

**Acercamiento inmunológico para una tolerancia eficaz. Estudio preliminar**

**Immunological approach an effective tolerance. Preliminary study**

**Dra Diana Martín Ross; Dra. Maritza Muñoz Rodríguez; Obdulia Ramírez Milán; Dr. Roberto Álvarez**

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.

**RESUMEN**

El organismo dispone de diferentes vías para la defensa de su integridad, donde el fenómeno de la reactividad antigénica desempeña un papel primordial. Ha quedado demostrado que la capacidad que tiene el organismo de distinguir sus proteínas de las ajenas se adquiere durante el desarrollo embrionario, por lo que la proteína ajena crea en él una especie de costumbre, es decir, la tolerancia al tipo de esta proteína y no elabora anticuerpos contra la misma. El siguiente estudio nos permite valorar el grado de tolerancia inmunológica producida por el acercamiento inmunológico provocado durante la vida embrional; analizar la respuesta inmunológica en ratas y aves nacidas después de este acercamiento, así como establecer el período de durabilidad de dicha tolerancia mediante la aceptación de trasplantes de tejido materno. Aunque nuestros resultados son preliminares, pudimos concluir que más del 50 % de los embriones sobrevivió a la manipulación del acercamiento inmunológico. La efectividad de la tolerancia se presentó en un 77, 7 % de aves y en un 66, 7 % de ratas (siempre por encima del 55, 5 %). Hay que tener en cuenta el perfeccionamiento de la técnica como método para lograr un mejor acercamiento que permita establecer el enigma que constituyen las reacciones inmunológicas.

**DeCS: TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.**

## ABSTRACT

The organism has different ways for the defense of its integrity, in which the phenomenon of antigenic reactivity plays an important role. It has been shown that the organism's capacity for distinguishing its proteins from foreign is acquired during the embryonic development; thus, the foreign protein creates in it a customary activity, that is the tolerance to the type of this protein and does not elaborate antibodies against it. This work allows the study of the immunological tolerance level produced by fetal life; analyzes the immunological approach, as well as the establishment of the period of durability of this tolerance through the acceptance of transplants of maternal tissue. Even though our results are preliminary, we reached the conclusion that more than 50 % of embryos survived to the manipulation of the immunological approach. The effectiveness of tolerance presented in 77, 7 % of birds and in 66, 7 % of rats always over 55, 5 %. It should be taken into account the improvement of the technique as a method for achieving a better approach which permits to make clear the enigma of immunological reactions.

**DeCS:** IMMUNE TOLERANCE.

## INTRODUCCIÓN

El organismo dispone de diferentes vías para la defensa de su integridad. La clave esencial la constituyen los anticuerpos (Ac) circulantes en sangre, cuyas características morfofuncionales permiten que, al ponerse en contacto con los antígenos (Ag), se produzcan las reacciones que aniquilan su acción. Los anticuerpos constituyen el factor principal de la inmunidad humoral.<sup>1</sup>

La reacción inmune puede llevarse a efecto mediante la acción de los linfocitos inmunocompetentes, su diferenciación en linfocitos T (tímicos) de los que depende la inmunidad celular y los B (Bursa), responsables de la generación de anticuerpos (inmunidad humoral), y posteriormente su especialización en células plasmáticas y otras células del sistema inmune. Los dos tipos de inmunidad son responsables, además de la función de defensa del organismo contra los elementos ajenos y dañinos, del rechazo de tejidos y órganos durante los homo y heterotrasplantes.<sup>2</sup>

El número de linfocitos del organismo humano es elevado. Diariamente pasan al torrente sanguíneo 10 000 millones.<sup>2</sup> En 1913, Krichevsky planteó la necesidad de

aplicar a la embriología conceptos Ag-Ac y las reacciones inmunes en el establecimiento de las diferencias de los antígenos del embrión con los del organismo adulto; así como la variación de los antígenos durante el desarrollo embrionario. <sup>3</sup>

En 1935 A. Tyler sugirió que en las células del embrión se producen Ac que influyen positivamente en la diferenciación de tejidos y órganos. <sup>4</sup>

En 1945, P.B Medavore y, posteriormente, en 1959 F.M Berret y M Hasek, estudiaron los fenómenos de compatibilidad e incompatibilidad de los tejidos trasplantados. <sup>4</sup>

Desde 1950, P Weiss y colaboradores establecieron relaciones entre moléculas de superficie de las células embrionarias con las moléculas de los Ag y Ac correspondientes. <sup>5</sup>

Ha quedado demostrado que la capacidad que tiene el organismo de distinguir sus proteínas de las ajenas, se adquiere durante el desarrollo embrionario, por lo que la proteína ajena en el embrión crea en él una especie de costumbre que, una vez desarrollado el organismo, posee la tolerancia al tipo de esta proteína y no debe elaborar anticuerpos que reaccionen en contra de ésta. <sup>6</sup>

El período adaptativo del embrión, durante el proceso de tolerancia inmunológica, es diferente para cada especie y se limita a la etapa mediante la cual el embrión o el organismo recién nacido aún no es capaz de elaborar anticuerpos, cuando el sistema inmune del embrión no se ha desarrollado. <sup>6</sup>

Después de un acercamiento inmunológico, algunos científicos señalan que en niños recién nacidos en las primeras horas del período neonatal, podrían introducirse varios millones de leucocitos paternos para elaborar la tolerancia a los antígenos del padre; ello hace posible que en lo adelante pudiera aceptar trasplantes de piel, córnea, u otros órganos del padre sin desarrollar una reacción inmunológica. <sup>7, 8</sup>

Se ha establecido que la composición antigénica de los tejidos embrionarios se caracteriza por una enorme diversidad, la madre y el embrión se distinguen por sus isoantígenos. Sin embargo, a pesar de la importancia de la reactividad antigénica en los fenómenos de la incompatibilidad entre el feto y la madre, no se convierte en proceso patológico después de la implantación y del establecimiento de la relación placentaria. <sup>7</sup>

Inmunólogos y embriólogos se enfrascan en esclarecer los fenómenos que llevan a la tolerancia inmunológica y la medida en que ésta pudiera garantizar que entre el sistema inmunológico de la madre y el feto se establezca una relación de reconocimiento duradera en el tiempo. <sup>8</sup>

El presente estudio se realizó con el objetivo de valorar el grado de tolerancia producida por el acercamiento inmunológico provocado durante la vida embrional

en aves y ratas. Así como establecer el período de durabilidad de la tolerancia inmunológica en ellos mediante la aceptación de trasplantes de tejido materno.

## **MÉTODO**

El universo de estudio estuvo constituido por veinte huevos de aves de corral y tres ratas gestantes y una rata macho. Los huevos fueron incubados durante 21 días. Al cabo de las 18 a 20 horas, en la que se encuentra formado el disco embrionario, se procedió a constituir dos grupos de estudio. El primero formado por cinco huevos y el segundo por 15.

Transcurrido este tiempo, se procedió a abrir una ventana rectangular previa asepsia y marcaje de la zona con un tamaño aproximado de 1,5 x 1,0 cm, con un disco de lijar de estomatología, se tomó del primer grupo 0,05 ml del vitelo y se pasó a la membrana corioanlantoidea de los huevos del segundo grupo; de manera que por cada huevo del primer grupo se inocularon tres huevos del segundo grupo, se estableció el sistema de marcaje que permitiera reconocer a los donantes y sus receptores. Fue repetido a las 48 y 72 horas siguiendo el esquema descrito.

Al finalizar cada proceder se cerró la ventana de manera hermética con cinta adhesiva transparente (para evitar la contaminación).

Se utilizaron jeringuillas de 1 ml o 100 unidades de insulina, así como agujas hipodérmicas de 10x 0,5 mm.

Se escogieron ratas de 200-300 g aproximadamente y se inoculó en cada saco ovular a los siete días de embarazo 0,2 ml de sangre paterna, extraída de la vena dorsal de la cola de la rata. Se repitió este proceder a los 14 días del nacimiento y luego se tomó tejido de la piel de las tres ratas madres, de la zona cercana a la raíz de la cola y se trasplantó a las ratas hijas en la zona similar. Se tomaron las medidas de asepsia y se dejó evolucionar.

## **RESULTADOS**

Como puede apreciarse en la tabla 1, el 55,0 % de los huevos fueron útiles

**Tabla 1. Utilidad de los huevos procesados**

<b>Huevos</b>	<b>Procesados</b>	<b>Útiles</b>	<b>%</b>
<b>Primer grupo</b>	5	3	60,0
<b>Segundo grupo</b>	15	8	53,3
<b>Total</b>	20	11	55,5

Fuente: Datos primarios del estudio.

De las nueve aves resultantes de la incubación, fueron injertadas seis con un fragmento pequeño de piel de la región cervical de las aves del primer grupo, según la correspondencia con la relación que existe entre éstas y las provenientes del segundo grupo. A la vez se tomaron fragmentos de piel de tres aves del segundo grupo de la región cercana al nacimiento de las alas y se injertaron en la zona homóloga de las tres aves del primer grupo.

Cada fragmento trasplantado fue supurado dando seis puntos distantes, según la técnica descrita por Chadillon y Chaumonten en 1976.<sup>11</sup>

Se mantuvo control y vigilancia sistemática en cada paciente. Al cabo de cuatro días se observó que el 66,6 % de los fragmentos de piel trasplantada del primer grupo al segundo (región cervical) prendieron y no se apreciaron signos de necrosis o de rechazo evidentes. Mientras que el 100 % de las aves trasplantadas en la región dorsal no presentó alteraciones macroscópicas de rechazo.

En la tabla 2 se muestra la efectividad de la tolerancia al obtenerse un 77,7 % de efectividad a los 7 y 14 días de trasplantados.

**Tabla 2: Efectividad de la tolerancia**

<b>Aves</b>	<b>Procesados</b>	<b>Fallecidos</b>	<b>Efectivos</b>	<b>%</b>
<b>Primer grupo</b>	3	-	3	100
<b>Segundo grupo</b>	6	2	4	66,6
<b>Total</b>	9	2	7	77,7

Fuente: Datos primarios del estudio.

En la tabla 3 se muestra la relación de los sacos ovulares de las ratas procesadas y el tiempo de gestación; encontrando que de 17 sacos ovulares presentes a los 7 días, persistieron 12 a los 14 días de gestación.

**Tabla 3: Relación de los sacos ovulares de las ratas procesadas y el tiempo de gestación**

<b>Ratas</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Sacos ovulares (7 D)</b>	<b>Sacos ovulares (14D)</b>	<b>%</b>
<b>Número 1</b>	250	4	4	100
<b>Número 2</b>	315	5	5	62
<b>Número 3</b>	320	8	5	62
<b>Total</b>		17	12	70,6

Fuente: Datos primarios del estudio.

La relación de los nacidos vivos se muestra en la tabla 4. Como se aprecia, la efectividad está por encima del 50 %.

**Tabla 4: Relación de nacidos vivos**

<b>Ratas</b>	<b>Nacidos vivos</b>	<b>Nacidos muertos</b>	<b>% de nacidos vivos</b>
<b>Número 1</b>	2	2	50
<b>Número 2</b>	3	0	100
<b>Número 3</b>	4	1	80
<b>Total</b>	9	3	75

Fuente: Datos primarios del estudio.

En la tabla 5 observamos la efectividad de la tolerancia a los siete días. El porcentaje de tolerancia fue del 66,7 a los siete días, cuando debió realizarse a los 14 días.

**Tabla 5: Efectividad de la tolerancia a los 7 días**

<b>Ratas</b>	<b>Aceptación</b>	<b>Rechazo</b>	<b>% de aceptación</b>
12	18	4	50

Fuente: Datos primarios del estudio.

## DISCUSIÓN

En relación con la utilidad de los huevos procesados (tabla 1), debe tenerse presente que el riesgo de contaminación ocasionado al abrir la ventana para poner en contacto las membranas corioalantoideas en los huevos del primer grupo con los del segundo grupo, y la manipulación del huevo, produce afectaciones del disco embrionario. De los 11 huevos útiles, nacieron 9 pollos vivos y dos fallecieron dentro del cascarón para un 81, 81 % pertenecientes al segundo grupo.

Kallen plantea que estudios realizados por el College Institute, demostraron una tolerancia inmunológica en aves de un 58 %. En nuestro estudio la tolerancia a nivel cervical fue de 66, 6 %, menor que al nivel dorsal, lo que pudiera ser explicado por el hecho de que en la región cervical se encuentra la cadena ganglionar cervical, que eleva la respuesta inmunológica de esta zona (tabla 2).

Al manipular directamente los sacos ovulares, pueden transmitir microorganismos que pudieran destruirlos. Se corre el riesgo de traspasar la membrana y pinchar al embrión, lo que ocasionaría su muerte e involución, aunque en la literatura revisada no encontramos explicada la efectividad por días, consideramos que nuestros resultados están acordes con la severidad de la agresión de este proceder. La efectividad en relación con los nacidos vivos por encima del 50 %, coincide con la literatura consultada, <sup>12</sup> (tabla 4).

No puede negarse que el nivel de tolerancia que se logró en nuestro estudio, fue mayor que el que se describe en la literatura, ya que la misma es de un 55 %, cuando la técnica no es precisa o se realiza con técnicas invasivas. <sup>13-15</sup>

## CONCLUSIONES

1. Más de la mitad de los embriones sobrevivieron a la manipulación del acercamiento inmunológico.
2. La efectividad de la tolerancia en aves y en ratas siempre se presentó por encima de lo descrito en la literatura hasta un mes después del nacimiento, por lo que pudiera establecerse que mediante el acercamiento inmunológico entre dos generaciones, durante la vida embriofetal, puede obtenerse tolerancia inmunológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kubly J. Immunology. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Editorial Freeman; 1997.
2. Applications of immunological methods in biomedical sciences. Vol 4. New York: Blackwell scientific publications; 1996.
3. Tokin A. Embriología general. Moscú: Mir; 1990.
4. Cournoyer D, Cskey C. Gene Therapy of immune system. Ed Annu Rev Immunol. 1998;12(3):45-53.
5. Weiss P. Immunology. An introduction for medical students. Australia: Editorial Mc Graw Hill; 1995.
6. Gregory J, Seimoure A, Neil W, Walsh L. An introduction of immunology for Health Sciences. Australia: Editorial McGraw Hill; 1997.
7. Parker DC. Tcell-dependent, B-cell activation. Annu Rev Immunol. 1998;(11):331.
8. Gooding LR. Roles of alpha, beta and cell T. Annu Rev Immunol. 1998;12(4):23-9.
9. Gray D. Immunological memory. Annu Rev Immunol. 1998;(11):49-53.
10. Yokoyama W, Slack W. Natural killer cell receptors. Cur Opin Immunol. 1995;(9):193-201.
11. Research Defense Society. Law relating to experiments on animals in Great Britain. 3<sup>rd</sup> ed. Britain: Editorial McGraw Hill; 1976.
12. Vitetta K, Kallen ES. Memory B and T Cells. Annu Rev Immunol. 1998;(9):193-201.
13. Bosma MJ, Carrol AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization and potential uses. Annu Rev Immunol. 1998;(9):233-9.
14. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. Immunol Today. 1998;16(4):202-9.
15. Tanb DD. Preferential migration of activated CD4 and CD8 T cells in response to MIP-1<sup>a</sup> and S. Science. 1999;260(355):45-63.

Recibido: 6 de abril de 2002

Aprobado: 5 de mayo de 2002



*Dra Diana Martín Ross.* Especialista de II grado en Embriología. Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.