiteliales, como en la epidermis, en la mucosa intestinal, en los pulmones y otros. Se ha demostrado que los linfocitos  $\alpha\beta$  de diferentes órganos periféricos muestran uso preferencial de diferentes regiones variables  $\alpha$  y  $\beta$ . Se desconoce su función, pero debido a su localización se piensa que pueden estar involucrados en un sistema inmune especial para epitelios. Se ha demostrado que los linfocitos  $\alpha\beta$  pueden presentar actividad citotóxica específica e inespecífica. Se desconoce si el reconocimiento de antígenos está restringido por moléculas no polimórficas relacionadas con el CPH (27).

Ontogenia de los linfocitos T- Los precursores de todos los linfocitos T provienen de las células madre de la MO. Dentro de la MO, las células madre se diferencian para dar lugar a estos precursores. Los precursores de los linfocitos T no expresan RCT ni moléculas accesorias como CD3, CD4 y CD8. Posteriormente, los precursores migran al timo, donde se les conoce como timocitos. En el timo pasan por varias etapas de maduración (28). Inicialmente los timocitos rearreglan los genes del RCT. Los primeros loci en

linfocitos T de memoria. La cooperación de los linfocitos CD4+  $\epsilon\delta$  en la activación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> implica que para que exista una respuesta citotóxica fuerte, ambas poblaciones deben ser estimuladas por antígenos y las moléculas del CPH correspondientes.

Linfocitos T  $\epsilon\delta$ . - La mayoría de los linfocitos con receptor  $\epsilon\delta$  expresan correceptor CD3, pero no expresan CD4 ni CD8. Los linfocitos  $\epsilon\delta$  predominan en tejidos epiteliales, como en la epidermis, en la mucosa intestinal, en los pulmones y otros. Se ha demostrado que los linfocitos  $\epsilon\delta$  de diferentes órganos periféricos muestran uso preferencial de diferentes regiones variables  $\epsilon$  y  $\delta$ . Se desconoce su función, pero debido a su localización se piensa que pueden estar involucrados en un sistema inmune especial para epitelios. Se ha demostrado que los linfocitos  $\epsilon\delta$  pueden presentar actividad citotóxica específica e inespecífica. Se desconoce si el reconocimiento de antígenos está restringido por moléculas no polimórficas relacionadas con el CPH (27).

Ontogenia de los linfocitos T. - Los precursores de todos los linfocitos T provienen de las células madre de la MO. Dentro de la MO, las células madre se diferencian para dar lugar a estos precursores. Los precursores de los linfocitos T no expresan RCT ni moléculas accesorias como CD3, CD4 y CD8. Posteriormente, los precursores migran al timo, donde se les conoce como timocitos. En el timo pasan por varias etapas de maduración (28). Inicialmente los timocitos reorganizan los genes del RCT. Los primeros loci en

rearrreglarse son  $\beta$  y  $\tau$ . Si el rearrreglo de  $\beta$  resulta productivo, antes que el locus  $\tau$ , el timocito recibe una señal para rearrreglar los segmentos de  $\kappa$ . Si el primer rearrreglo en resultar productivo es el de la cadena  $\tau$ , entonces la célula rearrregla los segmentos de  $\delta$ . Los linfocitos  $\tau\delta$  expresan CD3 y son los primeros linfocitos funcionales en producirse en el timo.

Por otra parte, cada linfocito T  $\alpha\beta$  expresa generalmente un único rearrreglo de RCT, aunque hay datos que indican que pueden existir dos rearrreglos de la cadena  $\kappa$  dentro de una misma célula. Esto se debe a que un rearrreglo productivo de la cadena  $\beta$ , inhibe el rearrreglo del otro alelo  $\beta$ , mientras que un rearrreglo productivo de  $\kappa$  no parecer inhibir completamente el rearrreglo del otro alelo  $\kappa$ . Los timocitos que rearrreglan sus segmentos  $\alpha\beta$ , se convierten en dobles positivos:  $CD4^+/CD8^+$ . Los timocitos  $CD4^+/CD8^+$  pasan por procesos de selección negativa y positiva dentro del timo (29, 30, 31). Las células del timo (células dendríticas, epiteliales y macrófagos) expresan moléculas de Clase I y de Clase II en su superficie. Los timocitos  $CD4^+/CD8^+$  son seleccionados en base a su afinidad por éstas moléculas y los péptidos unidos a ellas: los timocitos con alta afinidad por cualquiera de estas moléculas son deletados, mientras que los timocitos con una afinidad media son seleccionados positivamente para seguir su proceso de diferenciación hacia linfocitos  $CD4^+$  o  $CD8^+$ ; los linfocitos sin afinidad también mueran. Finalmente, los linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  y los  $\tau\delta$  son liberados a la circulación. No está claro si existe un proceso de selección para los linfocitos  $\tau\delta$ , aunque hay datos que indican la



existencia de un proceso de delección de clonas autorreactivas de linfocitos  $\tau\delta$  en el timo (32).

Tolerancia.- Los procesos de selección determinan el repertorio de linfocitos T existentes dentro de un organismo, y aseguran, por una parte, que no existan clonas autorreactivas (tolerancia), y por otra, que existan linfocitos que puedan reconocer péptidos no propios unidos a sus propias moléculas del CPH, es decir, en el contexto de sus propio CPH. Además de los procesos de selección en el timo, existen otros mecanismos para establecer tolerancia a antígenos específicos de alguno tejido, que no se encuentran presentes en el timo (33: tolerancia periférica).

#### 4. Células Asesinas Naturales

Descripción.- Además de los linfocitos B y T, existe un tercer tipo de linfocitos conocido como células asesinas naturales (AN). Las AN's provienen de la MO. Su maduración no depende del timo. Al microscopio tienen la apariencia de grandes linfocitos granulares. Se identifican principalmente por el marcador de membrana HNK-1 (asialo GM-1 en ratón) que comparten con los linfocitos citotóxicos. Las AN's ejercen actividad citotóxica sobre sus blancos (34). Son capaces de lizar células tumorales o células infectadas por virus. El reconocimiento de sus células blanco no está restringido por moléculas del CPH, ni es específico por

antígenos. Las AN's tampoco rearreglan sus genes de RCT o de Ig. Expresan un receptor de baja afinidad para la porción Fc de la IgG. Gracias a este receptor, pueden lisar específicamente células cubiertas con moléculas de IgG (citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpos).

Reconocimiento de células blancas.- En general, sólo las células que no expresan en su superficie moléculas de Clase I del CPH, o que las expresan a una baja densidad, son sensibles a lisis por AN's. Las células que expresan moléculas de Clase I en su superficie, o que son inducidas a expresarlas, no son sensibles a lisis por AN's. La lisis es específica puesto que en una población mixta de células blanco que expresan y que no expresan moléculas de Clase I, sólo las células que no expresan Clase I son lisadas. Se han sugerido dos posibles mecanismos para explicar como las AN's reconocen a sus blancos (35): a) La expresión elevada de moléculas de Clase I regula negativamente otras proteínas de membrana, las cuales son responsables de la especificidad de las AN's por células que no expresan moléculas de Clase I; o b) Después de que las AN's se han unido a su blanco, las moléculas de Clase I de la célula blanco dan un señal de inhibición a las AN's. El mecanismo de lisis celular ejercido por las AN's es similar al de las células T citotóxicas. Las AN's pueden diferenciarse a células asesinas activadas por linfocinas (LAK), si son tratadas con altas concentraciones de

IL-2. Estas últimas presentan una actividad citotóxica aumentada. El papel de las AN's en los procesos inmunes no está claro.

### 5. Macrófagos

Ontogenia de los macrófagos.- Los macrófagos son células especializadas en fagocitar microbios, macromoléculas, y tejido muerto o dañado. Los macrófagos se originan en la MO (36). Dentro de la MO adquieren la capacidad de fagocitar, y la expresión de receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas, y del complemento. Después de abandonar la MO, circulan en la sangre donde se les conoce como monocitos. Finalmente, se alojan en diversos tejidos.

Función de los macrófagos.- Dependiendo del tejido en el que se alojen, los macrófagos pueden presentar una diversidad de formas y funciones. En los tejidos, los macrófagos pueden diferenciarse aún mas si son estimulados por la presencia de microorganismos y por citocinas (37). Las citocinas no sólo activan a los macrófagos alojados en el tejido, sino que también atraen a otros macrófagos de la sangre. Una de las principales citocinas que activa macrófagos es el IFN- $\gamma$ . Esta citocina incrementa los procesos de endocitosis y fagocitosis de los macrófagos, la expresión de receptores de la porción Fc de la IgG, la expresión de moléculas de Clase II en la superficie, y la secreción de otras citocinas, entre

otros efectos. Así es que los macrófagos activados presentan antígenos derivados de bacterias y parásitos a través de moléculas de Clase II, y fagocitan con mayor eficiencia bacterias opsonizadas (cubiertas por IgG). Las citocinas secretadas funcionan como señales de reclutamiento de otras células inflamatorias, causan efectos sistémicos como la fiebre, y funcionan como factores de crecimiento para los fibroblastos y el endotelio vascular que promueven la reparación del tejido dañado.

Los macrófagos son las principales células efectoras en los procesos de inflamación como la Hipersensibilidad de Tipo Retardado. Aunque no tienen receptores que les permitan discriminar entre tejido autólogo y no autólogo, los macrófagos funcionan como células efectoras en reacciones inmunes específicas porque son activados por factores solubles que secretan los linfocitos T ( $CD4^+$  principalmente), sólo cuando éstos son activados específicamente.

**ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HOSPEDERO  
EN MODELOS MURINOS**

**1. Conceptos Básicos de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero**

El injerto de MO contiene tanto células linfoides madre como células T maduras. Las células T maduras son previamente seleccionadas positiva y negativamente dentro de cada individuo para tolerar lo propio, y rechazar lo no propio. Al hacer un trasplante de tejido alogénico (entre dos individuos genéticamente distintos, pero de la misma especie) a un receptor sano, el tejido trasplantado es rechazado por el sistema inmune del receptor. Pero si el receptor del trasplante alogénico está incapacitado para montar una respuesta inmune, el tejido trasplantado no puede ser rechazado. Entonces, los linfocitos T provenientes del tejido trasplantado pueden reaccionar ante las diferencias moleculares del receptor, y montar una respuesta inmune en contra de él. El componente inmunológico de esta reacción se conoce como reacción de ICH, y el resultado patológico es la enfermedad de ICH.

Los requisitos para que se presente la enfermedad de ICH son: 1) que el tejido trasplantado contenga linfocitos T maduros, 2) que existan

diferencias antigénicas entre el donador y el receptor, y 3) que el receptor del trasplante no pueda montar una respuesta inmune en contra del tejido del donador.

Existen varias razones por las que el receptor puede estar incapacitado para rechazar el injerto. Entre éstas están: inmunosupresión por irradiación o terapia con drogas (como en el trasplante de MO), inmadurez del sistema inmune (como en el caso de animales cuyo sistema inmune aun no se haya desarrollado plenamente, por lo que son más susceptibles a reacciones de ICH que los adultos), e incapacidad genética (tal como la de animales híbridos F1 para rechazar injertos de sus padres). En humanos, la enfermedad de ICH normalmente surge después de un trasplante de MO alogénica, pero también se ha reportado en pacientes severamente inmunosuprimidos que recibieron productos sanguíneos no irradiados, y en los casos de transfusiones intrauterinas de madre a hijo.

## **2. Modelos Experimentales Murinos Utilizados en el Estudio de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero.**

Para estudiar enfermedades humanas se ha hecho indispensable el uso de modelos animales. En particular, el uso de modelos murinos para estudiar enfermedades relacionadas con el sistema inmune ha resultado muy productivo por la gran variedad de cepas congénicas para H-2 con que se cuenta. Gracias al uso de estos modelos en el estudio de la enfermedad de ICH se han podido descifrar muchas de las incógnitas que existen

acerca del proceso de esta enfermedad. Entender como funciona no solamente pretende algún día optimizar los trasplantes de MO, sino que también pretende profundizar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento del sistema inmune.

En general, se han utilizado tres tipos de modelos murinos para el estudio de la enfermedad de ICH:

- 1) el trasplante de ratones irradiados con células linfoides provenientes de una cepa alogénica - A - B(r),
- 2) el trasplante de híbridos F1 irradiados con células linfoides provenientes de uno de los padres - P - F1(r):  
A - (A x B) F1(r), y
- 3) el trasplante de híbridos F1 intactos con células linfoides provenientes de uno de los padres - P - F1: A - (A x B)F1.

La elección de las cepas a utilizar es importante porque se pueda delimitar la diferencia antigénica entre receptor y donador a un número limitado y conocido de antígenos. Por otra parte, cada modelo permite hacer observaciones diferentes. Por ejemplo, la combinación A - B(r) requiere que el receptor sea irradiado para evitar que este rechace al inóculo del donador; éste es el modelo que más se asemeja a la situación humana. En cambio, la combinación P - F1 no requiere que el receptor sea irradiado puesto que este no puede reconocer como alogénicas las células de ninguno de los padres (excepto en los casos en los que se presenta el fenómeno de resistencia híbrida (38)). Esto ofrece la

posibilidad de utilizar como receptores, animales con un sistema inmune y una MO intactos para su estudio.

### 3. Características Generales de la Enfermedad de Injerto contra Hospedero Crónica y Aguda en Modelos Murinos.

En los modelos murinos, al igual que en humanos, existen dos tipos de enfermedad de ICH: crónico y agudo.

Enfermedad de ICH crónica.- En general, la forma crónica se puede inducir si se trasplantan híbridos F1 jóvenes con tejido linfóide de uno de los padres y existen diferencias entre las moléculas de Clase II del donador y del receptor. Los animales desarrollan un estado que se caracteriza por la hiperestimulación policlonal de células B provenientes del receptor, acompañada de la producción de autoanticuerpos, incluyendo anticuerpos anti-eritrocitos, antinucleares y anti-DNA (39).

Las características de la reacción de ICH crónica son muy similares a las que desarrollan de manera espontánea modelos murinos de enfermedades autoinmunes, como los ratones NZB (New Zealand Black) y sus híbridos F1, los que dependiendo de la combinación de F1 que se utilice, pueden presentar anemia hemolítica autoinmune o glomerulonefritis del lupus, que son el resultado de lesiones por autoanticuerpos. En la enfermedad de ICH crónica también se pueden presentar esplenomegalia y lesiones en epitelios.



Enfermedad de ICH aguda. - La enfermedad ICH aguda se presenta cuando existen diferencias entre las moléculas de Clase I y II del MHC. En este caso los animales desarrollan un estado de supresión de células B (40) y de células T (41-43), y anemia. Se presenta atrofia del tejido linfoide. El bazo presenta aplasia, indicativo de fallas hemopoiéticas. Los animales muestran síntomas de cansancio, falta de apetito, diarrea, pelo erizado, posición encorvada y pérdida notable de peso.

#### 4. Identidad de la Población Celular que Produce la Reacción de Injerto contra Hospedero.

Se han hecho estudios encaminados a identificar cuál es la población de linfocitos T que desencadenan la reacción de ICH. Los estudios se han enfocado principalmente a determinar el efecto de las subpoblaciones de linfocitos T Lyt-2<sup>+</sup> y L3T4<sup>+</sup>.

Dada la relación que existe entre las moléculas de Clase I y de Clase II y los linfocitos Lyt-2<sup>+</sup> y los L3T4<sup>+</sup>, se ha hecho uso de diferentes combinaciones de cepas congénicas para diferentes regiones del H-2, y otras regiones que corresponden a antígenos menores, para determinar cuáles son los antígenos involucrados en la reacción de ICH.

A continuación se presenta un resumen de los datos obtenidos en relación a este punto. Cabe mencionar que no existe un criterio estandar para determinar qué es una enfermedad de ICH crónica y qué es una aguda, y diferentes grupos de trabajo utilizan parámetros diferentes. La

distinción entre enfermedad de ICH crónica y aguda es importante porque se trata de dos procesos distintos. Por otra parte, los resultados experimentales no sólo dependen del grado de histocompatibilidad entre el donador y el receptor, y del modelo de inducción de la enfermedad de ICH utilizados. Existen múltiples factores que modifican el proceso de la enfermedad, tales como la edad de los donadores y receptores, el órgano del cual se extraen los linfocitos T (bazo, MO, ganglios linfáticos, conducto torácico, etc.), la dosis de trasplante de linfocitos T, la cantidad de radiación recibida por el receptor, las condiciones de esterilidad del receptor (3), etc. Debido a esto la comparación e interpretación de los datos en conjunto para desarrollar un modelo coherente de ICH se dificulta enormemente.

4.1 Reacción de ICH inducida a través de antígenos del CPH,  
Clase I y/o Clase II y uso de subpoblaciones Lyt-2<sup>+</sup> y/o  
L3T4<sup>+</sup>: Modelos P - F1, P - F1(r) y A - B(r).

Modelo P - F1. - Se han realizado experimentos con el modelo P - F1 encaminados a identificar: i) las subpoblaciones de linfocitos, y ii) las mínimas diferencias en H-2 entre el F1 y el padre, que son necesarias para inducir supresión inmune asociada a la enfermedad de ICH. Para el trasplante se utilizaron linfocitos Lyt-2 ó L3T4 purificados de células de bazo del donador. La supresión inmune se determinó en función de la incapacidad de los linfocitos del ratón F1 trasplantado (P - F1) para generar una respuesta en un ensayo de citotoxicidad celular in vitro (ensayo de LTC). En los ensayos de LTC se

utilizaron como células efectoras: células de bazo de los ratones F1 trasplantados (P - F1); y como células blanco: células de bazo de ratones singénicos (F1) modificadas con trinitrofenil (ensayo de LTC anti-Sin.TNP), o células de bazo de ratones alogénicos (ensayo de LTC anti-Alo). Se utilizaron cepas con mutaciones espontáneas puntuales en H-2. De estos estudios se obtienen las siguientes conclusiones:

.Clase I y Lyt-2; Clase II y L3T4.- Para producir una reacción de ICH a través del trasplante de linfocitos Lyt-2<sup>+</sup> se requiere la existencia de diferencias en las moléculas de Clase I. En cambio, para producir la reacción de ICH a través del trasplante de linfocitos L3T4<sup>+</sup> se requieren diferencias en las moléculas de Clase II (43).

.ICH agudo: Clase I y II, & Lyt-2 y L3T4.- Para que se produzca la enfermedad de ICH de tipo agudo deben existir diferencias en las moléculas de Clase I y Clase II entre el padre y el híbrido F1, deben trasplantarse ambas subpoblaciones de linfocitos T (Lyt-2<sup>+</sup> y L3T4<sup>+</sup>), y éstas deben ser funcionales (no irradiadas) (41, 43). Es decir, ambas subpoblaciones de linfocitos deben reaccionar en contra de sus correspondientes moléculas del CPH. Esto produce una supresión de las respuestas LTC anti-Sin.TNP y anti-Alo.

.ICH crónico: Clase I o II / Lyt-2 o L3T4.- Por otra parte, la inyección de una u otra subpoblación de linfocitos, o las combinaciones P - F1 que resulten en la reacción en contra sólo de moléculas de Clase I o de Clase II, pueden o no producir supresión únicamente de la respuesta LTC

anti-Sin.TNP (43). En algunos casos sólo el reconocimiento de determinantes alogénicos I-A (Clase II) del receptor F1 induce supresión de las respuestas LTC anti-Sin.TNP (42). Aparentemente, este estado de supresión corresponde a una enfermedad de ICH de tipo crónico.

En la reacción de ICH aguda, la supresión de toda respuesta LTC se puede explicar como una leucopenia en el receptor F1. Pero en la reacción de ICH crónica, la supresión específica y únicamente de la respuesta LTC anti-Sin.TNP podría tener alguna relación con los fenómenos de inducción de tolerancia periférica en la población de linfocitos T del receptor.

La mayoría de las moléculas del CPH presentes en la superficie de la membrana celular deben estar ocupadas por péptidos. Así que es posible que el reconocimiento de otros productos de la región

H-2, además de la mínima indispensable, y el reconocimiento de péptidos unidos a estas moléculas contribuyan de alguna manera al nivel de la supresión o a la gravedad de la enfermedad de ICH, por ejemplo, disminuyendo el número de células parentales necesarias para inducir la supresión, o el tiempo requerido para la inducción y la recuperación de la misma.

Modelos P - F1(r) y A - B(r).- Algunos de los resultados obtenidos con los modelos P - F1(r) y A - B(r) coinciden con los obtenidos de los experimentos realizados en el modelo P - F1 (44, 45). Una diferencia importante es que en esta serie de experimentos los receptores fueron irradiados y siempre se trasplantó la población de linfocitos indicada,

más células de MO depletadas de linfocitos, ambas provenientes de la cepa donadora (el trasplante de MO y linfocitos singénicos produce un retraso en el desarrollo de una enfermedad de ICH). En este caso se utilizó el porcentaje de mortandad y el tiempo medio de sobrevida (TMS) como parámetros de la enfermedad de ICH:

.Clase I y Clase II & Lyt-2 y L3T4.- Las combinaciones de híbridos P1 con diferencias en todo el H-2 (Clase I y II) requieren el trasplante de ambas subpoblaciones de linfocitos para generar una enfermedad aguda (TMS 20 días).

.Clase I y Clase II & Lyt-2 o L3T4.- Cuando existen diferencias en todo el H-2, y dependiendo de la combinación de cepas utilizada, la subpoblación celular Lyt-2<sup>+</sup> ó la L3T4<sup>+</sup> trasplantada de forma independiente puede mostrar mayor eficiencia que la otra subpoblación para producir enfermedad de ICH crónica (TMS 40 días) inclusive llegando a producir una enfermedad de tipo agudo (TMS 15 días).

.Clase I y Lyt-2.- Cuando sólo existen diferencias en las moléculas de Clase I, la población Lyt-2<sup>+</sup> es indispensable y suficiente para producir una enfermedad de tipo crónico (TMS 35 días) independientemente de la dosis de radiación, mientras que la población L3T4<sup>++</sup> por si sola no produce ningún efecto. Sin embargo, si se trasplantan juntas: 1) una dosis baja de la subpoblación L3T4<sup>+</sup> amplifica el efecto de la subpoblación Lyt-2<sup>+</sup>, hasta producir una enfermedad aguda (TMS 16 días). Este efecto amplificador podría deberse a la IL-2 secretada por la

subpoblación L3T4<sup>+</sup>; esto se deduce del hecho de que el trasplante de células Lyt-2<sup>+</sup> + IL-2 recombinante (rIL-2) disminuye notablemente el TMS, al igual que la población L3T4<sup>+</sup>.

2) una dosis alta de linfocitos L3T4<sup>+</sup>, o el trasplante de linfocitos totales, produce en los animales algunos síntomas de la enfermedad, seguidos de una recuperación total (efecto protector).

.Clase II y L3T4.- Cuando sólo existen diferencias en las moléculas de Clase II, se requieren linfocitos L3T4<sup>+</sup>, y dependiendo de si la dosis es baja o alta, se puede generar una enfermedad de tipo crónico o de tipo agudo respectivamente. En cambio, si la dosis es demasiado alta se observa un número apreciable de sobrevivientes sin síntomas de la enfermedad (efecto protector). Al reducir la dosis de radiación del receptor F1 se observa una tasa de mortandad escasa, independientemente de la dosis de trasplante.

#### 4.2. Reacción de ICH Inducida a Través de Antígenos Menores y Uso de Subpoblaciones Lyt-2<sup>+</sup> y/o L3T4<sup>+</sup>: Modelo A - B(r).

Las diferencias en antígenos no relacionados con el CPH también pueden inducir reacción de ICH (46). Al trasplantar ratones irradiados con células de MO Thy1- en combinaciones A - B(r) en las cuales sólo existen diferencias en antígenos menores pero no en H-2 se logra un trasplante perfecto. Pero si a este injerto de MO se le agregan linfocitos totales o linfocitos Lyt-2<sup>+</sup>, el 100% de los animales desarrolla una enfermedad de ICH mortal, en ausencia total de células L3T4<sup>+</sup> del donador y del

receptor. Experimentos adicionales demuestran que la subpoblación Lyt-2<sup>+</sup> siempre produce enfermedad de ICH a través de antígenos menores de histocompatibilidad, pero que la subpoblación L3T4<sup>+</sup> en ocasiones también puede hacerlo, dependiendo de la combinación de cepas que se utilice, y que a medida que aumenta la dosis de cada subpoblación la mortalidad aumenta.

### 5. Actividad de las Células Asesinas Naturales

A pesar de que las células AN no están restringidas por moléculas del CPH, éstas parecen estar involucradas en la mayoría de los procesos de rechazo de tejido alogénico.

Rechazo de trasplantes de MO.- Se ha demostrado que los trasplantes de MO alogénicos y singénicos (47) pueden ser rechazados a través de un mecanismo, independiente de linfocitos T, que involucra células AN. Esto indica que las células AN pueden atacar tejido de origen hemopoiético (48).

Resistencia híbrida.- Las células AN también están involucradas en los procesos de resistencia híbrida. La resistencia híbrida es el mecanismo a través del cual un híbrido F1 puede rechazar tejido proveniente de una de las cepas progenitoras. Los ratones H-2D<sup>b/d</sup> irradiados y una línea de ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) transgénicos irradiados, a los que se les ha insertado un fragmento de DNA que codifica para la molécula de Clase I

H-2D<sup>d</sup>, pueden rechazar linfomas de linfocitos T derivados de la cepa C57BL/6 (49) y células de MO de C57BL/6 (48). Las células responsables del rechazo son Asialo GM-1<sup>+</sup> y NK1.1<sup>+</sup>. En este caso el determinante antigénico responsable de este rechazo se conoce como Hh-1<sup>b</sup>, y mapea en la región H-2D del haplotipo H-2<sup>b</sup>. La expresión de Hh-1<sup>b</sup> es inhibida por la región H-2D del haplotipo H-2<sup>d</sup> (50).

Estos experimentos también indican que el receptor F1 irradiado aún tiene capacidad para rechazar el injerto de MO alogénica. Sin embargo, esto sólo es evidente cuando la dosis de trasplante de MO es baja. Cuando la dosis de trasplante aumenta, seguramente el rechazo no es suficiente para acabar con la población de linfocitos T presentes en el injerto de MO. Entonces estos últimos pueden reaccionar en contra del receptor y producir una reacción de ICH.

Reacción de ICH.- Las células AN también participan en la reacción de ICH. A menudo se han encontrado infiltrados de células mononucleares en proximidad con células necróticas, en la piel, el intestino y el hígado de animales con enfermedad de ICH. Estudios de inmunohistoquímica han revelado que estas células mononucleares son Thy 1<sup>+</sup>, Mac 1<sup>+</sup>, Asialo GM1<sup>+</sup>, Lyt-2<sup>-</sup> e Ia<sup>-</sup> y que no pertenecen al ratón receptor, por lo que parece tratarse de células AN provenientes del inóculo donador, que al microscopio electrónico presentan morfología de grandes linfocitos granulares (IGL). Esto coincide con un actividad elevada de células AN en el bazo de ratones con enfermedad de ICH.



La información acumulada sugiere que la reacción de ICH activa un mecanismo efector mediado por células AN, y por lo tanto inespecífico, que puede dañar tanto al injerto como al receptor (51). Experimentos realizados con ratones beige, defectuosos en células AN, apoyan esta teoría. Las células de bazo de estos ratones no pueden producir todo el espectro de la patología de la enfermedad de ICH.

### 7. Factores Solubles

Existen otros componentes además de los linfocitos T y las células AN que son responsables de algunos de los efectos observados en la reacción de ICH. Entre estos están los factores solubles (52).

IL-2.- Los esplenocitos de ratones con enfermedad de ICH no son capaces de proliferar en respuesta a activadores policlonales tales como Con A o LPS, pero sí pueden producir IL-2. Los esplenocitos irradiados de ratones con enfermedad de ICH (B10.BR - CBA/J) cocultivados con esplenocitos normales de B10.BR, inhiben la proliferación de los esplenocitos normales; el fenómeno es inespecífico. La inhibición se elimina al tratar a los esplenocitos del ratón con enfermedad de ICH, antes del ensayo con anti-Thy1 o Leucine Methyl Ester (LME - compuesto que destruye a las células que contienen gránulos citoplásmicos), pero no con anti-Lyt-2 y anti-L3T4. Si se purifican las células B de estos ratones, éstas sí son capaces de proliferar y producir inmunoglobulinas. Al tratar animales in vivo con anticuerpos anti-IL-2R después del

trasplante de MO + células Thy.1<sup>+</sup> aumenta el porcentaje de supervivencia de 0 hasta 60%. En conjunto estos datos indican que un factor o varios factores solubles son responsables de la actividad supresora. Uno de estos factores es seguramente IL-2. La población celular que la secreta son probablemente células AN.

IFN- $\gamma$ .- Al añadir anticuerpos anti-TNF- $\tau$  a cultivos de esplenocitos de ratones con enfermedad de ICH, o de cocultivos de éstos (irradiados) con linfocitos normales del donador, en ambos casos estimulados con Con A o LPS, se revierte la supresión.

Recientemente se demostró que la administración in vivo de anticuerpos anti-TNF disminuye la incidencia de la enfermedad de ICH.

A este respecto, hay datos que indican que la secreción de linfocinas está alterada en los linfocitos T maduros de ratones con enfermedad de ICH (53, 54). Por lo tanto, la desregulación de linfocinas parece ser un evento central en la inducción de la enfermedad de ICH, a tal grado que los efectos de la reacción de ICH pueden disminuir o suprimirse si se elimina a la(s) interleucina(s) o a la población que la(s) produce.

#### 6. Modelo Aferente-Eferente de la Reacción de ICH Aguda.

Los linfocitos T son responsables del reconocimiento de aloantígenos en la reacción de ICH aguda. Sin embargo la población o poblaciones celulares directamente responsables del daño observado no han sido

definidas. Todo parece indicar que además de los linfocitos T existen otras poblaciones celulares involucradas, como las células AN. Debido a esto, se ha propuesto un modelo de la reacción de ICH en el que se identifican dos procesos: el aferente (el reconocimiento y activación de las células involucradas), y el eferente (la respuesta efectora de las células activadas).

La fase aferente de la enfermedad de ICH aguda comienza cuando los linfocitos T donadores reaccionan contra aloantígenos del receptor. Estas células liberan una variedad de linfocinas, tales como IL-2, TNF e INF- $\gamma$ , los cuales se ha demostrado que activan LGL. En la reacción de ICH inducida a través de antígenos menores, los linfocitos Lyt-2<sup>+</sup> parecen ser los principales responsables de este proceso. Seguramente identifican antígenos menores asociados a antígenos Clase I del CPH. En la reacción de ICH inducida a través de moléculas del H-2 únicamente, ambas subpoblaciones de linfocitos (Lyt-2<sup>+</sup> y L3T4<sup>+</sup>) parecen ser necesarios.

En la fase eferente, las células LGL Asialo GM-1<sup>+</sup> son activados mediante las linfocinas liberadas. Una vez activadas, estas células se encomiendan a la destrucción de tejido. La identidad exacta de las células LGL aun no está clara. Las células AN activadas por linfocinas (LAK) son una población heterogénea de células con morfología de LGL y que exhiben citotoxicidad no restringida por moléculas del CPH (55).

**ESTIMULO ANTIGENICO**

Se ha demostrado que tanto diferencias en las moléculas del CPH como diferencias en otros antígenos pueden inducir una reacción de ICH. Sin embargo, no se sabe cuáles son los tejidos que funcionan como principal estímulo antigénico en la reacción de ICH. Tampoco se sabe, si solo los tejidos que presentan diferencias antigénicas en su superficie son los únicos afectados, o si la reacción de ICH genera un proceso inespecífico.

**1. Principal Estímulo Antigénico en la Reacción de ICH.**

Se piensa que en las reacciones de ICH inducidas a través de diferencias en Clase I, el principal estímulo antigénico son los tejidos que expresan mayor cantidad de moléculas de Clase I en la superficie. Estos tejidos son la MO y las células de origen hemopoiético. Para probar esta posibilidad, se realizaron experimentos en ratones quimeras (ratones (CBA x C57BL/6)F1 reconstituidos con MO de ratones F1 o de CBA a los cuales se les trasplantaron linfocitos T de CBA, para inducir reacción de ICH (56). Los resultados indican que, efectivamente, en estas condiciones la reacción de ICH sólo se induce cuando la MO y los linfocitos T maduros del receptor son alogénicos con los linfocitos T del donador. El tejido de MO resultó ser la fuente mas importante de células inmunogénicas, seguido por las células de bazo, de timo y conducto torácico, en orden decreciente.

## 2. Reacción de ICH Inducida a través de un Antígeno Tejido-específico.

La enfermedad de ICH crónica es un proceso generalizado. Esto tal vez se deba a que la activación de linfocitos B es policlonal, y a que los anticuerpos tienen acceso a una gran variedad de tejidos. En cambio, la enfermedad de ICH aguda parece estar mediada en gran medida por procesos celulares, y no por anticuerpos. Se desconoce si, una vez que se ha disparado la reacción de ICH aguda, los tejidos que resultan dañados son los que expresan moléculas del CPH alogénicas, o si se trata también de una activación inespecífica de células efectoras. Se realizaron experimentos con una línea de ratones SJL (H-2<sup>D</sup>) transgénicos que expresan moléculas de Clase I H-2K<sup>b</sup> únicamente en el hígado, los riñones y el páncreas (57). Cuando a estos ratones se les indujo la reacción de ICH, sólo desarrollaron lesiones en los órganos en los cuales se expresaba el transgene. Esto indica que la reacción de ICH puede estar dirigida exclusivamente contra el tejido u órgano que porta el antígeno. Esto no nos asegura que los tipos celulares que forman parte de dicho tejido y que no expresan el antígeno blanco no sean dañados. Así es que la reacción de ICH podría dispararse localmente, dentro de los órganos que portan el o los antígenos, produciendo daño a todo el tejido, pero sin expandirse a tejidos contiguos.

**DESTINO, PROLIFERACION Y CIRCULACION  
DE LOS LINFOCITOS T TRASPLANTADOS****1. Destino de los Linfocitos T Trasplantados.**

Para determinar el sitio en el que se alojan los linfocitos trasplantados, se realizaron trasplantes de células de MO de uno de los progenitores marcadas con [125-I]-2-deoxiuridina en ratones híbridos F1 sin irradiar (47). Los resultados indican que cuatro hrs. después del trasplante, la mayoría de las células se localiza en la cabeza [22.4%], el hígado [6.2%], los intestinos [10.9%], el bazo [1.3%], los huesos largos [1.2%], los pulmones [1.1%], y la cola [1.1%] [porcentaje de la reactividad recuperada en relación a la reactividad total inyectada].

Se hicieron otros estudios a tiempos más largos en ratones irradiados y trasplantados con células singénicas de bazo y timo, marcadas con adenosina tritiada (58). Se buscó el destino de estas células en pulmón, hígado, timo, bazo y nódulos linfáticos, desde 15 min. hasta 62 hrs. después del trasplante. Tanto las células de bazo como las de timo se localizaron principalmente en el bazo y con menor frecuencia en nódulos linfáticos, aunque de 2 a 10 veces más células de bazo que de timo se alojaron en tejidos linfoides (la distribución puede variar según el origen de los linfocitos T). En el resto de los tejidos analizados prácticamente no se encontraron células. A menos que las células singénicas presenten una distribución distinta a la que presentan las células alogénicas, podríamos suponer que el bazo y los nódulos linfáticos son algunos de los principales sitios de alojamiento de las

células trasplantadas. Desde luego sería necesario verificar qué sucede en los huesos (MO).

## 2. Proliferación de los Linfocitos T Trasplantados.

Después de alojarse en diversos tejidos, los linfocitos T trasplantados son activados por aloantígenos. Se ha determinado que el trasplante de linfocitos T de uno de los progenitores en ratones híbridos F1 produce una activación y proliferación de los linfocitos trasplantados, en el bazo y en los nódulos linfáticos del mesenterio del receptor (56). La proliferación se determinó a través del incremento en el peso del bazo, y la cantidad de timidina tritiada incorporada in vivo. Se presentó una esplenomegalia evidente 2 días después del trasplante, que presentó un valor máximo entre 3 y 6 días y se asoció con un incremento en el número de células; el aumento en el peso del bazo depende de la dosis de timocitos trasplantada. Las células que contribuyen al incremento en el peso del bazo provienen en gran medida del inóculo de células trasplantadas.

La curva de tiempo de incorporación de tritio en el bazo y los nódulos linfáticos del mesenterio decayó 3 días después del trasplante. Esto sugiere que los timocitos trasplantados sufrieron un periodo transitorio de activación antigénica en el bazo y los nódulos linfáticos, y subsecuentemente migraron a la circulación.

Otros estudios indican que la proliferación en el bazo varía según el tipo de reacción de ICH (43). Mediante el uso de anticuerpos monoclonales, se ha demostrado que en la reacción de ICH inducida a través de moléculas de Clase I solo existe una módica repoblación del bazo del receptor por las células T donadoras. En la reacción de ICH a través de moléculas de Clase II existe una repoblación mayor que en el caso anterior y que es predominantemente L3T4<sup>+</sup>. En ambos casos se aprecia una disminución celular mínima de linfocitos del receptor. En cambio, en la reacción de ICH a través de moléculas de Clase I y de Clase II existe una repoblación extensa del bazo (50%). Los linfocitos que repoblan el bazo son del padre donador, la mayoría de los cuales son Lyt-2<sup>+</sup>. La población de linfocitos Lyt-2<sup>+</sup> y L3T4<sup>+</sup> del receptor disminuye dramáticamente (>99%).

### 3. Circulación de los Linfocitos T en Proliferación.

Se realizaron estudios para averiguar si los linfocitos T trasplantados que proliferan ante un estímulo antigénico en tejidos como el bazo pueden después dirigirse a otros tejidos. Una gran cantidad de blastos aparecieron en el conducto torácico de ratones híbridos F1 irradiados y trasplantados 4 días antes con linfocitos T de uno de los progenitores (59). La mayoría de los blastos estaban sintetizando DNA puesto que incorporaron timidina tritiada que les fue administrada a los ratones. Los linfocitos extraídos del conducto torácico de estos ratones fueron identificados como una población de linfocitos T proveniente de las



células trasplantadas, y que había sido activada para dividirse en respuesta a antígenos de histocompatibilidad alogénicos.

#### 4. Fin de la Reacción de ICH Aguda.

Los ratones que desarrollan enfermedad de ICH aguda, pueden recuperarse sino mueren por infección durante la etapa más crítica de la enfermedad. Se examinaron periódicamente los tejidos de ratones con enfermedad de ICH inducida a través de una molécula de Clase I transgénica, que se expresa en el hígado (57). Se observó que 24 semanas después del trasplante de linfocitos T, el infiltrado linfocitario que se había observado en el hígado desde las 3 hasta las 12 semanas después del trasplante disminuyó notablemente. Esto puede deberse a que existen mecanismos tolerogénicos (periféricos) que limitan la respuesta inmune en la reacción de ICH en contra de las células que expresan el transgene (según los autores), o simplemente a que los linfocitos T maduros trasplantados y su progenie no son eternos. Sin embargo, la enfermedad de ICH aguda también puede derivar en un proceso crónico y este puede prolongarse durante años (39). Esto se debe principalmente a que se genera un desequilibrio entre las subpoblaciones de linfocitos T supresores y autorreactivos. Por otra parte, se encontró que los linfocitos T extraídos de ratones con enfermedad de ICH aguda, 5 días después del trasplante pueden inducir enfermedad de ICH aguda si se trasplantan a ratones singénicos (60). En cambio los linfocitos T extraídos el día 6 solo producen enfermedad de ICH crónica. La población

del día 5 esta enriquecida con linfocitos supresores, mientras que la del día 6 esta enriquecida con linfocitos de ayuda. Esto indica que en realidad el proceso que genera supresión o destrucción (reacción de ICH aguda) finaliza alrededor del día 5, y lo que sucede a partir de entonces es el resultado de los efectos producidos durante los primeros 5 días. La capacidad para generar una reacción de ICH crónica permanece, pero dado los efectos producidos durante los primeros 5 días, esto no es aparente.

#### 5. Reconstitución con Médula Osea Alogénica.

Existen varios ejemplos que demuestran que la MO alogénica, depletada de linfocitos T puede reconstituir la MO del receptor. Ratones SJL transgénicos fueron irradiados y trasplantados con células de bazo o células de MO depletada de células T, ambas provenientes de ratones SJL normales (57). Los ratones trasplantados con células de bazo (linfocitos T maduros) desarrollaron lesiones de ICH solo en los órganos en los cuales se expresa el transgene. En cambio, los ratones trasplantados con células de MO no mostraron evidencia alguna de la reacción de ICH. Esto indica que las células T que reconstituyen al receptor y que provienen del injerto de MO de SJL no transgénico, pasan por procesos de diferenciación y educación dentro del receptor que las vuelven tolerogénicas. Esto puede suceder incluso cuando el aloantígeno no se expresa en el timo. Por lo tanto, los linfocitos T provenientes de la MO

trasplantada están sujetos tanto a procesos de selección en el timo (61), como a procesos tolerogénicos periféricos.

## OBJETIVO

Como se explicó en la introducción, la enfermedad de ICH aguda produce, en general, hipogamaglobulinemia, supresión inmune, involución tímica e hipoplasia del tejido linfo-hemopoiético, y los síntomas característicos. El objetivo principal de este trabajo es verificar si existe daño en la MO de los ratones con enfermedad de ICH aguda inducida en ratones no irradiados, y correlacionar el daño medular con lo que sucede en sangre periférica.

Para estudiar los efectos de la enfermedad de ICH aguda en la MO, se utilizó un modelo murino de inducción de la enfermedad de ICH, en el que ratones híbridos F1 son trasplantados con células de bazo (CB) proveniente de uno de los padres (P - F1). Se utilizaron dos híbridos F1 diferentes:

[C57BL/6 x DBA/2]F1 (B6D2) y

[C57BL/6 x BALB/c]F1 (B6C) o [BALB/c x C57BL/6]F1 (CB6).

Los ratones BALB/c y los DBA/2 son cepas alogénicas que comparten la región que determina el haplotipo (H-2<sup>d</sup>), por lo tanto, ambas combinaciones de híbridos son (H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup>). En ambas combinaciones (B6 - B6D2 y B6 - B6C o CB6) se utilizó el mismo padre como donador de CB para evitar diferencias en el trasplante de subpoblaciones de linfocitos L3T4<sup>+</sup> y Lyt-2<sup>+</sup>.

De acuerdo con la literatura, el trasplante de  $9 \times 10^7$  CB en la combinación B6 - B6D2 produce una enfermedad de ICH aguda letal, caracterizada por un estado de inmunosupresión, disminución en el tamaño del bazo, la presencia de linfocitos T citotóxicos anti-receptor, un quimerismo esplénico del 20 al 26% correspondiente a las células de bazo trasplantadas (62), y supresión (transferible in vitro) en la producción de anticuerpos. Esta reacción está dirigida contra el componente H-2<sup>d</sup> del híbrido F1. Puesto que la reacción de ICH puede iniciarse por diferencias exclusivamente en las moléculas del CPH (43), y puesto que los híbridos B6D2 y B6C/DB6 comparten haplotipo, suponimos que la combinación B6 - B6C/DB6 también produciría una enfermedad de ICH aguda.

## MATERIAL Y METODOS

Amortiguador de fosfatos (PBS).

NaCl	0.15	M
KCl	0.0026	M
NaH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup>	0.008	M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0014	M

pH 7.4.

PBS\*.

PBS con glucosa al 0.1%.

Medio RPMI completo.

RPMI 1640	10.392	g
Dextrosa	2.5	g
NaHCO <sub>3</sub>	2.0	g
H <sub>2</sub> O	aforar a 1 lt.	

pH 7.2

Filtrar en condiciones esteriles y añadir:

Sulfato de estreptomina	100	µg/ml
Piruvato de Na	1	mM
Aminoácidos no esenciales	0.1	mM
Anfotericina-B	1%	
Suero bovino fetal	10%	

Medio RPMI\*.

Medio RPMI filtrado, no complementado.

Solución de EDTA.

NaCl	8	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	g
KCl	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	g
EDTA	0.2	g
H <sub>2</sub> O	aforar a 1 Lt.	

pH 7.0

Siempre se utilizó precalentada a 37°C.

Solución de Bouin.

Ac. picrico (soln. acuosa saturada 12 g/lt.)	750	ml.
Formaldehido (soln. 40%)	250	ml.
Ac. acetico glacial	50	ml.

Cepas.-

Se utilizaron ratones de la cepa singénica C57BL/6 (B6), y ratones híbridos [C57BL/6 x DBA/2]F1 (B6D2), y [C57BL/6 x BALB/c]F1 (B6C) y/o [BALB/c x C57BL/6]F1 (CB6) que fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Trasplante de Células de Bazo.-

Los ratones B6 fueron sacrificados por dislocación cervical. Los bazos fueron extraídos y i) disgregados pasándolos por una malla de acero inoxidable, presionándolos con el embolo de una jeringa, y diluyendo las células en PBS\* o medio RPMI\*; o ii) fueron perfundidos con una jeringa de insulina y medio RPMI\*. Las células fueron colectadas con una jeringa de insulina y los grumos fueron separados con una pipeta pasteur. Las células fueron lavadas dos veces en PBS\* o en medio RPMI\*, y una vez en PBS (sin glucosa), en tubos de 5 ml.: las centrifugaciones se hicieron a 1.5 K, 7 min.; el sobrenadante se decantó, y el botón de células fue resuspendido en el líquido restante con agitación suave; se agregó PBS\* o RPMI\* hasta completar 5ml.; se dejaron reposar 1 min. en hielo para que se asentaran los grumos, y el sobrenadante se pasó a otro tubo de 5ml. con pipeta pasteur; en algunos casos los eritrocitos se lisaron agregando al botón de células resuspendido un volumen de agua destilada estéril e inmediatamente después, un volumen de PBS 2X.. En algunas ocasiones las células fueron incubadas en RPMI completo en una incubadura de CO2 al 5%, durante no más de 12 hrs. La viabilidad y el número de células fueron determinados por el

método de exclusión de azul de tripano, utilizando un hematocitómetro; se tuvo cuidado de no contar eritrocitos. Las células fueron resuspendidas en PBS. A menos que se indique otra cosa, todo se hizo a temperatura ambiente y en condiciones estériles. Cada ratón fue inyectado por la vena dorsal de la cola, con la dosis de CB indicada en las Tablas 1 y 2, resuspendidas en un volumen de 0.5 a 1 ml. de PBS.

#### Biometrías Hemáticas.-

Los ratones fueron anestesiados con éter etílico, y sangrados por vía ocular, utilizando cánulas heparinizadas. Las biometrías se hicieron en el laboratorio de Hematología, del Instituto de Cancerología, en un aparato Coulter Counter modelo S Plus II, cat-7546663. Se usaron muestras prediluidas: 45  $\mu$ l de sangre fueron diluidos en 10ml. de ISOTON (soln. comercial). Los cálculos de los valores hemáticos fueron realizados con el programa Lotus 123 (versión en español).

#### Necropsias.-

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los órganos indicados fueron extraídos y fijados en formol al 10%.

#### Cortes de Tejido.-

Los órganos fijados fueron incluidos en bloques de parafina. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Esto fue realizado por Ismael Ramírez, del Instituto de Investigaciones Biomedicas,

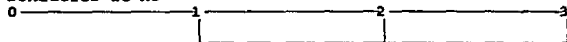


por el Departamento de Patología, del Instituto de Cancerología, y por el Departamento de Patología, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. El análisis histológico fue hecho por el Dr. Rogelio Hernández Pando.

Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias en el bazo (UFC-s).-

Esquema general del experimento:

Donadores de MO



Receptores de MO

A-----B-----C

Donadores de MO:

0) los animales fueron trasplantados con CB; 1, 2 ó 3 semanas después del trasplante de CB fueron sacrificados para la extracción de MO.

Receptores de MO:

A) los animales recibieron tratamiento con Terramicina, B) 11 a 15 días después se les suspendió el antibiótico, fueron irradiados, y entre 2 y 5 hrs. después fueron i) trasplantados con MO proveniente de ratones singénicos trasplantados 1, 2 ó 3 semanas antes con CB (Donadores de MO), o ii) proveniente de ratones singénicos sin trasplantar (control de MO normal), o iii) no trasplantados (control de radiación), y c) fueron sacrificados 12 días después del trasplante de MO para la extracción del bazo. Los bazos fueron fijados en solución de bouin para acentuar la visibilidad de las colonias esplénicas (UFC-s). Se contaron las colonias macroscópicamente visibles en

el bazo, y se clasificaron en grandes, medianas o chicas por el tamaño relativo que presentaron. En algunos casos se hicieron cortes de tejido para verificar la población celular de las colonias. Durante todo el experimento, los receptores se mantuvieron en condiciones especiales de esterilidad.

#### Donadores de Médula Osea.-

Los híbridos B6D2 y B6C fueron trasplantados con CB de ratones B6 machos o hembras de 5 a 10 semanas de edad (ver Trasplante de Células de Bazo). A cada ratón se le inyectó por vía intravenosa una dosis de CB de  $1.4$  a  $1.8 \times 10^8$  resuspendidas en  $0.5$  ml de PBS (ver Tabla 4). Un día antes de la extracción de MO, los ratones fueron sangrados para obtener biometrías hemáticas; los donadores de MO a utilizarse fueron seleccionados por presentar los valores hemáticos mas bajos del grupo (datos no incluidos).

#### Extracción de las Células de MO.-

Varios días después del trasplante de CB (ver Tabla 4), los ratones donadores de MO fueron sacrificados por dislocación cervical y sumergidos en etanol al 70%. Se extrajeron rápidamente el bazo, los dos fémures y las dos tibias. Los fémures y las tibias fueron descarnados y colocados en hielo. El bazo, y en algunos casos también un fémur y una tibia fueron fijados en formol al 10% (ver Cortes de Tejido); el fémur y tibia restantes fueron utilizados para extraer células de MO: se cortaron las cabezas de los huesos por ambos extremos, y se transfundieron con un jeringa de insulina

y solución de EDTA (las células sobreviven hasta 12 hrs. en esta solución) utilizando 1 ml./hueso. Se recolectó lo trasfundido, y se pasó varias veces por la jeringa para desbarrar grumos. Las células fueron lavadas una vez con PBS, y el número de células y la viabilidad fueron determinadas por el método de exclusión de azul de tripano, utilizando un hematocitómetro; se tuvo cuidado de no contar eritrocitos. A menos que se indique otra cosa, todo se hizo a temperatura ambiente y en condiciones estériles.

#### Trasplante de Médula Osea.-

Entre 2 y 5 hrs. después de la irradiación, los ratones recibieron una dosis de  $4 \times 10^5$  células/raton diluidas en 0.5ml de PBS, por vía intravenosa.

#### Condiciones Especiales de Esterilidad.-

Entre 11 a 15 días antes de la fecha del trasplante de MO, y hasta su sacrificio los animales se mantuvieron en las máximas condiciones de esterilidad posibles:

El aserrín se esterilizó 2 veces y se les cambió cada tercer día. Las jaulas se limpiaron con etanol antes de usarse. Se le colocó un filtro a cada jaula. Los animales se colocaron en un máximo de 6/jaula, y guardaron su distribución inicial durante todo el experimento. Se utilizó una bolsa de alimento aislada.

#### Tratamiento con Terramicina.-

Entre 11 y 15 días antes del trasplante de MO, los receptores de MO

recibieron Terramicina por vía oral: se diluyeron 6.05 g/lit de polvo de Terramicina (oxitetraciclina, fórmula especial para animales; uso veterinario. PPIZER) en agua destilada estéril. Se colocó en los bebederos, calculando aproximadamente 20 ml. de solución/ratón para 2 ó 3 días.

#### Irradiación.-

Los animales fueron anestesiados para la irradiación: se diluyó Anestesal (Pentobarbital Sodico 0.063 g./ml. uso veterinario. Smith Kline) 1:10 en agua destilada estéril; de esta solución se inyectaron 10  $\mu$ l/gramo de peso de cada animal, por vía intraperitoneal. Para la irradiación los animales fueron colocados en cajas de plástico tapadas con filtro. Los ratones recibieron una dosis de irradiación de 1000 cGy/ratón, a una velocidad de administración de 81 cGy/min, en un total de 12.35 min; se utilizó una fuente de  $^{60}\text{Co}$ . A algunos de los ratones que fueron irradiados o irradiados y trasplantados con MO, se les practicaron biometrías hemáticas antes de ser irradiados y 12 días después para verificar que la irradiación hubiese producido pancitopenia; no se observaron diferencias entre los valores hemáticos de los ratones trasplantados y de los no trasplantados (datos no incluidos).

## RESULTADOS

Ratones híbridos B6D2 y B6C o CB6 (B6C/CB6) sin irradiar fueron trasplantados con varias dosis de CB de C57BL/6 (B6) para identificar las dosis adecuadas de trasplante (Esquema 1). En total se hicieron los experimentos indicados en las tablas 1 y 2. El desarrollo de la enfermedad de ICH se determinó a través del porcentaje de mortalidad, de los síntomas que presentaron los animales, de las cinéticas de peso y de valores hemáticos, y de los estudios histológicos.

Tabla 1  
EXPERIMENTOS DE TRASPLANTE DE B6D2

Exp	# rat	F1	EdadR	SexoR	# CB	EdadD	SexoD
1a	10	B6D2	7-9	♂	5x10 <sup>-7</sup>	7-9	♂
1b	10	B6D2	7-9	♂	5x10 <sup>-7</sup>	7-9	♂
1c	10	B6D2	7-9	♂	-	-	-
2a	10	B6D2	7-9	♂	1x10 <sup>-8</sup>	7-9	♂
2b	10	B6D2	7-9	♂	1x10 <sup>-8</sup>	7-9	♂
3a	5	B6D2	12	♂	1x10 <sup>-8</sup>	11	♂
3b	5	B6D2	16	♂	1x10 <sup>-8</sup>	11	♂
3c	5	B6D2	12	♂	1x10 <sup>-8</sup>	11	♂
3d	4	B6D2	16	♂	-	-	-

Ratones híbridos B6D2 fueron trasplantados con CB de B6.  
Exp - número de experimento; # rat - número de animales por experimento; F1 - híbrido utilizado; EdadR - edad en semanas del receptor al recibir el trasplante; SexoR - sexo del receptor; # CB - número de CB trasplantadas por animal; EdadD - edad en semanas del donador de CB el día del trasplante; SexoD - sexo del donador; (-) - grupos control sin trasplantar.

Tabla 2  
EXPERIMENTOS DE TRASPLANTE DE B6C/CB6

Exp	# rat	F1	EdadR	SexoR	# CB	EdadD	SexoD
1	6	B6C	11	♂	$2.0 \times 10^{-8}$	12	♂
2	6	B6C	11	♂	$1.5 \times 10^{-8}$	16	♂
3	4	B6C	11	♂	$1.0 \times 10^{-8}$	12	♂
4	4	B6C	11	♂	-	-	-
5a	6	B6C	7	♂	$1.5 \times 10^{-8}$	9	♂
5b	2	B6C	7	♂	$1.5 \times 10^{-8}$	11-12	♂
5c	5	B6C	7	♂	-	-	-
6	3	CB6	7	♂	$1.6 \times 10^{-8}$	8	♂
7	1	CB6	7	♂	$3.9 \times 10^{-7}$	10	♂
8	4	CB6	8	♂	$3.0 \times 10^{-8}$	10	♂
9	4	CB6	7-8	♂	-	-	-

Ratones híbridos B6C o CB6 fueron trasplantados con CB de B6.

Exp - número de experimento; # rat - número de animales por experimento; F1 - dirección de la cruce en los híbridos F1 utilizados; EdadR - edad en semanas del receptor al recibir el trasplante; SexoR - sexo del receptor; # CB - número de CB trasplantadas por animal; EdadD - edad en semanas del donador de CB el día del trasplante; SexoD - sexo del donador; (-) - grupos control sin trasplantar.

#### Sobrevida.-

B6 - B6D2. La Gráfica 1 muestra la curva de sobrevida de 4 grupos de ratones B6D2 trasplantados con  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  CB (ver Tabla 1). La mortalidad en los animales trasplantados varió del 20 al 60%; en ningún experimento se obtuvo el 100% de mortalidad. Aún al utilizar la misma dosis de trasplante en dos grupos distintos se obtuvieron porcentajes de mortalidad diferentes (ver los dos grupos trasplantados con  $5 \times 10^7$  CB). El aumento en la dosis de trasplante (de  $5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  CB) no aumento el porcentaje de mortalidad.

Los animales murieron (o fueron sacrificados) entre 12 y 66 días después del trasplante de CB.

B6 - B6C/CB6. La Gráfica 2 muestra la curva de sobrevivencia de los ratones B6C y CB6 trasplantados con un número de CB que varió de 1 a  $3 \times 10^8$  (ver Tabla 2). Como se puede observar en esta figura, a pesar de que el número de CB trasplantadas fue hasta 3 veces mayor a la utilizada con los híbridos B6D2, la sobrevivencia fue prácticamente del 100% en estos ratones. Sólo en uno de los experimentos murió un animal. Aparentemente estos híbridos son más resistentes a la reacción de ICH que el híbrido B6D2.

#### Síntomas y Signos.-

B6 - B6D2. Entre 10 y 60 días después del trasplante de CB, algunos de los ratones B6 - B6D2 presentaron el siguiente patrón de síntomas, que son característicos de la enfermedad de ICH: pérdida de peso progresiva (ver sección de Peso), postura encorvada, pelo erizado, adinamia y palidez acentuada de pabellón auricular. La duración de estos datos podía variar de 2 a 7 días. Posteriormente, la mayoría de los animales presentó un cuadro más severo manifestado por adinamia severa, hipotermia generalizada (al tacto), palidez extrema, y muerte en menos de 24 hrs. En 3 animales se presentó además parálisis de extremidades antes de la muerte (esto pudo deberse a daños ocasionados en el sistema nervioso por

isquemia). Por lo tanto, la mayoría de los ratones B6 - B6D2 enfermos fueron sacrificados para ser estudiados, cuando se considero que no sobrevivirían más de 24 hrs.

Sin embargo, no todos los animales que presentaron los síntomas, murieron. Hubo dos casos de ratones B6 - B6D2 que mostraron el patrón de síntomas característico, con una notable disminución en el peso, pero que nunca mostraron adinamia. Estos ratones permanecieron en este estado durante un par de semanas, después aumentaron lentamente su peso en un par de gramos, mejoraron, y vivieron durante aproximadamente un año.

Los ratones B6 - B6D2 que nunca mostraron pérdida de peso, ni los síntomas característicos de la enfermedad de ICH, vivieron tanto tiempo como los ratones B6D2 controles. Es posible que algunos de estos ratones trasplantados no recibieran la dosis de CB indicada debido a problemas durante la inyección en la vena dorsal de la cola. Sin embargo, resulta difícil creer que esto haya ocurrido en un porcentaje tan alto de ratones, en todos los experimentos de realizados con B6 - B6D2. Además, como se verá mas adelante, esta ineficiencia no ocurre en los ratones B6 - B6C/CB6. Por otra parte, las condiciones ambientales y alimenticias fueron las mismas para todos los ratones, así que éste tampoco parece ser el motivo del bajo porcentaje de mortandad.



B6 - B6C/CB6. Entre 13 y 20 días después del trasplante de CB, algunos de los ratones B6 - B6C presentaron pérdida de peso. A diferencia de los ratones B6 - B6D2, éste fue el único síntoma post trasplante que presentaron los ratones B6 - B6C/CB6.

Peso.- Los ratones trasplantados con CB fueron pesados periódicamente.

B6 - B6D2. Los ratones B6 - B6D2 que sí desarrollaron la enfermedad presentaron una pérdida notable de peso entre 2 y 7 días antes de perecer o ser sacrificados. La disminución en el peso se presentó a tiempos muy variables, a partir de la fecha del trasplante de CB. Debido a esta variación, no se graficó el promedio de los pesos, sino el peso de casos aislados. En la Gráfica 3 se muestran las cinéticas del peso de dos ratones B6 - B6D2 (del Exp 3b) que desarrollaron la enfermedad (uno de los cuales se recuperó), y el promedio del peso del grupo control (del Exp 3d; ver Tabla 1).

En general, los ratones B6D2 sin trasplantar presentaron un peso promedio de 24 grs. a las 8 semanas de edad, mientras que los ratones con enfermedad de ICH pesaron como límite inferior, entre 16 y 20 grs.; hubo casos extremos de ratones que pesaron 14 grs. No se identificaron diferencias entre los pesos de los grupos trasplantados con  $5 \times 10^7$  o con  $1 \times 10^8$  CB.

B6 - B6C/CB6. Algunos ratones B6 - B6C presentaron una disminución de peso sincrónica. En las Gráficas 4, 5 y 6 se muestra el promedio del peso de los diferentes grupos de ratones B6C y CB6, trasplantados con las dosis de CB indicadas (ver Tabla 2).

Los ratones de los experimentos 1-4 no presentaron una disminución en el peso, mientras que los de los experimentos 5a, 6 y 8 sí la presentaron, así como uno de los dos ratones del Exp 5b (ver Tabla 3). En general, los ratones de los Exp 5 y Exp 6-8 que disminuyeron de peso se recuperaron, aunque no alcanzaron el peso de los grupos control, al menos hasta 48 y 74 días después del trasplante de CB, respectivamente.

**Biometrías Hemáticas.**- Los animales trasplantados con CB fueron sangrados semanalmente para obtener biometrías hemáticas. En todos los sangrados se incluyeron ratones control de la misma edad no trasplantados.

B6 - B6D2. Se les practicaron biometrías hemáticas a los híbridos de los experimentos 3 (trasplantados con  $1 \times 10^8$  CB). Aproximadamente, el 30% de los ratones B6 - B6D2 de los experimentos 3 desarrolló pancitopenia (leucopenia, eritropenia y trombocitopenia; datos no incluidos). La pancitopenia, al igual que la pérdida de peso, se presentó en un margen de tiempo muy variable, detectada desde 13 hasta 61 días después del trasplante

de CB. El grado de pancitopenia máximo alcanzado fue variable: en cada caso se desarrolló leucopenia, eritropenia, y plaquetopenia en este orden de importancia, pero de diferentes grados de gravedad. En la mayoría de los casos la pancitopenia continuó agravándose hasta que el animal murió. Sin embargo hubo casos excepcionales en los que el animal no murió y logró recuperarse. En tales situaciones, los valores hemáticos también se recuperaron, aunque muy lentamente. Al menos hasta 70 días después del trasplante de CB, los valores hemáticos aún estaban por debajo de los valores de los animales control no trasplantados (ocasionalmente se les practicaron biometrías hemáticas a algunos ratones de los Exp 1 y 2, y se observó una pancitopenia que continuó por lo menos hasta 97 días después del trasplante).

Se hicieron cuentas diferenciales de leucocitos de los frotis de sangre periférica de ratones del Exp 3: todas las poblaciones de leucocitos fueron afectadas (datos no incluidos).

El desarrollo progresivo de la pancitopenia coincidió con el proceso de disminución de peso, y finalmente, con el resto de los síntomas. Sólo los ratones que desarrollaron pancitopenia y disminuyeron de peso, murieron; sin embargo, algunos ratones (dos casos) con pancitopenia y disminución de peso se recuperaron.

Debido a que la pancitopenia se presentó asincrónicamente, no se promediaron los valores hemáticos de los ratones de cada grupo

experimental. En las Gráficas 7a, b y c se muestra la cinética hemática de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, respectivamente, de dos ratones B6 - B6D2 del Exp 3b (mismos de la Gráfica 3), y el promedio de los valores hemáticos del grupo control 3d. Como se muestra en las gráficas, el número de plaquetas y leucocitos es muy variable aun en los animales control; los eritrocitos son el valor hemático mas estable. Ambos ratones desarrollaron pancitopenia pero uno murió y el otro se recuperó. Las plaquetas son al componente sanguíneo menos afectado, y los leucocitos el mas afectado en estos ratones.

En las Gráficas 8, 9 y 10 se comparan las cinéticas del peso y de los valores hemáticos de los dos ratones referidos en las gráficas 3 y 7 y del promedio del grupo control.

B6 - B6C/CB6. La mayoría de los grupos experimentales de ratones B6 - B6C/CB6 desarrollaron diferentes tipos de citopenias. Las citopenias se presentaron de manera sincrónica en cada grupo, por lo que se promediaron los valores hemáticos de todos los ratones de cada grupo experimental. En las series de Gráficas 11, 12 y 13 se muestran las cinéticas hemáticas de los grupos B6 - B6C/CB6 (ver Tabla 2); las Gráficas a, b y c muestran las cinéticas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, respectivamente, de cada grupo.

En los grupos B6C Exp 1-3, los efectos en los valores hemáticos son proporcionales a las dosis de trasplante: en el Exp 1, Exp 2 y Exp3 (trasplantados con  $2$ ,  $1.5$  y  $1 \times 10^8$  CB respectivamente), se presentaron una leucopenia y una eritropenia, una leucopenia y una eritropenia de menor grado, y una leucopenia módica, respectivamente.

.En el Exp 5a, los 6 ratones (trasplantados con  $1.5 \times 10^8$  de CB de donadores de 9 semanas) presentaron una leucopenia y una eritropenia módica, mientras que sólo uno de los dos ratones del Exp 5b (trasplantados con la misma dosis de CB de donadores de 12 semanas), presentó el mismo cuadro.

.En todos los grupos CB6 se presentó una pancitopenia, inclusive en el ratón del Exp 7 que sólo fue inyectado con  $3.9 \times 10^7$  CB de macho. Se produjo un efecto mayor en los leucocitos y eritrocitos del grupo trasplantado con  $1.6 \times 10^8$  CB (de donadores de 8 semanas), que en los grupos trasplantados con  $3 \times 10^8$  o con  $3.9 \times 10^7$  CB (de donadores de 10 semanas). Las plaquetas fueron el componente menos afectado.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los datos obtenidos de las gráficas de los valores hemáticos 11, 12 y 13 y de las gráficas de los pesos 4, 5 y 6.

En general, el grado de citopenia, y el tiempo en que ésta se presentó varió dependiendo de la dosis de CB trasplantadas, y de la edad de los donadores y los receptores de CB. En los grupos B6 - B6C/CB6, las citopenias de mayor grado se presentaron entre los 15 y los 21 días después del trasplante de CB, y no fueron letales: prácticamente el 100% de los animales con citopenias se recuperó y al menos 70 días después del trasplante de CB, los valores hemáticos casi estaban al nivel de los animales control no trasplantados (sólo un ratón del Exp 1 murió 35 días después del trasplante, sin presentar una disminución en el peso, ni otros síntomas).

En las Gráficas 14, 15 y 16 se comparan las cinéticas de los promedios del peso y de los valores hemáticos de los grupos Exp 6, Exp 5a y Exp 9 (control).

Tabla 3  
RESUMEN DE LAS CINÉTICAS HEMÁTICAS Y DEL PESO

Exp	#rat	EdadR	#cel	EdadD	Leup	Erip	Plap	DiP
B6C								
1	6	11	$2.0 \times 10^8$	12	+++	+++	no	no
2	6	11	$1.5 \times 10^8$	6	++	+	no	no
3	4	11	$1.0 \times 10^8$	2	+	?	no	no
4	4	11	-	-	no	no	no	no
5a	6	7	$1.5 \times 10^8$	9	+++	+	no	si
5b	2	7	$1.5 \times 10^8$	1-12	++	?	no	si*
5c	5	7	-	-	no	no	no	no
CB6								
6	3	7	$1.6 \times 10^8$	8	+++	+++	++	si
7	1	7	$3.9 \times 10^7$	10	++	++	+	si
8	4	8	$3.0 \times 10^8$	10	++	++	++	si
9	4	7-8	-	-	no	no	no	no

Se obtuvieron las cinéticas del peso y de los valores hemáticos de los ratones B6 - B6C y B6 - CB6. Aquí se presenta un resumen de los datos más sobresalientes de las Gráficas 4, 5, 6, 11, 12 y 13. Exp - número de experimento; # rat - número de animales por experimento; EdadR - edad en semanas del receptor al recibir el trasplante; # cel - número de CB trasplantadas por animal; EdadD - edad en semanas del donador de CB el día del trasplante; Leup - leucopenia; Erip - eritropenia; Plap - plaquetopenia; Disp - disminución en el peso (si/no); (+) - grado relativo de las citopenias; (-) - grupos control sin trasplantar; ? - se aprecia una ligera citopenia, pero cae dentro del rango normal; \* - sólo un ratón presentó leucopenia y disminución de peso.

**Descripción Macroscópica e Histológica del Daño Inducido por el Trasplante de Células de Bazo.-**

B6 - B6D2. En general, todos los animales B6 - B6D2 presentaron las mismas características cuando fueron sacrificados: se observó una disminución en el volumen de sangre, con hipocromía, menor viscosidad y con un tiempo de coagulación disminuido (observación cualitativa). El hígado y los riñones presentaron una coloración rosa pálido, debido a la isquemia. El bazo presentó una reducción variable de tamaño. El timo prácticamente desapareció en todos los casos.

En total se analizó el tejido de 9 ratones B6 - B6D2 trasplantados con  $1 \times 10^8$  ó con  $5 \times 10^7$  CB, que presentaron las características arriba descritas. Se hicieron cortes de bazo, hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro: en algunos casos el riñón presentó isquemia; el hígado en ocasiones presentó necrosis leve o extensa, con isquemia, y en un caso con bacterias; el resto no mostró alteraciones. Se hicieron cortes de los vestigios del timo, pero sólo se encontró tejido adiposo. En dos casos se hicieron cortes de intestino, y en un caso, corte de piel: uno de los 2 cortes de intestino mostró necrosis, e isquemia con bacterias; el corte de piel fue normal.

El bazo de los ratones que fueron sacrificados alrededor de 20 días después del trasplante, presentó la misma imagen histológica: hipoplasia esplénica. La arquitectura del bazo se perdió totalmente debido a la presencia de un infiltrado de magnitud variable



constituido por células linfoides grandes de núcleo con contornos irregulares, cromatina extendida y nucléolo prominente. Dichas células borran por completo a la pulpa blanca y también a la pulpa roja. Solo quedaron en ellas grupos de linfocitos pequeños, macrófagos con vacuolas que contienen pigmento hemático, así como muy escasos megacarioblastos y formas jóvenes de serie blanca.

Los ratones B6 - B6D2 que fueron sacrificados alrededor del día 50, mostraron una imagen histológica similar, pero con una hipoplasia esplénica mayor: se observaron bandas fibróticas extensas con colapsos del parénquima esplénico, manifestado por disminución del tejido esplénico y colapso de la cápsula, y no se observaron las células linfoides grandes de la descripción anterior (Foto 1 y 2).

B6 - B6C/CB6. Un total de 10 ratones B6 - B6C trasplantados con  $1.5 \times 10^8$  CB fueron sacrificados 7, 13 o 20 días después del trasplante de CB. Todos mostraron esplenomegalia. El hígado, el riñón y el timo no mostraron alteraciones macroscópicas. Se hicieron cortes de hígado, riñón y bazo de cinco de los 10 ratones, trasplantados 13 o 20 días antes con CB. El hígado y el riñón presentaron una imagen normal. La imagen histológica que presentó el bazo a los 13 y 20 días es indistinguible de la que presentó el bazo de los ratones B6 - B6D2 a los 20 días después del trasplante de CB: la arquitectura del bazo se encuentra totalmente alterada debido a la presencia de un abundante infiltrado constituido por células linfoides grandes de núcleo con contornos irregulares, cromatina extendida y nucléolo prominente.

constituido por células linfoides grandes de núcleo con contornos irregulares, cromatina extendida y nucléolo prominente. Dichas células borran por completo a la pulpa blanca y también a la pulpa roja. Solo quedaron en ellas grupos de linfocitos pequeños, macrófagos con vacuolas que contienen pigmento hemático, así como muy escasos megacarioblastos y formas jóvenes de serie blanca.

Los ratones B6 - B6D2 que fueron sacrificados alrededor del día 50, mostraron una imagen histológica similar, pero con una hipoplasia esplénica mayor: se observaron bandas fibróticas extensas con colapsos del parénquima esplénico, manifestado por disminución del tejido esplénico y colapso de la cápsula, y no se observaron las células linfoides grandes de la descripción anterior (Foto 1 y 2).

B6 - B6C/CB6. Un total de 10 ratones B6 - B6C trasplantados con  $1.5 \times 10^8$  CB fueron sacrificados 7, 13 o 20 días después del trasplante de CB. Todos mostraron esplenomegalia. El hígado, el riñón y el timo no mostraron alteraciones macroscópicas. Se hicieron cortes de hígado, riñón y bazo de cinco de los 10 ratones, trasplantados 13 o 20 días antes con CB. El hígado y el riñón presentaron una imagen normal. La imagen histológica que presentó el bazo a los 13 y 20 días es indistinguible de la que presentó el bazo de los ratones B6 - B6D2 a los 20 días después del trasplante de CB: la arquitectura del bazo se encuentra totalmente alterada debido a la presencia de un abundante infiltrado constituido por células linfoides grandes de núcleo con contornos irregulares, cromatina extendida y nucléolo prominente.

Dichas células borran por completo a la pulpa blanca y también a la pulpa roja (Foto 3).

Se hicieron necropsias de 6 ratones B6 - B6C trasplantados con  $2 \times 10^8$  CB 100 días antes. No se observó ninguna alteración, a excepción del bazo. Este presentó algo de hipoplasia, con nódulos linfoides difusos, mientras que los controles no trasplantados de la misma edad mostraron una imagen histológica normal (FOTOS).

#### Análisis de la Médula Osea.-

- 1) Para estudiar el efecto del trasplante de CB sobre la MO, se hizo un conteo de la MO extraída de un fémur y una tibia de i) ratones B6 - B6D2, 14 días después del trasplante de  $4.5 \times 10^8$  CB, y de ii) ratones B6 - B6C, 7, 13-14 y 20 días después del trasplante de  $4.5 \times 10^8$  CB.
- 2) Para verificar lo observado con la cuenta de células de MO, se hizo un estudio histológico de hueso (fémur), únicamente de los ratones B6 - B6D2 y B6 - B6C sacrificados 14 días después del trasplante de CB.
- 3) Para determinar la capacidad de reconstitución que posee la MO de los ratones B6 - B6D2 y B6 - B6C, se utilizó el ensayo de Unidades Formadoras de Colonias en bazo (UFC-b). Células de MO extraída de i) los ratones B6 - B6D2, en el día 14, y de ii) los ratones B6 - B6C, en

los días 7, 13-14 y 20, fue trasplantada a ratones singénicos irradiados. 12 días después del trasplante de MO, los ratones B6D2 y B6C irradiados y trasplantados con células de MO fueron sacrificados para hacer un conteo macroscópico de las colonias esplénicas y un estudio histológico de las mismas (Esquema 2).

B6 - B6C. 1) En la Tabla 4 se muestra el número de células de MO que fue extraída por cada ratón, por un fémur y una tibia en los días indicados. La cantidad de células extraídas es muy variable: de los ratones B6C control se obtuvieron entre 70 y  $165 \times 10^5$  células (en promedio  $90 \times 10^5$  células), y de los ratones B6 - B6C se obtuvieron entre 15 y  $140 \times 10^5$  células (en promedio  $79.6 \times 10^5$  células). No se aprecia una disminución significativa en la celularidad de la MO de los ratones B6 - B6C.

2) Se hicieron cortes de hueso de dos ratones B6 - B6C trasplantados con  $1.5 \times 10^8$  CB 14 días antes, y que presentaban pancitopenia moderada, y de un ratón B6C control.

En la MO de un animal control (ratón B6C de la misma edad), existe aproximadamente una proporción del 5% al 10% de tejido adiposo, de manera que del 80% al 90% corresponde a precursores de serie blanca, roja y plaquetaria, así como a formas maduras. Los vasos sinusoidales son de difícil definición dada la numerosa proporción de células precursoras de la sangre. La epífisis, la metáfisis y la diáfisis

muestran la misma celularidad, con escaso tejido adiposo. La MO de los ratones B6 - B6C muestra una imagen histológica normal (Foto 4).

3) En la tabla 5 se muestra el número de UFC-b obtenidas del trasplante de células de MO de los ratones B6 - B6C de la Tabla 3 a ratones B6C irradiados. Sólo se muestran los resultados del trasplante de MO de ratones B6 - B6C, trasplantados 7 y 14 días antes con células de bazo; los resultados de los días 13 y 20 fueron similares. Sobre la superficie de los bazos se observaron colonias de tres diferentes tamaños, que fueron clasificadas como grandes, medianas o chicas. No se observó diferencia alguna entre el número de colonias obtenidas de los ratones control trasplantados con MO de animales B6 - B6C y del obtenido de los ratones trasplantados con MO de animales B6C normales. En algunos casos, los ratones B6C irradiados que no recibieron trasplante de MO presentaron algunas colonias en el bazo.

Las colonias obtenidas de los ratones B6C trasplantados con células de MO de B6 - B6C y de B6C normal mostraron la misma imagen histológica (Foto 5). La estructura arquitectónica del bazo se encuentra parcialmente conservada; existen grandes nódulos constituidos por linfocitos, linfoblastos, macrófagos con pigmentos hemáticos, precursores y formas maduras de serie blanca y roja, hay también megacarioblastos y megacariocitos. Alrededor de los nódulos existe pulpa roja y tejido fibroconectivo con abundantes macrófagos que contienen hemosiderina en el citoplasma. Los bazos de los ratones B6C

control irradiados no trasplantados muestran hipoplasia debido a una extensa depleción de la pulpa blanca.

B6 - B6D2. 1) A diferencia de los ratones B6 - B6C, los ratones B6 - B6D2 mostraron una disminución notable en la celularidad de la MO extraída 14 días después del trasplante de CB (ver Tabla 4). La cantidad de células extraídas de los ratones B6 - B6D2 vario entre 6.5 y  $0.7 \times 10^5$  células por ratón, por un fémur y una tibia (en promedio  $4 \times 10^5$  células), mientras que del control se obtuvieron  $130 \times 10^5$  células.

2) Se hicieron cortes de hueso de tres ratones B6 - B6D2 trasplantados con  $1.5 \times 10^8$  células de bazo 14 días antes, que presentaban pancitopenia, aunque moderada, y de un animal control.

La MO de un animal control (ratón B6D2 de la misma edad), muestra básicamente la misma imagen histológica que la MO de un ratón B6C normal, con una proporción del 5% al 10% de tejido adiposo, y del 80% al 90% de precursores de serie blanca, roja y plaquetaria, y formas maduras. Es importante señalar que en el híbrido B6D2 la diáfisis muestra mayor celularidad que la epífisis y la metáfisis, y en estas últimas dos existe una mayor proporción de tejido adiposo.

En cambio, la MO de los ratones B6 - B6D2 (Foto 6) muestra una proporción entre tejido adiposo y tejido mieloides de aproximadamente del 65% al 70% a favor del primero. El tejido mieloides está

constituido fundamentalmente por precursores de serie blanca con algunas formas maduras y por precursores de serie roja. Sólo existen megacariocitos ocasionales. El componente vascular sinusoidal es focalmente prominente. Estos cambios son fundamentalmente más aparentes en la metafisis y en la epifisis del hueso. En la diáfisis la depoblación es menos aparente, con aproximadamente un 80% de tejido mielóide.

3) En el ensayo de UFC-b, los bazos de los ratones B6D2 irradiados y trasplantados con células de MO de B6D2 normal produjeron un número de colonias similar al de los ratones B6C irradiados y trasplantados con células de MO de B6 - B6C o de B6C (ver Tabla 5), y muestran la misma imagen histológica. En contraposición, las células de MO de los ratones B6 - B6D2 prácticamente no produjeron colonias en los bazos de los ratones B6D2 irradiados (Foto 7). De hecho, ni el número de colonias, ni la imagen histológica muestra diferencias entre los bazos de los ratones B6D2 irradiados y trasplantados con células de MO de ratones B6 - B6D2, y los controles irradiados no trasplantados o irradiados e inyectados con PBS (Foto 8).

Tabla 4  
 CONTEO DE CELULAS DE MO EN RATONES B6 - B6D2 Y B6 - B6C

DONADOR CB:		RECEPTOR CB:			DTCB	MOx10 <sup>5</sup>
Sexo	Edad	Nom	Sexo	Edad		
B6C						
♂	10	A	♂	7-8	7	95
♂	10	B	♂	7-8	7	75
♂	9	C	♂	7-8	7	90
-	-	ct1	♂	7-8	-	70
♂	10	D	♂	7-8	14	135
♂	9	E	♂	7-8	14	85
-	-	ct2	♂	7-8	-	165
♂	5,7		♂	7	13	25
♂	5,7		♂	7	13	51
-	-		♂	7	-	60
-	-		♂	7	-	65
♂	5,7		♂	7	20	140
♂	5,7		♂	7	20	85
♂	5,7		♂	7	20	15
-	5,7		♂	7	-	90
B6D2						
♂	7-6	a	♂	8-9	14	6.5
♂	10	b	♂	8-9	14	0.7
♂	9	c	♂	8-9	14	4.7
♂	-	ct	♂	8-9	-	130

Ratones B6D2 y B6C fueron trasplantados con  $4.5 \times 10^8$  CB de B6 y sacrificados en los días indicados en la tabla; la MO de un fémur y una tibia de cada ratón fue extraída, y las células fueron contadas por el método de exclusión de azul tripano (la MO de estos ratones fue utilizada para el experimento de la Tabla 5 - DONADORES MO). DONADOR CB: Sexo, Edad - sexo y edad (en semanas) del donador de CB; RECEPTOR CB: Nom, Sexo, Edad, DTCB, MOx10<sup>5</sup> - nombre (ver Tabla 5), sexo y edad (en semanas) del receptor de las CB, días después del trasplante de CB en que fue sacrificado, y No. de células de MO extraídas/ratón/fémur y tibia; (-) - ratones control sin trasplantar; A, B, C, D, E, a, b y c - ratones testigo; ct1, ct2 y ct - ratones normales.



Tabla 5  
No. DE UFC-b POR BAJO EN RATONES B6C Y B6D2

DONADOR MO:		RECEPTOR MO:		No. de UFC-b		
Nom	DTCB	Sexo	Edad	gde	med	ch
B6C						
A	7	♀	6	7	-	-
A	7	♀	6	9	-	2
B	7	♀	6	8	-	3
B	7	♀	6	2	-	5
C	7	♀	6	6	-	8
C	7	♀	6	-	4	-
?	7	♀	6	9	-	6
ct1	7	♀	6	7	-	2
ct1	7	♀	6	1	5	-
-	-	♀	6	-	-	-
-	-	♀	6	-	-	1
-	-	♀	6	-	-	2
-	-	♀	6	1	-	4
-	-	♀	6	-	-	-
D	14	♀	7	5	-	3
D	14	♀	7	6	-	2
E	14	♀	7	5	-	7
E	14	♀	7	9	-	3
ct2	14	♀	7	9	-	1
ct2	14	♀	7	6	-	3
-	-	♀	7	1	-	0
B6D2						
a	14	♀	8	-	1	1
a	14	♀	8	-	-	-
c	14	♀	8	-	-	-
c	14	♀	8	-	-	1
b	14	♀	8	-	3	9
ct	14	♀	8	5	6	-
ct	14	♀	8	6	5	4
-	-	♀	8	-	-	-
PBS	-	♀	8	-	1	3

Ratones B6C o B6D2 fueron irradiados y trasplantados con células de MO de los ratones B6 - B6C o B6 - B6D2, respectivamente, de la Tabla 4. 12 días después los ratones fueron sacrificados, el bazo fue extraído y fijado solución de Bouin; las colonias esplénicas fueron contadas y clasificadas por tamaños. DONADOR MO: Nom, DTCCB - ver Tabla 4, RECEPTOR CB: Nom, y DTCCB; RECEPTOR MO: Sexo, Edad, No. de UFC-s: sexo y edad del receptor de MO, y No. de colonias esplénicas grandes, medianas o chicas (gde, med, ch); PBS - ratones inyectados con PBS; (-) - ratones control irradiados sin trasplantar, o ausencia de colonias.

## DISCUSION Y CONCLUSION

En general, se procuró utilizar un mínimo de tres ratones por experimento. Desafortunadamente, no siempre fue posible contar con el número de animales deseado. En algunos casos, en los grupos B6C y CB6 sólo se utilizaron 1 ó 2 ratones por experimento. Los resultados obtenidos de estos grupos no pueden ser considerados como representativos, pero fueron incluidos porque proporcionan información útil al ser comparados con los demás grupos.

Como se observó en los resultados de sobrevivencia, peso y valores hemáticos, utilizando diferentes dosis de trasplante de CB, los ratones B6 - B6D2 desarrollaron las características de la enfermedad de ICH con un porcentaje bajo de eficiencia (30%), y a tiempos muy variables. En cambio, los ratones B6 - B6C/CB6 sólo desarrollaron citopenias no letales (aún utilizando dosis de trasplante 3 veces mayores), pero con una eficiencia del 100%, y de manera sincrónica. Esto indica que los ratones B6 - B6C/CB6 son más resistentes a la reacción de ICH que los B6 - B6D2. Por otra parte, si se comparan los resultados de los ratones B6 - B6C con los de B6 - CB6 se observa que los primeros son más resistentes a la reacción de ICH que los segundos (inclusive el trasplante de  $3.9 \times 10^7$  CB produjo pancitopenia en un ratón CB6). Por lo tanto, tanto diferencias en antígenos no relacionados con el CPH, como la dirección de la cruce pueden modificar la sensibilidad del híbrido F1 a esta reacción.

La variabilidad en respuesta que presenta el híbrido B6D2 ante el trasplante de CB no parece ser el resultado de errores técnicos. Esta más bien podría deberse a la presencia de un grado mayor de heterocigocidad en la cepa DBA/2, que en las cepas C57BL/6 y BALB/c. Esto explicaría porqué sólo un porcentaje bajo de los ratones desarrollan la enfermedad de ICH (en la literatura no se especifica si el trasplante de  $9 \times 10^7$  CB de B6 es suficiente para inducir enfermedad de ICH en el 100% de los ratones B6D2).

En todos los híbridos, los leucocitos fueron la población más sensible a la reacción de ICH, mientras que la de las plaquetas fue la más resistente. Los eritrocitos presentaron efectos intermedios, y presentaron la variación menor en los controles, por lo que parecen ser el monitor más valioso en la reacción de ICH.

En los grupos B6C Exp 1-4 se aprecia como el grado de leucopenia y eritropenia está directamente relacionado con la dosis de trasplante de CB en los híbridos B6C. Por otra parte, en los grupos Exp 3 de ratones B6 - B6D2 se utilizaron donadores y receptores de 11 a 16 semanas, mientras que en los grupos Exp 1 y 2 se utilizaron ratones de 7 a 9 semanas: el porcentaje de ratones B6D2 del Exp 3 que murió fue menor que en los grupos anteriores (datos no incluidos). Al analizar la tabla 3 (Exp 5a y 5b, y Exp 6 y 8) también se observa que la edad de los donadores y receptores de CB en los ratones B6 - B6C/CB6 puede modificar los efectos de la reacción de ICH, de tal manera que el efecto en el peso y en los valores hemáticos es mayor a medida que los

receptores y los donadores son mas jóvenes, al menos entre 7 y 9 semanas. Esto puede tener alguna relación con el estado funcional del sistema inmune del ratón joven, comparado con el ratón adulto, y tal vez sea más significativo en la edad del ratón donador de CB.

Los ratones B6 - B6D2 y los B6 - B6C/CB6 desarrollaron leucopenias y eritropenias de niveles similares, sin embargo, los primeros desarrollaron eritropenias mucho mas agudas que las que presentaron los segundos. La muerte en los ratones B6 - B6D2 fue seguramente causada por infecciones. Por lo tanto, es posible que los síntomas de la enfermedad de ICH sólo se presenten cuando existe infección, que es propiciada por un estado caracterizado por una eritropenia aguda (por lo que los ratones B6 - B6C/CB6 no resultan infectados); los ratones que no son infectados pueden recuperarse.

El efecto de la reacción de ICH sobre el tejido linfoide y de origen hemopoiético también se apreció en el bazo de ambos híbridos, aunque de manera distinta. Tres ratones B6 - B6D2 trasplantados con  $1.5 \times 10^8$  CB, con pancitopenia moderada, fueron sacrificados 14 días después del trasplante de CB; el bazo de estos ratones mostró esplenomegalia (no se hizo análisis histológico; datos no incluidos). Esto, aunado a los resultados obtenidos de los cortes de tejido indican que inicialmente se produce una esplenomegalia en ambos híbridos (evidencia en 39) probablemente, como resultado de la activación y proliferación de los linfocitos T trasplantados (evidencia en 63 y 40). Estos linfocitos T activados pueden ser

responsables del daño ocasionado al tejido linfóide y hemopoiético del bazo. De hecho, las células linfoides grandes que infiltraron el bazo podrían ser las CB trasplantadas, en proceso de activación y/o destrucción de tejido, responsables de la reacción de ICH (valdría la pena averiguar el fenotipo (Lyt-2<sup>+</sup> o L3T4<sup>+</sup>) de estas células con técnicas de inmunohistoquímica).

Sin embargo, los ratones B6 - B6C/CB6 conservan la capacidad de recuperar el tejido linfóide y hemopoiético del bazo, y tal vez hasta de montar una respuesta en contra de las células trasplantadas (fenómeno de resistencia híbrida; ver siguiente párrafo), mientras que los ratones B6 - B6D2 no pueden hacerlo. Una vez que la reacción de ICH ha cedido (según sugiere el hecho de que desaparezcan las células linfoides grandes), los ratones B6 - B6C/CB6 recuperan en gran medida la población celular y la estructura del bazo (100 días después del trasplante de CB, o antes) mientras que los ratones B6 - B6D2 no muestran recuperación del tejido linfóide, normalmente son infectados y mueren.

Se mencionó en la introducción el fenómeno de resistencia híbrida: los ratones de haplotipo H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup> son capaces de rechazar tejido normal o tumoral de origen H-2<sup>b</sup>. Esto se debe a un fenómeno de exclusión alélica de ciertos determinantes codificados en la región H-2<sup>b</sup>, que ocurre cuando está presente la región H-2<sup>d</sup>. El fenómeno de resistencia híbrida debe presentarse en ambas combinaciones de P - P1 utilizadas en este trabajo: las células parentales utilizadas para el

trasplante son H-2<sup>b</sup> en ambos casos, y ambos híbridos son H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>d</sup>. Por lo tanto, es poco probable que las diferentes susceptibilidades a la reacción de ICH observadas entre ambos híbridos sean el resultado directo del fenómeno de resistencia híbrida. Sin embargo, también es posible que, una vez iniciada la reacción de ICH, los ratones B6 - B6D2 no puedan presentar resistencia híbrida, mientras que los B6 - B6C/CB6 sí puedan hacerlo por no encontrarse tan inmunodeficientes como los primeros. Esto inclusive podría ayudar a que la reacción de ICH se resolviera con mayor rapidez en los ratones B6 - B6C/CB6.

Los efectos producidos en sangre periférica y en el bazo pueden deberse a una destrucción celular en sangre periférica y/o en el bazo, pero también pueden deberse a una destrucción celular que ocurriese directamente en la MO, y en el timo.

Como se mencionó en los resultados, el timo en los ratones B6 - B6D2 prácticamente desaparece, mientras que no se aprecian cambios en el timo de los ratones B6 - B6C/CB6. El daño en el timo es un efecto común en la reacción de ICH aguda; la apariencia histológica del timo es indistinguible de una displasia tímica, como la que ocurre en una inmunodeficiencia combinada severa (64).

Se decidió averiguar, entonces, que es lo que sucede en la MO de estos híbridos durante la reacción de ICH. Las cuentas de células extraídas de la MO, y sobre todo, los cortes de fémur indican que la reacción de ICH produce una depleción de tejido hemopoiético en la MO de los

ratones B6 - B6D2, pero no (o en menor grado) en la MO de los ratones B6 - B6C/CB6. Curiosamente, la depleción celular que ocurre en la MO de los híbridos B6D2 parece ser mayor en la epífisis y la metáfisis que en la diáfisis. Puesto que existe una mayor abundancia de tejido mielocide en la diáfisis, que en la epífisis y metáfisis de estos híbridos, es probable que el daño sea similar en todas las regiones, pero resulte más evidente en la epífisis y la metáfisis. No fue posible identificar una población de células linfoides grandes, similar a la que infiltra el bazo, en la MO de los ratones con reacción de ICH puesto que ésta presenta una variedad de células en diferentes estadios de diferenciación.

La depleción celular que se presenta en la MO y seguramente también en el timo (así como la que se presenta en sangre periférica y en el bazo) ocurre sólo en los ratones B6 - B6D2 a pesar de que ambos híbridos comparten haplotipo. Es posible que el tejido medular de ambos híbridos resulte dañado, pero mientras que los ratones B6 - B6D2 no son capaces de regenerar la MO, los B6 - B6C/CB6 responden y se recuperan de inmediato (de manera similar a lo que ocurre en el bazo).

Se observó que el daño que ocurre en el bazo de los ratones B6 - B6D2 parece ceder cuando menos alrededor de los 50 días después del trasplante de CB (en los cortes de bazo desaparece el infiltrado de células linfoides grandes). Esto sugiere que la reacción de ICH ha

ratones B6 - B6D2, pero no (o en menor grado) en la MO de los ratones B6 - B6C/CB6. Curiosamente, la depleción celular que ocurre en la MO de los híbridos B6D2 parece ser mayor en la epífisis y la metáfisis que en la diáfisis. Puesto que existe una mayor abundancia de tejido mielóide en la diáfisis, que en la epífisis y metáfisis de estos híbridos, es probable que el daño sea similar en todas las regiones, pero resulte más evidente en la epífisis y la metáfisis. No fue posible identificar una población de células linfoides grandes, similar a la que infiltra el bazo, en la MO de los ratones con reacción de ICH puesto que ésta presenta una variedad de células en diferentes estadios de diferenciación.

La depleción celular que se presenta en la MO y seguramente también en el timo (así como la que se presenta en sangre periférica y en el bazo) ocurre sólo en los ratones B6 - B6D2 a pesar de que ambos híbridos comparten haplotipo. Es posible que el tejido medular de ambos híbridos resulte dañado, pero mientras que los ratones B6 - B6D2 no son capaces de regenerar la MO, los B6 - B6C/CB6 responden y se recuperan de inmediato (de manera similar a lo que ocurre en el bazo).

Se observó que el daño que ocurre en el bazo de los ratones B6 - B6D2 parece ceder cuando menos alrededor de los 50 días después del trasplante de CB (en los cortes de bazo desaparece el infiltrado de células linfoides grandes). Esto sugiere que la reacción de ICH ha



finalizado. Sin embargo, aunque ésto suceda (si es que sucede), los ratones B6 - B6D2 no son capaces de recuperarse.

Estas dos últimas observaciones sugieren que la capacidad regenerativa de la MO restante de los ratones B6 - B6D2 puede encontrarse alterada. Debido a esto se decidió estudiar la capacidad regenerativa de la MO de los ratones B6 - B6D2, utilizando el ensayo de UFC-b.

El trasplante de células de MO da lugar a colonias clonales de células mielóide-eritroides en el bazo (UFC-b); en teoría una célula da lugar a una colonia. En un principio se consideraba que la población celular que podía generar UFC-b y las células madres totipotenciales de la MO eran la misma población. Hay evidencia reciente indica que sólo las colonias tardías (del día 12) se correlacionan con la verdadera actividad de células totipotenciales (65,66): la evolución temporal de las colonias esplénicas puede indicar el nivel de maduración de sus células progenitoras, de tal manera que se piensa que las células de MO que generan colonias esplénicas a los 8 días ya están comprometidas con una línea de diferenciación determinada, mientras que las células que generan colonias sólo después de los 12 días tienen las características de células progenitoras totipotenciales no comprometidas.

Estos estudios indican que las colonias esplénicas que se observan el día 12, se originan a partir de células progenitoras totipotenciales y a partir de células progenitoras más comprometidas hacia la línea eritroide-mielóide. Así es que el ensayo de UFC-b no sirve para

cuantificar la proporción de células progenitoras totipotenciales en la MO, pero se puede utilizar para estudiar la capacidad regenerativa de la misma.

Los resultados obtenidos de los ensayos de UFC-b indicaron que mientras que las células de MO de los ratones B6 - B6C (de 7, 13 y 20 días), B6C y B6D2 poseen la misma capacidad para formar colonias esplénicas, las células de MO de los B6 - B6D2 (de 20 días) la han perdido, o disminuido lo suficiente para no ser detectadas bajo las condiciones experimentales utilizadas. La MO de los ratones B6 - CB6 no fue explorada, pero seguramente ocurre lo mismo que en el caso de B6 - B6C.

Es importante señalar que aunque los ratones B6 - B6D2 presentaron una celularidad disminuida de la MO, se trasplantó una dosis de MO equivalente en todos los híbridos. Por lo tanto, la pérdida o disminución de UFC-b puede interpretarse de dos maneras: como una depleción específica (o proporcionalmente mayor) de las células progenitoras que dan lugar a las colonias esplénicas, o como una pérdida o supresión (generalizada o también específica) de la capacidad regenerativa de las células de MO .

Para realizar los ensayos de UFC-b se utilizaron los ratones B6 - B6D2 y B6 - B6C/CB6 que presentaron las citopenias más evidentes en sus valores hemáticos, pero los B6 - B6D2 aún no presentaban

pancitopenia aguda, ni pérdida de peso. Es lógico suponer que los efectos en la MO deben ser más evidentes en los ratones B6 - B6D2 que presentan pancitopenia aguda y el resto de los síntomas característicos.

Los resultados obtenidos con los ratones B6 - B6D2 coinciden con lo observado en otros trabajos recientes. En la reacción de ICH aguda inducida a través de diferencias en las moléculas del CPH se produce una disminución en la capacidad proliferativa de la MO (medida en ensayos de UFC-b o en ensayos de incorporación de 5-iodo-2'-desoxiuridina) de los ratones con reacción de ICH; este fenómeno también va acompañado de una disminución del 50% en el número de células de MO extraídas de fémur y tibia. Ambas disminuciones se detectan desde los 22 días y aún se observan 66 días después del trasplante de CB [DTCB] (64, 67). Además, el grado de reducción en el número de CFU-s depende de la dosis de células de bazo trasplantadas, y sólo ocurre cuando existe disparidad tanto en las moléculas de Clase I como de Clase II, entre el padre y el híbrido. En el caso de los ratones B6 - B6D2 presentados en este trabajo, la disminución de células de MO es mucho mayor al 50%.

La disminución en la capacidad proliferativa está asociada a defectos en la producción y en la función de los linfocitos B, y en la producción de linfocitos T citotóxicos que reconocen antígenos propios asociados a TNP, y aloantígenos (64, 67).

Por lo tanto, y en conclusión, la reacción de ICH produce daño en tejido linfoide y hemopoiético. Este daño puede observarse (cuando menos) en sangre periférica, en el bazo, en el timo y en la MO. El daño en el bazo puede ser parcialmente responsable de las citopenias observadas en sangre periférica. Pero lo que determina el proceso de una enfermedad de ICH aguda y letal, es lo que ocurre en la MO (y probablemente también en el timo). Si la MO resulta depletada, y su función proliferativa alterada, los ratones con reacción de ICH no pueden reponerse a la depleción de tejido linfoide y hemopoiético, y no pueden restablecer sus funciones inmunes. En cambio, si la MO no resulta afectada, los ratones pueden reponerse y restablecer sus funciones inmunológicas. Nuestros resultados indican que la recuperación puede suceder independientemente de la magnitud de la reacción de ICH aguda (inclusiva cuando ésta ocurre a través de diferencias en todo el CPH), y de los efectos que ésta tenga en el bazo y en sangre periférica (recordemos que en B6 ~ B6D2 y en B6 - B6C/CB6 las leucopenias, plaquetopenias y esplenomegalia alcanzan niveles comparables): el requisito indispensable, es que la MO no resulte afectada (cuando menos de manera significativa), y que los ratones no sean infectados. La disminución en la capacidad proliferativa de las células de MO está asociada con la depleción de tejido hemopoiético. No sabemos si ambos efectos tienen la misma causa, o son el resultado de procesos distintos.

La pregunta obvia es: ¿Qué determina que la MO de los ratones B6 - B6D2 sea sensible a la reacción de ICH aguda, mientras que la de los ratones B6 - B6C/ CB6 no? La observación popular es que el daño está dirigido principalmente contra el tejido de origen hemopoiético en general (incluyendo el derivado del timo).

Hay datos que apoyan la teoría de que el daño causado en la reacción de ICH aguda (al menos durante los primeros días después del trasplante de linfocitos) es causado directamente por células: linfocitos T citotóxicos/supresores que reconocen moléculas del CPH del haplotipo no conocido por las células del padre, en las combinaciones P - F1, que puedan suprimir específicamente la proliferación de células de MO F1 in vivo (63, 67), y no por factores solubles como linfocinas (la reacción de ICH produce alteraciones en los patrones de secreción de varias linfocinas).

El hecho mismo de que la MO de los ratones B6 - B6D2, pero no la de B6 - B6C/CB6, resulta dañada refleja que el efecto en la MO difícilmente puede ser causado por factores solubles, y más bien se trata de un proceso específico (de lo contrario habría que postular que la MO de los ratones B6 - B6C/CB6 es menos sensible a estos factores solubles que la MO de los B6 - B6D2, y esto resulta poco probable).

Puesto que la reacción de ICH puede estar restringida por diferencias exclusivamente en las moléculas del CPH, y existen datos que indican que el tejido de origen hemopoiético es el tejido que expresa con mayor abundancia moléculas del CPH (principalmente de clase I) sobre su

superficie, se ha propuesto que éste es el motivo por el cual el daño está dirigido de manera específica (o cuando menos en mayor proporción) contra todo el tejido de origen hemopoiético. Entonces, se puede postular que el tejido de la MO, es decir, el tejido hemopoiético más indiferenciado, de los ratones B6C/CB6 expresa en su superficie una menor densidad de moléculas del CPH, que el de los ratones B6D2.

Existe un posibilidad aún más atractiva. La reacción de ICH aguda también puede estar restringida por antígenos menores presentados en el contexto de moléculas del CPH. Por lo tanto, es posible que la reacción de ICH en la MO de los ratones B6D2 esté restringida por fragmentos de antígeno(s) menores que no están presentes en la MO de los ratones B6C/CB6, y que puedan estar presentados en el contexto de moléculas del CPH de haplotipo H-2<sup>d</sup> o H-2<sup>b</sup>. Esto no excluye la posibilidad de que este antígeno o antígenos también pudieran expresarse en el tejido de origen hemopoiético maduro (al que se aloja en los órganos linfoides secundarios) de ambos híbridos, y también restringiera la reacción de ICH en estos tejidos. Resultaría interesante explorar esta posibilidad, utilizando ratones BALB/c - BALB/c x DBA/2, para ver si los BALB/c pueden reconocer este antígeno o antígenos que sólo están presentes en el fondo genético de DBA/2.

Finalmente, hay datos que indican que el daño causado en el timo de ratones por irradiación, enfermedad de ICH aguda, y la administración de Ciclosporina A puede producir una reducción en la

eliminación de linfocitos T autorreactivos y en la producción de linfocitos T regulatorios; el mismo daño experimental causado en el timo por irradiación y/o ciclosporina A produce enfermedad de ICH crónica (68). Esto nos habla de la importancia de un timo sano para la recuperación de la reacción de ICH aguda: una consecuencia común en la enfermedad de ICH, es la progresión hacia una enfermedad crónica, debido a un desbalance entre los linfocitos T autorreactivos, y los linfocitos T reguladores correspondientes, y se propone que esto se origina por una falta de selección en el timo. Ninguno de los ratones B6 - B6C/CB6 mostró características de una enfermedad crónica, posterior a las citopenias. Esto sugiere que, al igual que la MO, el timo de estos ratones tampoco sufrió daños.

## ABREVIATURAS

AN	células Asesinas Naturales
CB	células totales de bazo
MO	Médula Osea
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CML	Cultivo Mixto de Linfocitos
HLA	CPH en humanos
H-2	CPH en el ratón
ICM	Injerto contra Hospedero
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
LGL	linfocitos grandes granulares
LTC	linfocitos T citotóxicos
RCT	Receptor de Célula T
TMS	tiempo medio de sobrevivida
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
A - B(r)	ratones B irradiados y trasplantados con CB de A.
P - F1(r)	ratones híbridos F1 irradiados y trasplantados con CB de uno de los padres.
P - F1	ratones híbridos F1 trasplantados con CB de uno de los padres.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Hansen T.H. and Sachs H. The Major Histocompatibility Complex. Fundamental Immunology. Paul. 1989, segunda edición. Raven press. pg. 451-452.
- 2) Reginald A. Clift y Rainer Storb. Histoincompatible Bone Marrow Transplants in Humans. Ann. Rev. Immunol. 1987, vol.5, pg.43-64
- 3) Robertson Parkman, (1991). Graft-versus-Host-Disease. Annu. Rev. Med. 42:189-197.
- 4) Alzari P.M., M.-B. Lascombe and P.J. Poljak, (1988). Three-Dimensional Structure of Antibodies. Ann. Rev. Immunol. 6:555-580.
- 5) Yancopoulos G.D. and F.W. Alt, (1986). Regulation of the Assembly and Expression of Variable-Region Genes. Ann. Rev. Immunol 4:339-368.
- 6) Storb U., (1987). Transgenic Mice with Immunoglobulin Genes. Ann. Rev. Immunol. 5:151-174.
- 7) Edward A. Clark and Peter J. L. Lane, (1991). Regulation of Human B-cell Activation and Adhesion. Ann. Rev. Immunol. 9:97-127
- 8) Finkelman F.D., J. Holmes, I.M. Katona, J.F. Urban, Jr., M.P. Beckmann, L.S. Park, K.A. Schooley, R.L. Coffman, T.R. Mosmann and W.E. Paul, (1990). Lymphokine Control of In Vivo Immunoglobulin Isotype Selection. Ann. Rev. Immunol 8:303-334.
- 9) Esser C. and A. Radbruch, (1990). Immunoglobulin Class Switching: molecular and cellular analysis. Ann. Rev. Immunol. 8:717-734.
- 10) Vitetta, E.S., M.T. Berton, C. Burger, M. Kepron, W.T. Lee and X-M. Yin, (1993). Memory B and T cells. Ann. Rev. Immunol. 9:193-217.
- 11) Melchers F. and J. Andersson, (1986). Factors Controlling the B-Cell Cycle. Ann. Rev. Immunol. 4:13-36.
- 12) Kocks C. and K. Rajewsky, (1989). Stable Expression and Somatic Hypermutation of Antibody V Regions in B-Cell Developmental Pathways. Ann. Rev. Immunol. 7: 537-559.
- 13) Goodnow C.C., S. Adelstein and A. Bastain, (1990). The Need for Central and Peripheral Tolerance in the B Cell Repertoire. Science 248:1373-1379.
- 14) Hansen T.H., D.G. Spinella, D.R. Lee and D.C. Shreffler, (1984). The Immunogenetics of the Mouse Major Histocompatibility Gene Complex. Ann. Rev. Genet. 18:99-129.
- 15) Rothbard J.B. and M.L. Gelfer, (1991). Interactions Between Immunogenic Peptides and MHC Proteins. Ann. Rev. Immunol. 9:527-565.

- 16) Germain R.N., (1991). The Second Class Story. *Nature* 353: 605-607.
- 17) Brodsky F.M. y L. Guagliardi, (1991). The Cell Biology of Antigen Processing and Presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 9:707-744.
- 18) Raulet D.H., (1990). The Structure, Function, and Molecular Genetics of the  $\gamma$  & T Cell Receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 8:175-208.
- 19) Williams A.F. and A.N. Barclay, (1988). The Immunoglobulin Superfamily - Domains for Cell Surface Recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-406.
- 20) Matis L.A., (1990). The Molecular Basis of T-Cell Specificity. *Ann. Rev. Immunol.* 8:65-82
- 21) Clevers H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst, (1988). The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* 6:629-662.
- 22) Kupfer A. and S.J. Singer, (1989). Cell Biology of Cytotoxic and Helper T-Cell Functions. *Ann. Rev. Immunol* 7:309-338.
- 23) Allison J.P.y L.L. Lanier, (1987). The Structure, Function, and Serology of the T-Cell Antigen Receptor Complex. *Ann. Rev. Immunol.* 5:503-540.
- 24) Podack E.R., H. Hengartner and M.G. Lichtenheld, (1991). A Central Role of Perforin in Cytolysis? *Ann. Rev. Immunol.* 9:129-157.
- 25) Tschopp J. and M. Nabholz, (1990). Perforin-Mediated Target Cell Lysis by Cytolytic T Lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 8:279-302.
- 26) Immunologic Tolerance and the Regulation of Immune Responses. Cellular and Molecular Immunology. Abbas A.K., A.H. Lichtman and J.S. Fauci. 1991 primera edición. pg.211-215. 1991.
- 27) Allison J.P. and W.L. Havran, (1991). The Immunobiology of T cells with Invariant  $\alpha\delta$  Antigen Receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 679-705.
- 28) von Boehmer H., (1990). Developmental Biology of T Cells in T Cell Receptor Transgenic Mice. *Ann. Rev. Immunol.* 8:531-556.
- 29) Arnold B. and G.J. Hammerling, (1991). MHC Class-I Transgenic Mice. *Ann. Rev. Immunol.* 9:297-322.
- 30) van Ewijk W., (1991). T-cell Differentiation is Influenced by Thymic Microenvironments. *Ann. Rev. Immunol.* 9:591-615.
- 31) von Boehmer H. and P. Kisielow, (1990). *Science* 248:1369-1373.
- 32) Dent A.L., L.A. Matis, F. Hooshmand, S.M. Widacki, J.A. Bluestone and S.M. Hedrick, (1990). *Nature* 343:714-719.

- 16) Germain R.N., (1991). The Second Class Story. *Nature* 353: 605-607.
- 17) Brodsky F.M. y L. Guagliardi, (1991). The Cell Biology of Antigen Processing and Presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 9:707-744.
- 18) Raulat D.H., (1990). The Structure, Function, and Molecular Genetics of the  $\alpha/\beta$  T Cell Receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 8:175-208.
- 19) Williams A.F. and A.N. Barclay, (1988). The Immunoglobulin Superfamily - Domains for Cell Surface Recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-406.
- 20) Matis L.A., (1990). The Molecular Basis of T-Cell Specificity. *Ann. Rev. Immunol.* 8:65-82
- 21) Clevers H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst, (1988). The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* 6:629-662.
- 22) Kupfer A. and S.J. Singer, (1989). Cell Biology of Cytotoxic and Helper T-Cell Functions. *Ann. Rev. Immunol* 7:309-338.
- 23) Allison J.P.y L.L. Lanier, (1987). The Structure, Function, and Serology of the T-Cell Antigen Receptor Complex. *Ann. Rev. Immunol.* 5:503-540.
- 24) Podack E.R., H. Hengartner and M.G. Lichtenheld, (1991). A Central Role of Perforin in Cytolysis? *Ann. Rev. Immunol.* 9:129-157.
- 25) Tschopp J. and M. Nabholz, (1990). Perforin-Mediated Target Cell Lysis by Cytolytic T Lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 8:279-302.
- 26) Immunologic Tolerance and the Regulation of Immune Responses. Cellular and Molecular Immunology. Abbas A.K., A.H. Lichtman and J.S. Pober. 1991 primera edición. pg.211-215. 1991.
- 27) Allison J.P. and W.L. Havran, (1991). The Immunobiology of T cells with Invariant  $\alpha\delta$  Antigen Receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 679-705.
- 28) von Boehmer H., (1990). Developmental Biology of T Cells in T Cell Receptor Transgenic Mice. *Ann. Rev. Immunol.* 8:531-556.
- 29) Arnold B. and G.J. Hammerling, (1991). MHC Class-I Transgenic Mice. *Ann. Rev. Immunol.* 9:297-322.
- 30) van Ewijk W., (1991). T-cell Differentiation is Influenced by Thymic Microenvironments. *Ann. Rev. Immunol.* 9:591-615.
- 31) von Boehmer H. and P. Kisielow, (1990). *Science* 248:1369-1373.
- 32) Dent A.L., L.A. Matis, F. Hooshmand, S.M. Widacki, J.A. Bluestone and S.M. Hedrick, (1990). *Nature* 343:714-719.

- 33) Hammerling G.J., G. Schonrich, F. Momburg, N. Auphan, M. Malissen, B. Malissen, A.-M. Schmitt-Verhulst and B. Arnold, (1991). Immunological Reviews 122:47-67.
- 34) Effector Cells of Cell-Mediated Immunity. Cellular and Molecular Immunology. Abbas A.K., A.H. Lichtman and J.S. Pober. 1991, primera edición. pg. 256-258.
- 35) Ljunggren H.-G. and K. Karre, (1990). In Search of the "Missing Self": MHC molecules and NK cell recognition. Immunology Today 11:237-244.
- 36) Cells and Tissues of the Immune System, and Effector Cells of Cell-Mediated Immunity. Cellular and Molecular Immunology. Abbas A.K., A.H. Lichtman and J.S. Pober. 1991, primera edición. pg. 19-22, 251-253.
- 37) Adams D.O. and T.A. Hamilton, (1984). The Cell Biology of Macrophage Activation. Ann. Rev. Immunol. 2:283-318.
- 38) Cudkovicz, G., (1961). Evidence for immunization of F1 hybrid mice against parental transplantation antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107:968
- 39) Gleichmann, E., S.T. Pals, A.G. Rolink, T. Radaszkiewicz and H. Gleichmann, (1984). Graft-versus-Host Reactions: clues to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases. Immunology Today 5:324-332.
- 40) Pickel K. and Hoffmann M.K. 1977. Suppressor T cells Arising in Mice Undergoing a GvH Response. J. of Immunol. 118:653-657.
- 41) Shearer G.M. and Polisson R.P. 1980. Mutual Recognition of Parental and F1 Lymphocytes. J. of Exp. Med. 151:20-31
- 42) Shearer G.M. and Levy R.B. 1983. Graft-versus-Host-Associated Immune Suppression is Activated by Recognition of Allogeneic Murine I-A Antigens. J. Exp. Med. 157:936-946.
- 43) Moser M., Sharrow S.O. and Shearer G.M. 1988. Role of L3T4+ and Lyt-2+ Donor Cells in Graft-versus-Host Immune Deficiency Induced Across a Class I, Class II, or Whole H-2 Difference. J. Immunol. 140:2600-2608.
- 44) T-Cell Subsets in Graft-vs.-Host Disease. Graft-versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment. Burakoff S.J., H.J. Dreeg, J. Ferrara and K. Atkinson. 1990, primera edición. pg. 31-41.

- 45) Sprent J., M. Schaefer, E.R. Gao and R. Korngold, (1988). Role of T cell Subsets in Lethal Graft-versus-Host Disease (GVHD) Directed to Class I versus Class II H-2 Differences. I. L3T4<sup>+</sup> cells can either augment or retard GVHD elicited by Lyt-2<sup>+</sup> cells in Class I-different hosts. *J. Exp. Med.* 167:556-569.
- 46) T-cell Subsets in Graft-vs.-Host Disease. Graft-versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment. Burakoff S.J., H.J. Deeg, J. Ferrara and K. Atkinson. 1990, primera edición. pg: 41-47.
- 47) Riccardi C., A. Santoni, T. Barlozzari and R.B. Herberman, (1981). In Vivo Reactivity of Mouse Natural Killer (NK) Cells against Normal Bone Marrow Cells. *Cell. Immunol.* 60:136-143.
- 48) Ohlen C., G. Kling, P. Hoglund, M. Hansson, G. Scangos, C. Bieberich, G. Jay and K. Karre, (1989). Prevention of Allogeneic Bone Marrow Graft Rejection by H-2 Transgene in Donor Mice. *Science* 246:666-668.
- 49) Hoglund P., H.-G- Ljunggren, D. Ohlen, L. Ahrlund-Richter, G. Scangos, C. Bieberich, G. Jay, G. Klein and K. Karre, (1988). Natural Resistance Against Lymphoma Grafts Conveyed by H-2D<sup>d</sup> Transgene to C57BL Mice. *J. Exp. Med.* 168: 1469-1474.
- 50) Rembecki R.M., M. Bennett, V. Kumar and T.A. Potter, (1987). Expression of Hemopoietic Histocompatibility Antigens on H-2 Loss Variants of F1 Hybrid Lymphoma Cells: evidence consistent with trans gene regulation. *J. Immunol.* 138:2734-2738.
- 51) T-Cell Subsets in Graft-vs.-Host Disease. Graft-versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment. Burakoff S.J., H.J. Deeg, J. Ferrara and K. Atkinson. 1990, primera edición. pg. 19-20.
- 52) T-Cell Subsets in Graft-vs.-Host Disease. Graft-versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment. Burakoff S.J., H.J. Deeg, J. Ferrara and K. Atkinson. 1990, primera edición. pg. 22-24.
- 53) Levy R.B., M. Jones and C. Cray, (1990). Isolated Peripheral T cells from GVHR Recipients Exhibit Defective IR Expression, Il-2 Production, and Proliferation in Response to Activation Stimuli. *J. Immunol.* 145:3998-4005.
- 54) Smith S.R., C. Terminelli, L. Kenworthy-Bott and D.L. Phillips, (1991). A Study of Cytokine Production in Acute Graft-vs-Host Disease. *Cell. Immunol.* 134:336-348.

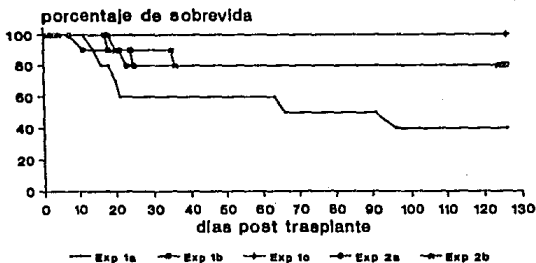
- 55) T-Cell Subsets in Graft-vs.-Host Disease. Graft-versus-Host Disease: Immunology, Pathophysiology and Treatment. Burakoff S.J., H.J. Deeg, J. Ferrara and K. Atkinson. 1990, primera edición. pg. 20-21.
- 56) Sprent J. and J.F.A.P. Miller, (1972). Interaction of Thymus Lymphocytes with Histoincompatible Cells. I. Quantitation of the Proliferative Response of Thymus Cells. *Cel. Immunol.* 3:361-384.
- 57) Morahan G., F.E. Brennan, P.S. Bhathal, J. Allison, K.O. Cox and J.F.A.P. Miller, (1989). Expression in Transgenic Mice of Class I Histocompatibility Antigens Controlled by the Metallothionein Promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3782-3786.
- 58) Parrott D.M.V., M.A.B. de Sousa and J. East, (1966). Thymus-Dependent Areas in the Lymphoid Organs of Neonatally Thymectomized Mice. *J. Exp. Med.* 123:191-203.
- 59) Sprent J. and J.F.A.P. Miller, (1972). Interaction of Thymus Lymphocytes with Histoincompatible Cells. II. Recirculating Lymphocytes Derived From Antigen-Activated Thymus Cells. *Cel. Immunol.* 3: 385-404.
- 60) Rolink, A.G., T. Radaszkiewicz, S.T. Pals, W.G.J. van der Meer and E. Gleichmann, (1982). Allosuppressor and Allohelper T cells in Acute and Chronic Graft-vs.-Host Disease. *J. Exp. Med.* 155: 1501-1522.
- 61) Kisielow P., H.S. Teh, H. Bluthmann and H. von Boehmer, (1989). Positive Selection of Antigen-Specific T Cells in Thymus by Restricting MHC Molecules. *Nature* 322:730-733.
- 62) Via C.S. and G.M. Shearer, (1988). T-cell Interactions in Autoimmunity. *Immunology Today*: 9:207-213.
- 63) Rolink A.G., T. Radaszkiewicz, S.T. Pals, W.G.J. van der Meer and E. Gleichmann, (1982). Allosuppressor and Allohelper T cells in Acute and Chronic Graft-vs.-Host Disease. *J. Exp. Med.* 155: 1501-1522.
- 64) Seddik M., T.A. Seemayer and W.S. Lapp, (1986). The Graft-versus-Host Reaction and Immune Function. IV. B cell functional defect associated with a depletion of Splenic Colony-Forming Units in Marrow of Graft-versus-Host Reactive Mice. *Transplantation* 41:242-247.
- 65) Spangrude G.J., S. Heimfeld, I.L. Weissman, (1988). Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Science* 241:58-62.

66) Visser J.W.M., M.G.C. Hogeweg-Platenburg, P. de Vries, J. Bayer, and R.E. Ploemacher. Culture of Purified Pluripotent Haemopoietic Stem Cells. The Biology of Hematopoiesis; Ed. Wiley-Liss, vol:352, 1990.

67) Iwasaki T., H. Fujiwara, T. Iwasaki and F.M. Shearer, (1986). Loss of Proliferative Capacity and T cell Immune Development Potential by Bone Marrow from Mice Undergoing a Graft-vs.-Host Reaction. *J. Immunol.* 137:3100-3108.

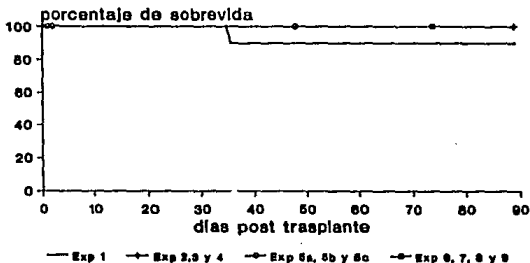
68) Parkman R., (1989). Graft-versus-Host Disease: an alternative hypothesis. *Immunology Today.* 10:362-364.

## B6D2 exp 1 y 2 Sobrevida



Gráfica 1. La gráfica muestra las curvas de supervivencia de los ratones B6 B6D2 de los grupos B6D2 Exp 1a, 1b, 1c, 2a y 2b (ver Tabla 1).

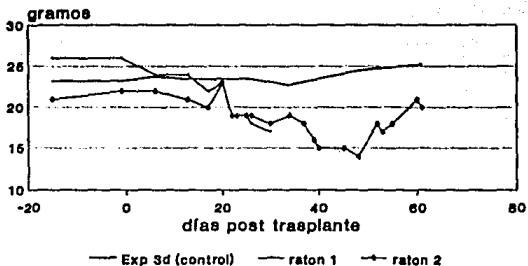
## B6C y CB6 exp 1-9 Sobrevida



Gráfica 2. La gráfica muestra las curvas de supervivencia de los ratones B6 B6C/CB6 de los grupos B6C/CB6 Exp 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 5c, 6, 7, 8 y 9 (ver Tabla 2). Los experimentos finalizaron el día en que aparece por última vez el marcador de línea.

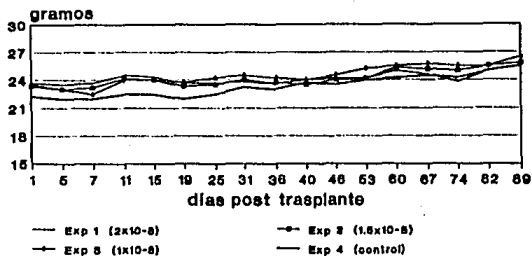


## B6D2 peso



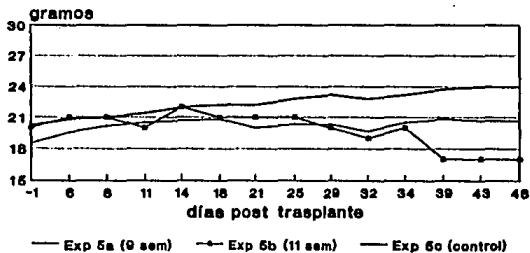
Grafica 3. El trasplante de CB produjo una disminución variable en cantidad y en el tiempo, del peso de los híbridos B6D2. La gráfica muestra la cinética del peso de dos ratones B6 → B6D2 del grupo B6D2 Exp 3b, y el promedio de los cuatro ratones del Exp 3d. Uno de los dos ratones murió alrededor del día 30, y el otro se recuperó.

## B6C Exp 1-4 Peso



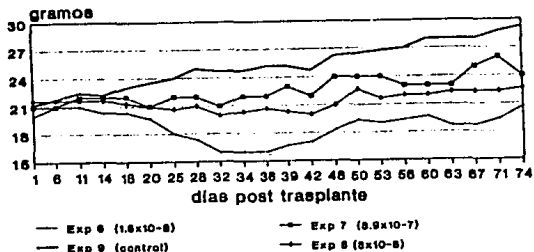
Gráfica 4

## B6C Exp 5 Peso



Gráfica 5

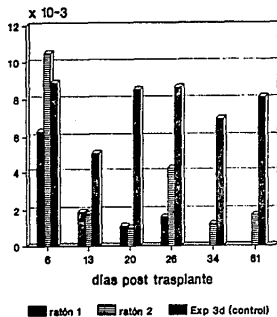
## CB6 Exp 6-9 Peso



Gráfica 6

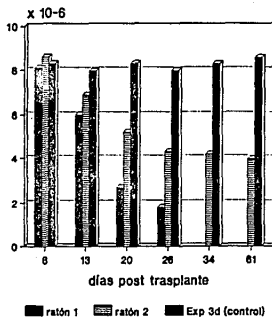
Gráficas 4, 5 y 6. El trasplante de CB produjo una disminución sincrónica en el peso de los híbridos B6C y CB6. Las Gráficas 4, 5 y 6 muestran la cinética del promedio de los pesos de los animales de los grupos B6C Exp 1, 2, 3 y 4, de los grupos B6C Exp 5a, 5b, 5c y de los grupos CB6 Exp 6, 7, 8 y 9, respectivamente. Sólo se promedió el peso de los ratones que presentaron disminución de peso: en la Gráfica 5, Exp 5b, sólo se graficó el peso de uno de dos ratones; en la Gráfica 6, Exp 8, sólo se promedió el peso de 3 ratones de un grupo de 4; en el resto de las gráficas se promedió el peso de todos los ratones del grupo.

### B6D2 Leucocitos



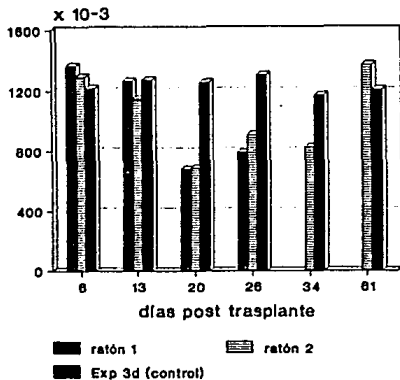
Gráfica 7a

### B6D2 Eritrocitos



Gráfica 7b

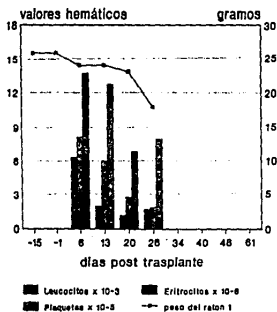
## B6D2 Plaquetas



Gráfica 7c

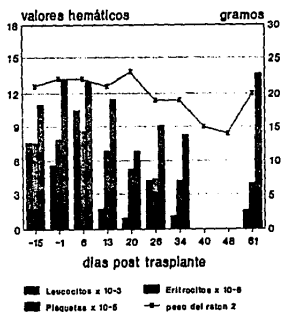
Gráficas 7a, 7b y 7c. El trasplante de CB produjo una pancitopenia variable en el tiempo y en la gravedad, en los híbridos B6D2. En las Gráficas a, b y c se muestran las cinéticas de las cuentas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, respectivamente, de sangre periférica de los dos ratones referidos en la Gráfica 3, y las cinéticas del promedio de los cuatro ratones del grupo control 3d. Cuando los ratones se encontraron muy disminuidos de peso y con anemia aguda no fue posible obtener muestra de sangre.

## B6D2 ratón 1 Peso y Valores Hemáticos



Gráfica 8

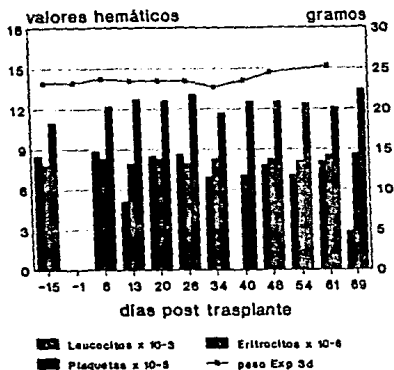
## B6D2 ratón 2 Peso y Valores Hemáticos



Gráfica 9

## B6D2

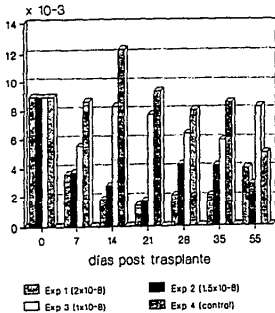
### Peso y Valores Hemáticos



Gráfica 10

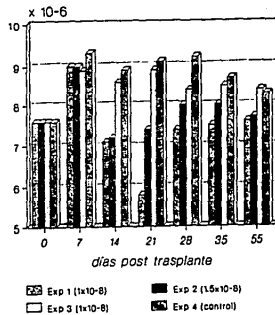
Gráficas 8, 9 y 10. En las Gráficas 8, 9 y 10 se muestran simultáneamente las cinéticas del peso y de los valores hemáticos del ratón 1 y del ratón 2 del grupo B6D2 Exp 3b, y del promedio de los cuatro ratones del grupo control Exp 3b, respectivamente.

### B6C Exp1-4 Leucocitos



Gráfica 11a

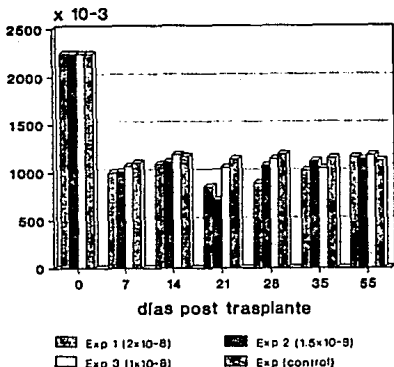
### B6C Exp1-4 Eritrocitos



Gráfica 11b



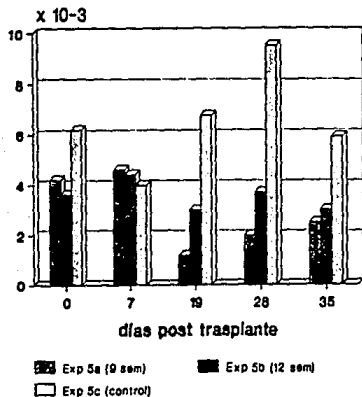
## B6C Exp1-4 Plaquetas



Gráfica 11c

Gráficas 11a, 11b y 11c. El trasplante de CB produjo citopenias sincronicas, y proporcionales a la dosis de trasplante en los grupos de ratones B6C Exp 1, 2, 3 y 4. En las Gráficas a, b y c se muestran las cinéticas de los promedios de las cuentas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, respectivamente, de todos los animales de cada uno de estos grupos.

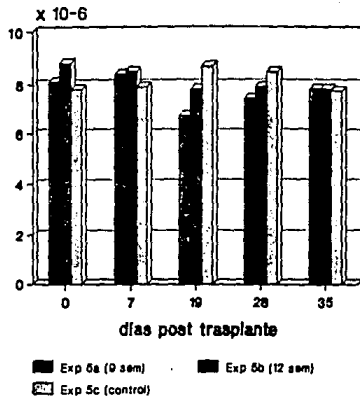
## B6C Exp 5 Leucocitos



Gráfica 12a

Dosis de trasplante:  $1.5 \times 10^{-8}$

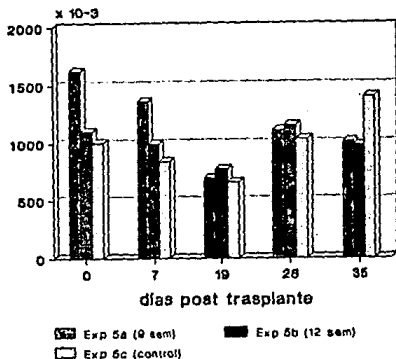
## B6C Exp 5 Eritrocitos



Gráfica 12b

Dosis de trasplante:  $1.5 \times 10^{-8}$

## B6C Exp 5 Plaquetas

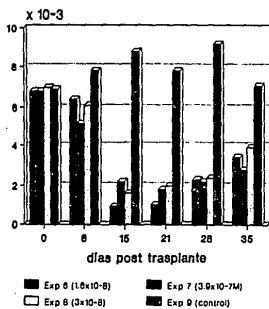


Dosis de trasplante:  $1.5 \times 10^{-8}$

Gráfica 12c

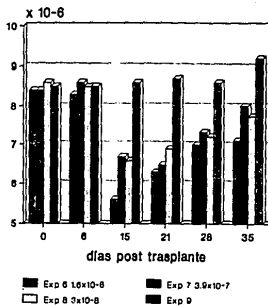
Gráficas 12a, 12b y 12c. El trasplante de CB produjo citopenias sincrónicas, y dependientes de la edad de los donadores de CB en los grupos de ratones B6C Exp 5a, 5b y 5c. En las Gráficas a, b y c se muestran las cinéticas de los promedios de las cuentas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, respectivamente, de todos los animales de cada uno de estos grupos.

### CB6 Exp 6-9 Leucocitos



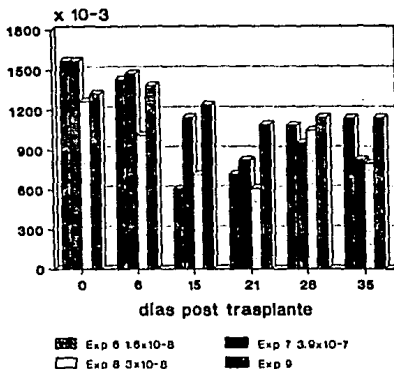
Gráfica 13a

### CB6 Exp 6-9 Eritrocitos



Gráfica 13b

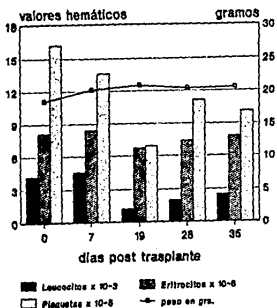
## CB6 Exp 6-9 Plaquetas



Gráfica 13c

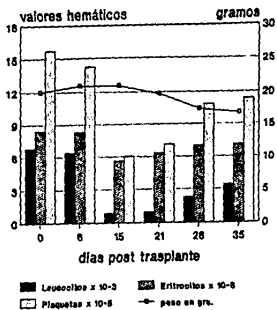
Gráficas 13a, 13b y 13c. El trasplante de CB produjo citopenias sincrónicas en los grupos de ratones CB6 Exp 6, 7, 8 y 9. En las Gráficas a, b y c se muestran las cinéticas de los promedios de las cuentas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, respectivamente, de todos los animales de cada uno de estos grupos.

## B6C Exp 5a Peso y Valores Hemáticos



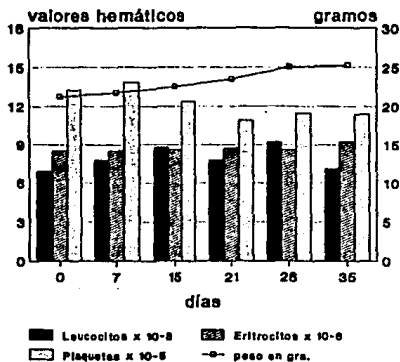
Gráfica 15

## B6C Exp 6 Peso y Valores Hemáticos



Gráfica 14

## CB6 Exp 9 control Peso y Valores Hemáticos



ratones sin trasplantar

Gráfica 16

Gráficas 14, 15 y 16. En las Gráficas 14, 15 y 16 se muestran simultáneamente las cinéticas de los promedios del peso y de los valores hemáticos de los grupos CB6 Exp 6, B6C Exp 5a y del grupos control CB6 Exp 9, respectivamente.



Foto 1) En la foto se muestra el bazo de un ratón B6D2 normal. La imagen es muy similar a la de los ratones B6D2 normales (aumento 40X).

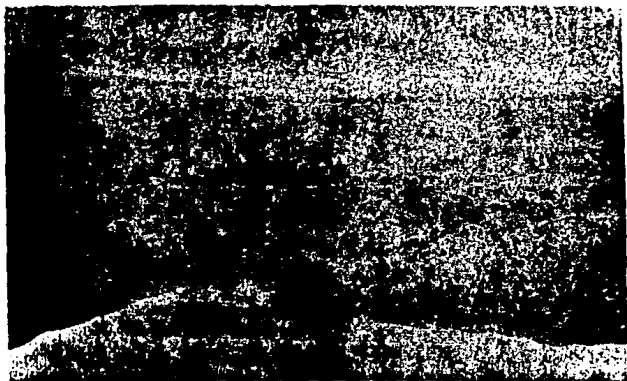


Foto 2) En la foto se muestra el bazo de un ratón B6 → B6D2 que desarrollo los síntomas característicos de la enfermedad de ICH, y que fue sacrificado a los 66 días después del trasplante de CB (aumento 40X).



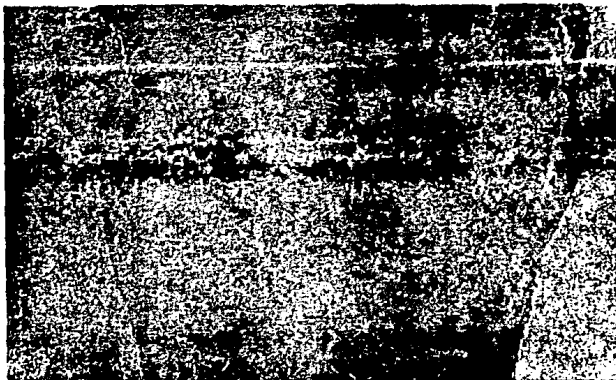


Foto 3) En la foto se muestra el bazo de un ratón B6 → B6C que fue sacrificado a los 13 días después del trasplante de CB (aumento 40X).



Foto 4) En la foto se muestra la epifisis del fémur de un ratón B6D2 normal. La imagen histológica de los ratones B6C normales y la de los B6 → B6C a los 14 días después del trasplante de CB son prácticamente indistinguibles de esta imagen (aumento 40X).

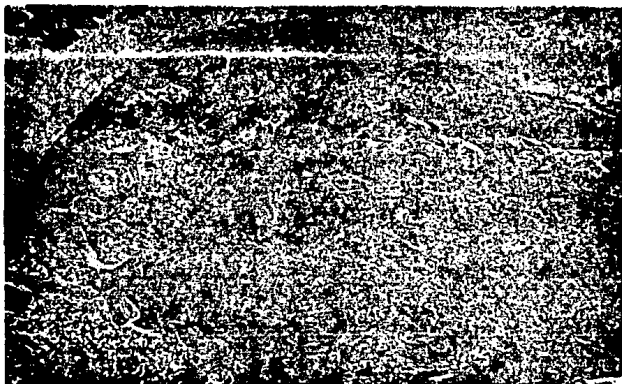


Foto 5) En la foto se muestra la epífisis del fémur de un ratón B6 → B6D2 que fue sacrificado a los 14 días después del trasplante de CB (aumento 40X).

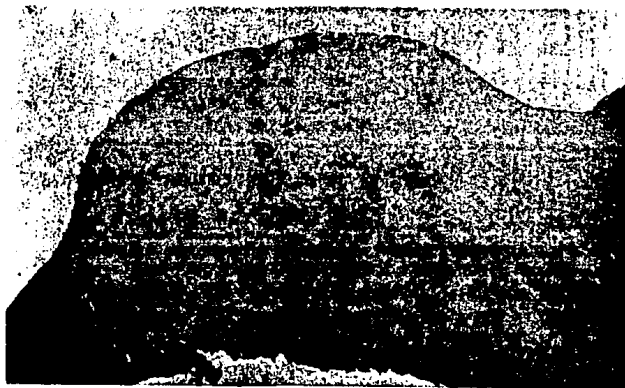


Foto 6) En la foto se muestra una colonia esplénica (UFC-b) en el bazo de un ratón B6C que fue trasplantado con MO de ratones B6 → B6C 12 días antes (aumento 40X).

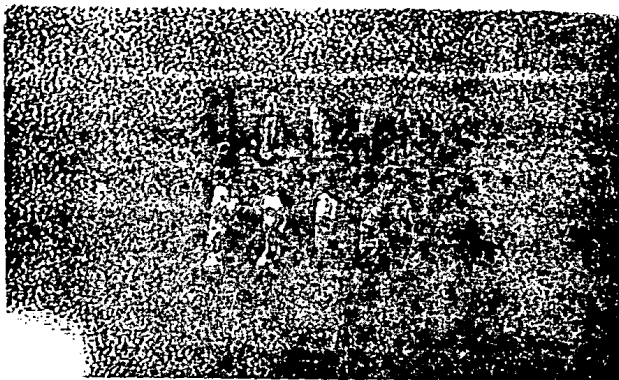


Foto 7) En la foto se muestran algunos de los bazo obtenidos del trasplante de MO de ratones B6 → B6D2 (los cinco bazo de la parte superior), los controles positivos (MO de ratones B6D2 normales - los dos primeros bazo de la parte inferior) y los controles negativos (ratones irradiados sin trasplantar - los tres últimos bazo de la parte inferior).

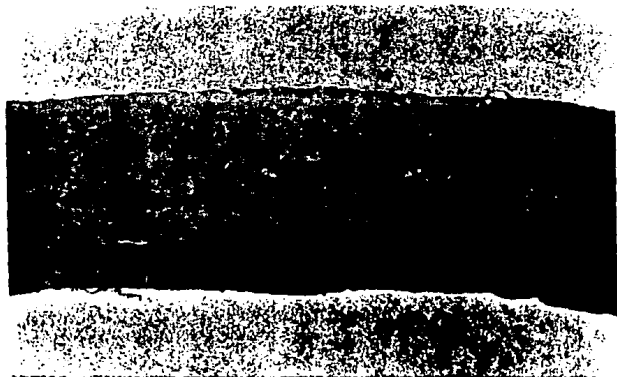
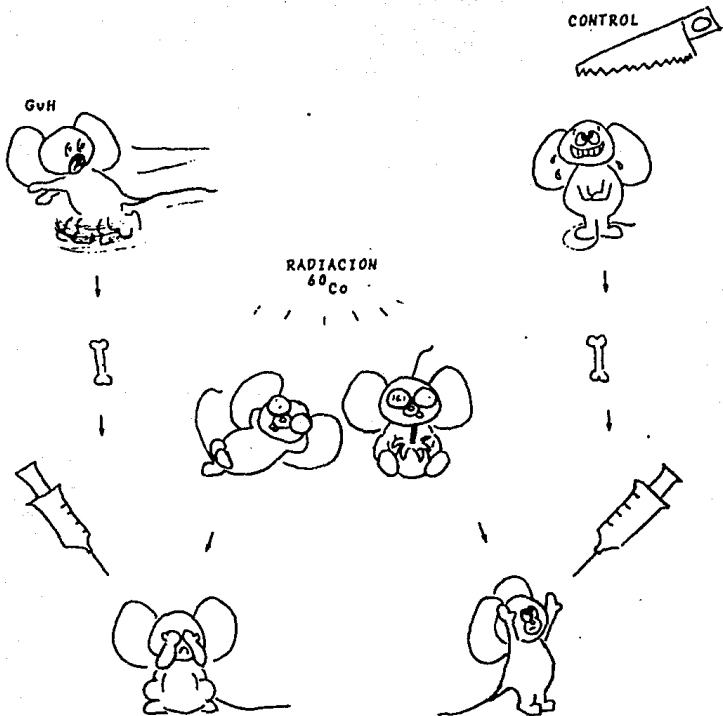


Foto 8) En la foto se muestra el bazo de un ratón B6D2 que fue trasplantado con MO de ratones B6 → B6D2 12 días antes. La imagen es prácticamente indistinguible de la de un ratón B6D2 o B6C irradiado y sin trasplantar (aumento 40X).





Esquema 2) Se extrajeron células de MO de ratones B6 + B6D2 y B6 → B6C (GvH), trasplantados varios días antes con CB, y de ratones control no trasplantados (CONTROL) y se trasplantaron en ratones singénicos (B6D2 o B6C respectivamente). 12 días después del trasplante, los ratones trasplantados con MO fueron sacrificados y el bazo fue extraído para determinar el número de colonias esplénicas (UFC-b).

ESTA TESIS FUE ELABORADA EN SU  
TOTALIDAD EN LOS TALLERES DE  
IMPRESOS FRANCO REP. DE CUBA  
NO. 99. DESPACHO 23 BIS.  
MEXICO 1, D.F. TEL. 657-24-74  
PRESUPUESTOS 9 P.M. A 11 P.M.  
SR. SALVADOR MOYA FRANCO.