

179

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE CIENCIAS



EFECTO INMUNODEPRESOR DEL
PERIODATO DE SODIO in vivo

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

María Esther Urrutia Aguilar



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E
= = = = = =

INTRODUCCION	1	-	2
ANTECEDENTES	3	-	13
MATERIAL Y METODO	14	-	21
RESULTADOS	22	-	32
ANALISIS DE RESULTADOS	33	-	36
CONCLUSIONES	37	-	38
BIBLIOGRAFIA	39	-	42

=====

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

En inmunología se requiere frecuentemente poder aumentar o - disminuir la intensidad de la respuesta inmune del organismo. La disminución es deseable para el tratamiento de los padecimientos autoinmunes o evitar la reacción de rechazo hacia -- los órganos o tejidos transplantados. Se cuenta, para disminuir la respuesta inmune, con algunos agentes inmunodepresores, como la azathioprina¹, la ciclofosfamida², los esteroides³ y las radiaciones ionizantes³. Estos agentes han estado en uso desde hace más de 20 años, a pesar de presentar muchos efectos indeseables³. Recientemente se ha descubierto un nuevo agente inmunodepresor poderoso, la ciclosporina A, que tiene menos inconvenientes que los anteriores; pero que aun es nefrotóxica⁴.

Por ello, consideramos que la investigación para descubrir nuevos agentes inmunodepresores debe continuar.

La reactividad inmunológica del organismo puede deprimirse, ya sea:

- 1) Afectando a las células efectoras de la respuesta inmune,
o
- 2) Estimulando a las células supresoras a dicha respuesta^{5,6}.

A este respecto, hemos tomado en cuenta que el tipo e intensidad de la respuesta inmune están dadas por el porcentaje - relativo de las clases y sub-clases de las células que intervienen en ellas: Los linfocitos de la clase T, B o li y de --

las sub-clases efectoras, citocídicos, ayudantes y supresores, además de los macrófagos ^{5,6}.

Los agentes inmunodepresores mencionados, actúan principalmente afectando a las células efectoras de la respuesta inmune.

Recientemente se ha informado que el peryodato de sodio (NaIO_4) estimula la generación in vitro de las células supresoras⁷.

En esta comunicación se informa que el NaIO_4 inhibió significativamente la respuesta inmune celular, evaluada por la reacción cutánea de hipersensibilidad al dinitrofluoreobenceno (DNFB) -- in vivo en ratones.

= = = = =

A N T E C E D E N T E S

= = = = =

Dentro de la Inmunología se consideran dos tipos de respuesta inmune:

1) La respuesta inmune celular y 2) La respuesta inmune humoral. Ambos tipos de respuesta están dados por las clases y subclases de linfocitos que a continuación se mencionan: Clases y sub-Clases de linfocitos⁸⁻¹¹. Por microscopía electrónica de barrido se ha distinguido dos clases de linfocitos: Los linfocitos T, que son de superficie lisa y los linfocitos B que presentan una superficie pilosa y con numerosas proyecciones citoplasmáticas.

El estudio de antígenos específicos por el marcaje de superficie permite distinguir tres clases de linfocitos:

Linfocito T⁸⁻¹¹ Presenta en su superficie antígenos HTA. Poseen receptores de superficie que reaccionan con eritrocitos de borrego formando rosetas. La superficie de la membrana carece de Ig. Tienen la capacidad de reconocer antígenos específicos, ejecutan funciones efectoras y regulan el tipo y la intensidad de toda respuesta inmune celular y humoral. Se originan en la médula ósea, su maduración y capacitación inmunológica se realiza en timo y su función la efectúan en el sitio de presentación del antígeno.

Linfocito B⁸⁻¹¹ En su superficie pueden manifestarse cualquier

tipo de inmunoglobulinas, pero cada célula exhibe solo una -- clase de Ig.

Solo la IgM y la IgD han sido descubiertas juntas sobre el -- mismo linfocito. Se diferencian en células plasmáticas forma-- doras de anticuerpos. Se originan en médula ósea y su función la efectúan en el tejido linfoideo.

Linfocitos K⁸⁻¹¹ Carecen de los marcadores de los linfocitos T y B. Por esa característica se les confiere el nombre de -- linfocitos nulos. Algunos de estos linfocitos tienen recepto-- res para Fc. Participan en los fenómenos de citotoxicidad me-- diada por los anticuerpos.

Sub-clases de linfocitos T: Efectores, Inductores y Supreso-- res^{5,6}.

Los linfocitos T tienen la capacidad de reconocer antígenos -- específicos y efectuar funciones efectoras, regulan el tipo y la intensidad de toda respuesta inmune celular y humoral. Se ha definido tres sub-clases funcionalmente diferentes de lin-- focitos T por medio de heteroantisueros, autoanticuerpos y an-- ticuerpos monoclonales. Estas han sido programadas indepen-- dientemente para tener ya sea funciones citotóxicas, inducto-- ras y supresoras durante su diferenciación intratímica.

Para la diferenciación de los linfocitos T, es necesario el --

microambiente del timo en todas las especies. Al parecer, algunas células precursoras de la médula ósea (prototímica) con antígenos T10 migran al timo en donde adquieren los antígenos T9 y T10. En el proceso de maduración intratímica experimentan profundos cambios en sus antígenos de superficie que marcan los estadios de la ontogenia. En el hombre, las primeras células linfoides dentro del timo portan algunos antígenos, es tán presentes en algunas células de la médula ósea pero que faltan en las células T maduras. Esta población constituye -- aproximadamente el 10% de los linfocitos tímicos y reaccionan con los anticuerpos monoclonales anti-T9 y anti-T10 que corresponden a la primera etapa de su diferenciación. Al madurar -- pierden el T9, adquieren otros antígenos definidos como el T4, T5 y T6 y retienen T10, que corresponderían a la segunda etapa de su maduración. Estos son aproximadamente el 70% de la población total de linfocitos tímicos. En una etapa posterior de maduración, pierden el T6 y adquieren los antígenos T1 y T3 y se segregan en dos sub-clases, unos T4 y otros T5 en la tercera etapa de maduración. La competencia inmunológica se adquiere en esta tercera etapa; pero no se desarrolla en el timo, sino hasta que pasan a residir al bazo y a los ganglios linfáticos (Figura 1).

La mayoría de los linfocitos tímicos circulantes tienen T1 y T3. El T4 se expresa aproximadamente en el 55 al 65% de los linfocitos T periféricos y el T5 está presente en el 20 al 30%. Estas

sub-clases de linfocitos humanos corresponden a los linfocitos Th_2^- (ayudantes) y a los Th_2^+ (supresores) respectivamente de los ratones.

La capacidad de proliferación de los linfocitos T a los antígenos solubles (como el toxoide tetánico) se encuentra dentro de la sub-clase T4. En contraste, las sub-clases T4 y T5 muestran respuesta proliferativa a antígenos de la superficie de las células (Aloantígenos) en cultivos mixtos de linfocitos. Los T4 responden mejor a la PHA, mientras que los T5 muestran una respuesta menor; pero ambos responden igual a la concanavalina-A. La capacidad de los linfocitos efectores T humanos, se muestra por su capacidad para matar células específicas a las que hayan sido inmunizados previamente. Los T4, a pesar de -- que son capaces de proliferar en respuesta a aloantígenos, no llegan a ser citotóxicos. Se encontró que los T5 contienen células citotóxicas. La diferencia más importante entre las subclases T4 y T5 es su efecto regulador de la respuesta inmune: Los T4 han mostrado tener funciones de ayudantes de inductores en las interacciones T-B y T-macrófagos. Sin embargo, los T4-- por sí mismos no son citotóxicos ni efectores y requieren de los T5 para desarrollar la citotoxicidad.

Otros estudios muestran que se requieren los T4 para inducir -- a las células B a diferenciarse hacia células plasmáticas. Otros hallazgos indican que las células T regulan la respuesta--

inmune tanto por la interacción de células con célula, como -
secretando moléculas reguladoras como el factor mitogénico lin-
focitario que regula la respuesta inmune de otros linfocitos.

Los efectos reguladores de los linfocitos T4 no están solo --
restringidos a las células linfoideas, ya que regulan la pro-
ducción de células precursoras de los eritrocitos in vitro.
También producen otros factores activadores de los osteoclas-
tos y otros factores solubles que inducen la proliferación de
los fibroblastos y la biosíntesis de la colágena. Se ha en--
contrado que los linfocitos T4 humanos, tienen funciones aná-
logas a las de los linfocitos murinos Ly 1, con funciones a--
yudantes e inductoras.

Dentro de los linfocitos T5 hay una sub-clase con funciones -
supresoras (TS) y otra con actividad citotóxica. Los linfoci-
tos supresores, inhiben la producción de las inmunoglobulinas
por los linfocitos B. La sub-clase T5 supresora humana pare-
ce análoga a la Ly2-3+ del ratón que también tiene función su-
presora.

Por lo tanto, el sistema inmune humano consiste en una mezcla
de subclases bien definidas de linfocitos T y B en proporci-
ones críticas para la regulación homeostática de la respuesta-
inmune. Es el balance entre las sub-clases de linfocitos efec-
tores (TE), ayudantes (TH) y supresores (TS), las que gobier-

nan la clase e intensidad de la respuesta a los antígenos. La sub-clase inductora (T₄) es central para la activación de los linfocitos B, T, macrófagos y para la hematopoyesis. Esta influencia inductora es regulada por la presencia de células T - supresoras cuya función es inactivar a los inductores o alternativamente a la población efectora. Los linfocitos supresores pueden inhibir la respuesta inmune de los receptores a -- quienes se les transplantan.

Respuesta inmune humoral. Los antígenos solubles, particulados, de los microorganismos y de las células extrañas, activan a los linfocitos B en la producción de anticuerpos. Para que estos se activen se necesita la ayuda de los linfocitos T₄.

Respuesta inmune celular. Se desencadena cuando los linfocitos T tienen contacto con un antígeno. Los linfocitos T son entonces activados, proliferan y tienden a destruir al antígeno. - Suele ser activada por antígenos de los virus, rickettsias, bacterias de proliferación lenta, hongos, células de los órganos y tejidos transplantados y de las células malignas. Algunos de los linfocitos activados en la respuesta inmune son de vida prolongada y cuando se presenta de nuevo el mismo antígeno, se activan nuevamente. Estos constituyen los linfocitos de memoria de la respuesta inmune celular. Este tipo de respuesta es responsable de la reacción de hipersensibilidad celular retardada,

que consiste en que una segunda exposición al antígeno, o su permanencia en el organismo, produce una reacción inflamatoria en la que participan monocitos y macrófagos que infiltran la lesión. Este tipo de respuesta puede ser producida por la alteración de las proteínas propias con sustancias químicas como el dinitrofluorobenceno (DNFB). El DNFB se combina con las proteínas propias de la piel de los individuos a quienes se les aplica y las convierte en extrañas o antigénicas y contra ellas se desarrolla una respuesta inmune celular muy enérgica que se conoce como sensibilización al DNFB⁹.

Mecanismo de acción del NaIO_4 in vitro. El efecto de NaIO_4 sobre los linfocitos fué estudiado desde 1972: Induce la proliferación y transformación blástica in vitro de los linfocitos T, similar a la causada por los fitomitógenos¹²⁻¹⁴. El mecanismo de acción in vitro del NaIO_4 a nivel de las membranas celulares es bien conocido: De hecho, se ha informado que oxida los oxidrilos vecinos del ácido N-acetil-neuramínico, de la galactosa y de la galactosamina de algunas de las glucoproteínas superficiales de los linfocitos T^{12,16,17}. Cuando se suspende la exposición de los linfocitos al NaIO_4 , eliminándolo por lavado de los medios de cultivo, su acción cesa al cabo de unas seis horas, cuando se regeneran las glucoproteínas que habían sido oxidadas en los linfocitos¹⁸. Si se desea suspender la acción del NaIO_4 sin tener que lavar las células, basta con exponer--

las a concentraciones elevadas de glucosa para distraer la acción oxidativa del NaIO_4 ¹⁷. Si se desea revertir a la normalidad las glucoproteínas oxidadas de los linfocitos por el NaIO_4 , las células pueden tratarse con NaBH_4 sin afectar su viabilidad^{12,17}. Las condiciones óptimas para la inducción mitogénica es la incubación de 1×10^6 a 2×10^7 células mononucleares con el NaIO_4 a concentraciones de 0.5 a 1.0 mM a pH de 6 a 7.5, a temperaturas de 0 a 25°C por 10 a 30 minutos, seguida de lavado para eliminar el NaIO_4 del medio e incubación posterior en medio de cultivo por 48 a 72 horas¹¹⁻¹⁸.

Las células mononucleares pueden ser de la sangre periférica o del bazo¹¹⁻¹⁸. Para que ocurra la estimulación mitogénica del NaIO_4 sobre los linfocitos, se requiere la presencia de otras células mononucleares adherentes como los monocitos, macrófagos o células dendríticas del mismo donador o singénicas^{14,19,21}.

In vitro, el NaIO_4 induce específicamente la proliferación de las células precursoras de los linfocitos TS^{15,16}, a las que -- provoca un solo ciclo mitótico que se manifiesta dentro de las siguientes cuatro a 48 horas después del estímulo, ya sea como incremento en la síntesis de DNA o de la actividad inmunodepresora de los linfocitos resultantes de esa proliferación¹⁸. Las células Ts generadas por el NaIO_4 son capaces de inhibir inespecíficamente la reactividad inmunológica de otros linfocitos T

que ya hayan sido convertidos en efectores por estímulos anti-
génicos previos o simultáneos a la aplicación de NaIO_4 ^{16,18}.

No obstante, cabe mencionar que aunque la acción del NaIO_4 pa-
rece ser muy bien conocida a nivel de las membranas celulares,
los que son virtualmente desconocidos son los eventos intrace-
lulares que conducen a las células estimuladas a entrar en mi-
tosis. Así mismo, se desconoce en qué radica el efecto permi-
sivo de los macrófagos para que los linfocitos TS tratados con
 NaIO_4 pueden entrar en mitosis^{14,19,21,22}.

Las ventajas que presenta el NaIO_4 cuando se le utiliza in vi-
tro son: 1) Es selectivo para la estimulación de los linfoci-
tos Ts^{15,16}, 2) Requiere de un tiempo breve de exposición, de-
10 a 30 minutos^{12,22}, para actuar sobre ellos, 3) actúa sobre-
las células en las condiciones de cultivo^{12,22}, 4) Es un com-
puesto soluble y manejable, que permite utilizarlo a concentra-
ciones conocidas para estudiar su mecanismo de acción en dife-
rentes condiciones experimentales¹²⁻²², 5) Su efecto puede ser
suspendido por el simple lavado de las células o por neutrali-
zación con agentes reductores sin afectar la viabilidad celu-
lar^{12,17}, 6) Su concentración puede ser cuantificable en los -
líquidos extracelulares, 7) Su acción oxidativa sobre las - -
células es cuantificable^{12,17,18} y 8) Es un compuesto estable,
barato y de síntesis sencilla.

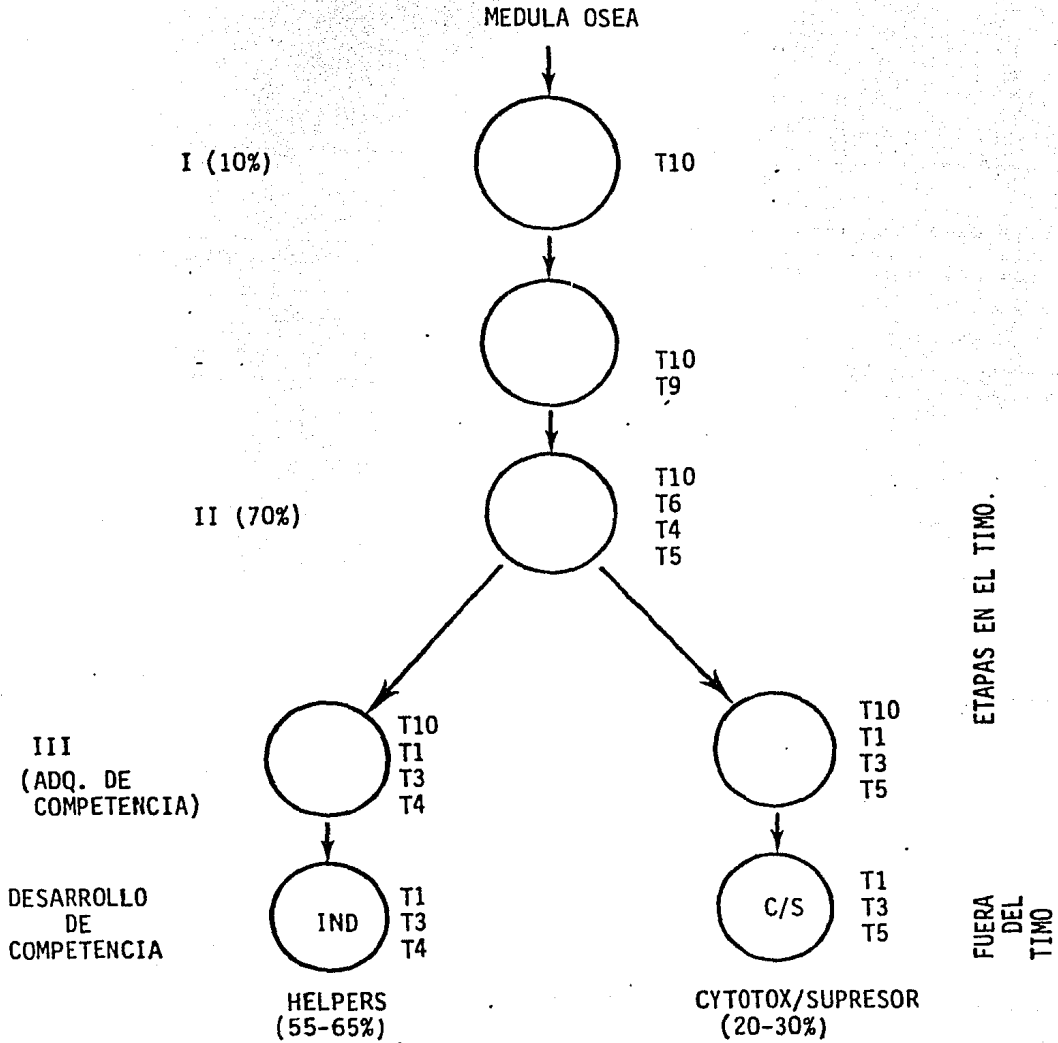
La blastogénesis inducida por el NaIO_4 inhibe la respuesta de formación de anticuerpos in vitro a los inmunógenos usados. Se había postulado que los linfocitos T estimulados por el NaIO_4 podían actuar ya fuera sobre los linfocitos ayudantes o directamente sobre células B, inhibiéndoles su respuesta inmune in vitro¹⁶. Recientemente se ha demostrado que el NaIO_4 induce la generación de linfocitos supresores que afecta la respuesta inmune⁷ in vitro.

No obstante que el NaIO_4 presenta estas ventajas in vitro, desconocemos las razones por las que su efecto in vivo no había sido probado.

= = = = =

FIGURA 1.

Diferenciación de las subclases de linfocitos T



M A T E R I A L Y M E T O D O

= = = = =

Estudio histológico de algunos
órganos vitales.

1. TOXICIDAD

Exámenes de química sanguínea.

Respuesta Humoral.

- a) Inmunodifusión.
- b) Contraínmuno-electroforesis.

2. EFECTO
INMUNODEPRESORRespuesta Celular.

- a) Infiltrado celular.
(Grosor de la oreja)
- b) Transferencia de Linfocitos.
- c) Pruebas a ratones atímicos.

= = = = =

M A T E R I A L Y M E T O D O S
= = = = = = = = = = = = = = = =

Ratones. Se utilizaron ratones machos BALB/C y nu/nu de dos- y tres meses de edad y de 23 a 25 gr. de peso, alojados en grupos de 10 en jaulas de popipropileno de 15X25X40 cm. con cama de aserrín esterilizado y se les proporcionó alimento comercial para roedores (Purina México) y agua purificada para consumo voluntario, en habitaciones a temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y ciclos de iluminación y oscuridad de 12 horas.

Para el Ensayo de la toxicidad del NaIO_4 , se formaron cinco grupos de 10 a 30 ratones cada uno y a ellos se les aplicaron dosis diarias sub-cutáneas de 80, 40, 20, 10 y 5 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso, disueltas en 0.1 ml. de NaCl 0.15 M ajustada a pH 7.2 con NaOH.

Los ratones que recibieron la dosis más alta, fallecieron durante las cuatro a seis horas después de la primera aplicación. Los otros grupos no fallecieron con el NaIO_4 y se siguieron inyectando diariamente por 30, 60 y 90 días. Cada uno de estos grupos se sangró para efectuar con ellos los exámenes de laboratorio que se mencionan más adelante y se efectuó el estudio histopatológico del cerebro, tiroides, corazón, timo, pulmones, hígado, bazo, riñones, intestino, músculo estriado y piel.

Para efecto inmunodepresor del NaIO_4 . Se utilizaron tres grupos de 15 ratones BALB/C a los que se les aplicaron dosis diarias de 20 y 10 mg. por Kg. de peso NaIO_4 disuelto en NaCl, - 0.15M a pH 7.0 por vía subcutánea. El grupo testigo sólo recibió el solvente sin NaIO_4 .

Las diferentes dosis de NaIO_4 se aplicaron a los ratones desde un día antes de empezar a aplicar la primera dosis sensibilizante de Dinitro-Fluoro-Benceno (DNFB) (Sigma).

Al cuantificar la intensidad de la respuesta inmune celular, - se utilizó la prueba de sensibilización al DNFB^o. por lo que - se rasuró un área de 2x2 cm. en el abdomen de los ratones. Luego se hizo la aplicación de 20mc1. de DNFB al 0.5% disuelto en una mezcla de acetona y aceite de oliva en proporción 4:1. La dosis sensibilizante se repitió dos días consecutivos. Al quinto día después del inicio de la sensibilización se aplicó en - la cara externa de la oreja una tercera dosis reveladora que - consistió en la aplicación de 20 mc1 de DNFB al 0.2% en el mismo solvente. Este mismo día y antes de aplicar la dosis reveladora, se tomó la lectura del grosor de la oreja con un micrómetro, para evaluar el grosor inicial de la oreja. A las 48 - horas después de la dosis reveladora del DNFB, se volvió a medir la oreja para evaluar el grado de inflamación que les hubiera ocurrido a los ratones tratados con NaIO_4 o testigos.

Enseguida, se sacrificó a los ratones y se efectuaron cortes -- histológicos de las orejas para evaluar el grado de infiltrado celular.

Para observar si el DNFB tendría el mismo efecto en los ratones nu/nu que carecen de timo e inmunidad celular, se utilizaron -- dos grupos de 10 de estos ratones, uno testigo y otro con 20 mg por Kg. de peso de NaIO_4 . A los dos grupos se les aplicó la -- prueba de sensibilización al DNFB como se indicó anteriormente y los resultados se compararon con los de los ratones BALB/C -- tratados con NaIO_4 o testigos.

Inmunidad Humoral. Se investigó si el NaIO_4 modificaba la res-- puesta inmune humoral, utilizando dos grupos de 10 ratones - -- BALB/C, tratados con dosis de 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso y un grupo testigo, a los que se les inmunizó con 25 mg. de albúmina humana disuelto en 0.1ml. de NaCl 0.15M, mezclada con - -- 0.1ml de adyuvante de Freund completo. Estas dosis se aplica-- ron subcutáneamente en el dorso cada 8 días, durante tres semanas. Diez días después de la última inmunización, se les extra-- jo sangre para investigar el título de anticuerpos séricos por medio de inmunoprecipitación y contraelectroforesis en -- agar como se describe enseguida.

Inmunoprecipitación. Se disolvieron 850 mg. de agar noble - - -

(Difco) en 100 ml. de NaCl 0.15M ajustada a pH 7.2 con Na_2HPO_4 y adicionado de 0.01% de Azida de sodio (Sigma) como antimicrobiano. Este se depositó fundido a 60°C en cajas de petri en capas de 5 mm. de altura por 5 cm. de diámetro y se dejó enfriar. Ya solidificado se excabaron con un sacabocados especial para inmunodifusión radial, un pozo central y seis periféricos de 5 mm. de diámetro y separados 5 mm. entre sí. En el pozo central se colocaron 5 mg. de albúmina humana disueltos en 0.2ml. de la solución salina anterior y en los pozos periféricos las diluciones seriadas al doble de los sueros de los ratones testigos y tratados con 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso. Las cajas se incubaron 48 horas en cámara húmeda a 37°C , después se lavaron 24 horas en NaCl 0.15M y se tiñeron con una solución al 0.1% (p/v) de Amido Black (Sigma) y luego se efectuaron las lecturas de los títulos de anticuerpos antialbúmina.

Contrainmunolectroforesis. Se diluyó lg. de agar noble en 25 ml. de NaCl 0.15M amortiguado a pH 8.8 con Barbiturado de Sodio (Camag), adicionado de 0.01% de azida de sodio. Los portaobjetos se colocaron en una mesa nivelada y se cubrieron con 5 ml. de agar noble a 60°C y se dejó enfriar. Una vez solidificado se excavaron en el agar dos hileras de cuatro pozos de 6 mm. de diámetro y 4 mm. de separación. Los sueros de los ratones fueron colocados en la hilera hacia el

ánodo y a diluciones seriadas de: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. La albúmina humana se depositó en volúmenes de 0.2ml, diluida - al 1% en el mismo amortiguador, en los pozos de la hilera colocada hacia el cátodo. La cámara de electroforesis se llenó con la misma solución amortiguadora anterior a pH 8.8. Las placas se colocaron transversalmente a los polos. En las orillas de - las placas se colocaron tiras de papel filtro mojado en la solu- ción anterior para hacer los puentes de conexión con la solu- ción amortiguadora de la cámara. Esta se conectó a su vez con electrodos de platino a la fuente de corriente continua. Esta se reguló a 15 miliamperios por cm. lineal de las placas de agar durante 30 minutos. Enseguida las placas se lavaron sumergidas en 30 volúmenes de NaCl a pH 7.2 por 24 horas para retirar el - exceso de proteínas no precipitadas. Después de tres cambios - más de una hora en la misma solución y otro más en agua destilada, se cubrieron con papel filtro y se dejaron secar al aire 18 horas. Luego se humedeció el papel filtro para despegarlo del agar y se retiró. Las placas de agar se tiñeron un minuto en - una solución de Rojo de Ponceau (Sigma) al 1% (p/v) en ácido acético al 5% en agua destilada. Las placas se lavaron en ácido acético al 5% para eliminar el exceso de colorante y se seca- ron para conservarlas permanentemente.

Transferencia de linfocitos. Para investigar si la falta de res- puesta al DNFB que causó el NaIO_4 estaba medida por linfocitos

supresores, se efectuó la transferencia de linfocitos esplé--
nicos. Se sacrificaron dos grupos de 10 ratones sensibiliza-
dos al DNFB, unos testigos y los otros tratados con 20 mg. de
 NaIO_4 como se indicó. A las 24 horas, después del registro-
del grosor de la oreja de los ratones sensibilizados, se les
sacrificó y se les extrajo el bazo. Este fué disociado en un
homogenizador de vidrio. Los linfocitos del bazo de cada ra-
tón se separaron en un gradiente de Ficoll-Angioconray y se -
inyectaron por parejas a igual número de ratones BALB/C norma
les. Estos se sensibilizaron y recibieron dosis reveladora -
DNFB. A las 48 horas se midió el grosor de las orejas y se -
hicieron cortes histológicos para evaluar la reacción inflama
toria como se indicó.

Estudio Histológico. La toxicidad tisular del NaIO_4 se valoró
mediante cortes histológicos de hígado, corazón, pulmón, riñón
y tiroides teñidos por la técnica convencional de hematoxilina
eosina tanto en los ratones muertos con dosis letales como en
los ratones experimentales tratados durante 15, 30 y 90 días -
con dosis de 10 y 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso y se compara
ron con los de los ratones testigos.

Exámenes de Laboratorio: Se hicieron biometrías hemáticas com-
pletas y determinaciones de urea, creatinina, transaminasa gly
támica-oxalacética, transaminasa-glutámico-pirúvica y bilirru-

binas, a los ratones que habían sido tratados con la dosis de 20 mg. de NaIO_4 diarios por vía subcutánea durante 30, 60 y 90 días.

= = = = =

R E S U L T A D O S

= = = = =

Ensayo de la toxicidad del NaIO₄ Todos los 10 ratones BALB/C que recibieron la dosis de 80 mg. de NaIO₄ por Kg. de peso, - fallecieron entre las cuatro o seis horas después de la primera inyección. Ocho de veinte ratones BALB/C inyectados con - la dosis de 40 mg. de NaIO₄ por Kg. de peso por día, fallecieron en la primera semana, sin presentar signos clínicos ni -- histopatológicos que explicaran su muerte. La mortalidad de los dos grupos anteriores se atribuyó a toxicidad del NaIO₄.

Tres grupos de treinta ratones BALB/C que recibieron 20, 10 y 5 mg. de NaIO₄ por Kg. de peso por día, sobrevivieron por más de 90 días en condiciones normales. El estudio histopatológico de cerebro, tiroides, corazón, timo, pulmones, hígado, bazo, riñones, intestino, músculo estriado y piel, mostró órganos y tejidos sin alteraciones. Los resultados de los exámenes de laboratorio de los grupos que recibieron el NaIO₄ por 30, 60 y 90 días de la dosis de 20 mg. por Kg. de peso y por día aparecen en las Tablas 1-3. En ellas puede verse que no hubo alteraciones en ellos.

Efecto inmunosupresor del NaIO₄. Los resultados aparecen en la tabla 4. En ella puede verse que los ratones BALB/C que no recibieron NaIO₄ presentaron un engrosamiento de la oreja de -

2.34 \pm 1.58 dmp en la reacción de sensibilización al DNFB. El grupo de ratones BALB/C que recibieron 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso por día, mostraron un incremento del grosor de la oreja de sólo 0.18 \pm 0.21 dmp que comparado con el del grupo anterior mostró una diferencia significativa con un valor de P menor de 0.001. El grupo de ratones que recibió 10 mg. de NaIO_4 tuvo un engrosamiento de 0.27 \pm 0.59 que comparado con los dos grupos anteriores dió una diferencia significativa con P menor de 0.001.

Los cortes histológicos de las orejas de los ratones testigo a quienes se les aplicó la prueba del DNFB mostró un fenómeno inflamatorio muy acentuado, caracterizado por la infiltración de una gran cantidad de linfocitos, histiocitos y escasos polimorfonucleares (Figura 2).

Los cortes histológicos de las orejas de los ratones tratados con 20 mg. por Kg. de peso y por día de NaIO_4 y que se les aplicó la prueba de DNFB no mostraron reacción inflamatoria al compararse con las orejas de los ratones normales (Figura 3).

Los cortes histológicos de las orejas de los ratones tratados con 10 mg. de NaIO_4 y que se les aplicó la prueba del DNFB, mostraron una reacción inflamatoria discreta compuesta por linfocitos, histiocitos y muy escasos polimorfonucleares.

Inmunidad humoral. Los resultados de los títulos de anticuerpos anti albúmina de los ratones que recibieron 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso cada 24 horas por vía subcutánea durante el período de inmunización con las cuatro dosis semanales de 25 mg. de albúmina humana en adyuvante de Freund completo por vía subcutánea, aparecen en la Tabla 5. En ella puede verse que los títulos de anticuerpos por inmunodifusión, tanto en el grupo testigo como en el tratado con NaIO_4 fueron de 1:4 y por contraelectroforesis de 1:6, por lo que no se observó diferencia entre los grupos de ratones testigos ni los tratados con NaIO_4 .

Transferencia de linfocitos. Los resultados de las pruebas de sensibilización al DNFB en ratones que recibieron 1×10^7 linfocitos esplénicos de ratones tratados con 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso cada 24 horas por vía subcutánea y que habían dado pruebas negativas de sensibilización al DNFB y de los testigos que no recibieron NaIO_4 aparecen en la tabla 6. En ella pueden verse que la transferencia de linfocitos esplénicos de los ratones donadores que habían sido tratados con NaIO_4 y que habían dado negativas las pruebas de sensibilización al DNFB, también inhibieron la sensibilización al DNFB en los receptores con un valor de P menor de 0.01.

Los ratones nu/nu no desarrollaron reacción de hipersensibilidad celular al DNFB. Este dato mostró que la sensibilización al - -

DNFB es dependiente de la presencia de linfocitos T. Asimismo, la falta de respuesta de los ratones BALB/C tratados con NaIO_4 los equipara al estado de inmunodeficiencia de linfocitos T que presentan los ratones nu/nu.

= = = = =

T A B L A 1

Resultados de las pruebas de laboratorio para evaluar la toxicidad del peryodato de sodio (NaIO_4) después de inyectarlo los 30 días previos, a la dosis de 20 mg por Kg de peso cada 24 horas por vía subcutánea, a ratones BALB/C.

Prueba	No. de ratones	Resultados			Valores Normales
		\bar{X}	\pm	S	
Urea	9	19.5	\pm 2.08		16-36 mg
Creatinina	9	.36	\pm .084		.5-1.2 mg
T.G.O.	9	7.6U	\pm 7.1		5-17U/L
Bilirrubinas	1	IND	0.7 mf		0.7
		DIR	0 mg		0
Hb	19	13.8 mg	\pm .79		12.9 - 14.5 mg
HTO	19	53.9%	\pm 4.4		38 - 46%
Leucocitos	19	6,694	\pm 2,300		3,000 10,000
Linfocitos	19	67%	\pm 8.8		60-75%
Segmentados	19	30.4%	\pm 8.7		27-31%
Monocitos	19	1.3%	\pm 1-2		1-2.5%
Eosinófilos	19	0.052%	\pm .02		2%

T A B L A 2

Resultados de las pruebas de laboratorio para evaluar la toxicidad del peryodato de sodio (NaIO_4) después de inyectarlo los 60 días previos, a la dosis de 20 mg por kg de peso cada 24 horas por vía subcutánea, a ratones BALB/C.

Prueba	No.de ratones	Resultados			Valores Normales
		\bar{X}	\pm	S	
Urea	12	33.58	\pm 3.92	mg/dl	16-36 mg/dl
Creatinina	12	0.19	\pm 0.75	mg/dl	.5-1.2 mg/dl
T.G.O.	12	2.43	\pm 2.05	mU/ml	5-17 mU/
Bilirrubinas	1	DIR	- 0		1 0
		IND	- 0.8		0.8
Hb	10	14.67	\pm .73	mg	12.9-14.5 mg
HTO	10	48.6	\pm 2.24	%	3 8 -46 %
Leucocitos	10	5.990	\pm 3417		3,000-10,000
Linfocitos	10	73.9	\pm 10.9	%	60-75 %
Segmentados	10	26.6	\pm 9.7	%	27-31 %
Monocitos	10	2.4	\pm 1.4	%	1-2.5 %
Eosinófilos	10	0.1	\pm 0.3	%	2%
Bandas	10	1.8	\pm 2.2	%	-
TSGP	8	2.86	\pm 2.43	mU/ml	1-24 mU/ml.

TABLA 3

Resultados de las pruebas de laboratorio para evaluar la toxicidad del peryodato de sodio (NaIO_4) después de inyectarlo los 60 días previos, a la dosis de 20 mg. por Kg. de peso cada 24 horas por vía subcutánea, a ratones BALB/C.

Prueba	No.de ratones	Resultados			Valores Normales
		\bar{X}	\pm	S	
Urea	12	32.00	\pm 3.8	mg/dl	16 - 36 mg/dl
Creatinina	12	.7	\pm 0.13	mg/dl	.5 - 1.2mg/dl
T.G.O.	12	2.14	\pm 2.01	mU/ml	5 - 17 mU/
		DIR - 0			1 0
		IND - 0.8			0.8
Hb	10	14.43	\pm .71	mg	12.9 - 14.5 mg.
HTO	10	45.3	\pm 2.20	%	38 - 46 %
Leucocitos	10	5,840	\pm 3400		3,000 - 10,000
Linfocitos	10	72.9	\pm 10.9%		60 - 75%
Segmentados	10	23.4	\pm 9.4%		27 - 31%
Monocitos	10	1.8	\pm 1.2%		1 - 2.5%
Eosinófilos	10	.3	\pm .4%		2%
Bandas	10	1.6	\pm 2.4%		-
TSGP	8	1.95	\pm 2.30	mU/ml	1-24 mU/ml

T A B L A 4

Resultados de las pruebas de sensibilización al dinitrofluoro benceno (DNFB) en ratones tratados con 10 y 20 mg por kg de peso de peryodato de sodio (NaIO_4) por vía subcutánea cada 24 horas y testigos, evaluada como incremento del grosor del pabellón auricular por la inflamación que produjo la reacción de hipersensibilidad celular.

Grupo	No.de ratones	Tratamiento	Incremento	
			X	S
1	10	Testigo	2:34	± 1.58
2	10	20 mg NaIO_4	0.18	± 0.21
3	10	10 mg NaIO_4	0.27	± 0.59

\bar{X} : Promedio (dmp)

S : Desviación estandar

Comparaciones mediante prueba de T de Student:

1 vs 2: P 0.001, 1 vs 3: P 0.001, 2 vs 3: No significativa.

T A B L A 5

Resultado de los títulos de anticuerpos anti-albúmina en ratones que recibieron 20 mg. de peryodato de sodio (NaIO_4) por kg. de peso cada 24 horas por vía subcutánea durante el período de inmunización con cuatro dosis semanales de 25 mg. de -- albúmina humana en adyuvante de Freund por vía subcutánea.

Grupo	No.de ratones	Tratamiento	Título	
			ID	CIEF
1	20	Testigos	1:4	1:6
2	20	NaIO_4	1:4	1:6

\bar{X} : Promedio

ID: Inmunodifusión en agar.

CIEF: Contrainmunolectroferesis.

T A B L A 6

Resultados de las pruebas de sensibilización al dinitrofluoro**o** benceno (DNFB) en ratones que recibieron 1×10^7 linfocitos es plénicos de ratones tratados con 20 mg. de peryodato de sodio (NaIO_4) por Kg. de peso cada 24 horas por vía subcutánea y -- que habían dado pruebas negativas de sensibilización al DNFB- y de testigos que no recibieron NaIO_4 .

Grupo	No.de ratones	Linfocitos ratones tratados	Incremento
1	10	Sin NaIO_4	2.57 ± 1.24
2	10	Con NaIO_4	0.99 ± 0.76

\bar{X} : Promedio (dmp)

S: Desvicación estandar

Comparaciones mediante prueba de T de Student: 1 vs 2: P

0.01

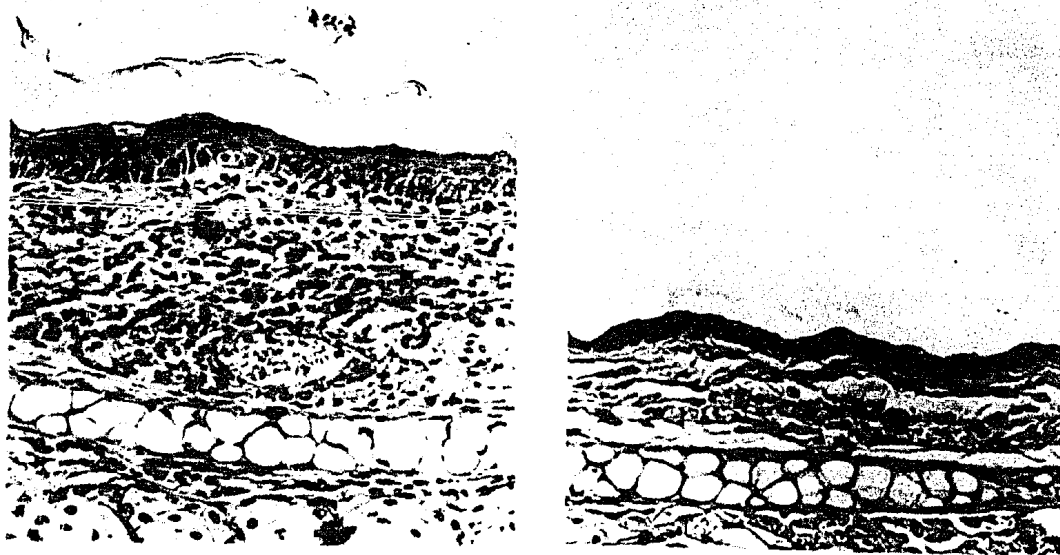


FIG 2. Corte histológico del pabellón auricular de ratón BALB/C normal, el cual fué sensibilizado con DNFB. Nóte se la infiltración de polimorfonucleares, histiocitos y linfocitos. FIG 3. Corte histológico de ratón BALB/C tratado con NaIO_4 , el cual fué sensibilizado con DNFB. Obsérvese la ausencia de respuesta inflamatoria.

D I S C U S I O N
= = = = =

Los resultados del presente trabajo confirmaron que el DNFB - fué agente sensibilizante efectivo para los ratones de la cepa BALB/C. Su combinación con las proteínas cutáneas las volvió extrañas o antigénicas para el organismo de los animales - y estos desarrollaron una respuesta inmune de tipo celular -- acentuada⁹.

La respuesta inmune celular de los ratones sensibilizados al DNFB pudo apreciarse macroscópicamente por el aumento de volumen, enrojecimiento y engrosamiento del pabellón de las orejas de los ratones. Confirmamos, de acuerdo a los resultados publicados que la lectura micrométrica del grosor de las orejas, se correlacionó con la intensidad de la respuesta inmune celular, a juzgar por los estudios histológicos efectuados.

En las orejas de los ratones que presentaron positivas las pruebas de sensibilización al DNFB, se observó un intenso infiltrado de linfocitos e histiocitos, típico de la respuesta inmune celular.

Cuando el DNFB se aplicó a los ratones atímicos de la cepa -- nu/nu, no hubo desarrollo de la respuesta inmune celular, lo que demostró que la sensibilización al DNFB requiere de la -- participación o respuesta de los linfocitos T.

En este trabajo pudo observarse que el NaIO_4 es una sustancia que puede administrarse por vía parental o dosis no tóxicas comprendidas entre 10 y 20 mg. por Kg. de peso a los ratones - - - BALB/C y que estas dosis resultaron muy efectivas para inhibir la respuesta inmune celular. Nuestras observaciones nos permitieron concluir que la dosis óptima fué de 20 mg. por Kg. de peso.

El NaIO_4 fué un agente inmunodepresor efectivo porque fué capaz de inhibir la respuesta inmune tan intensa que produce sensibilización al DNFB. Por otra parte, el NaIO_4 resultó ser una sal relativamente atóxica a juzgar porque los animales no manifestaron signos clínicos de toxicidad, las pruebas de laboratorio y los estudios histológicos de sus órganos y tejidos no mostraron lesiones de ninguna especie que se pudieran atribuir a la toxicidad del NaIO_4 . Además, hemos observado que el NaIO_4 no ha -- interferido con las gestaciones de los ratones BALB/C y que han dado a luz a productos normales y sin malformaciones congénitas.

Pensamos que si el NaIO_4 fuera utilizado in vivo, podrían encontrársele otras ventajas adicionales como: 1) Que fuera absorbible por diferentes vías de administración, 2) Actuara rápidamente, 3) Fuera fácilmente eliminable del organismo por su solubilidad y 4) Pudieran cuantificarse sus concentraciones plasmáticas, celulares y tisulares por métodos químicos sencillos. Todas estas serían buenas cualidades farmacológicas del NaIO_4 - que de no ser muy tóxico in vivo deberán investigarse.

Cuando observamos que el NaIO_4 si podía ser tolerado in vivo - en animales de experimentación, procedimos a investigar su posible acción inmunodepresora en ratones.

Nuestro punto de vista para ensayar el uso del NaIO_4 como agente inmunodepresor in vivo era tratar de encontrar un agente - inmunodepresor nuevo, cuya forma de actuar se basara en la imitación y estimulación de un mecanismo inmunodepresor fisiológico que ya existe en los seres vivos y que impide la activación de las células efectoras de la respuesta inmune. Si el NaIO_4 - tuviera in vivo el efecto inmunodepresor previsto, estaría actuando por un mecanismo diferente al de los agentes inmunodepresores, actualmente en uso, que tratan de inactivar o destruir artificial y tardíamente a las células efectoras de la respuesta inmune, cuando ya están formadas y su población ya está desarrollada¹⁻⁴.

Por los resultados obtenidos creemos que el NaIO_4 , es un agente inmunodepresor poderoso, cuya actividad podrá hacerse extensiva a otros campos de Inmunología que los requieren como por ejemplo para el tratamiento de los padecimientos autoinmunes y para evitar la reacción de rechazo contra órganos y tejidos transplantados. Los resultados preliminares del uso del NaIO_4 parecen ser alentadores.

La principal ventaja que se le ha encontrado al NaIO_4 , es que -

estimula in vitro la proliferación de los linfocitos T supresores⁷. Si este mismo mecanismo ocurrió in vivo en nuestros experimentos, podríamos decir que el NaIO_4 actuaría de la manera inmunológicamente más satisfactoria, es decir, aboliendo la respuesta inmune por las células supresoras, pero sin pretender destruir a las células efectoras.

En conclusión, consideramos que el NaIO_4 fué un potente agente-inmunodepresor desprovisto de toxicidad para los ratones BALB/C cuando se le empleó a las dosis de 10 a 20 mg. por Kg. de peso y por día. La síntesis de los anticuerpos antialbúmina no se deprimió por la aplicación del NaIO_4 en los ratones testigo y tratados con NaIO_4 . Con base en estos resultados, podríamos suponer que el NaIO_4 no deprimió la respuesta inmune humoral; pero para poderlo afirmar en un sentido más amplio, sería necesario haber utilizado una mayor diversidad de antígenos.

= = = = =

C O N C L U S I O N E S

= = = = =

1. El DNFB fué un agente capaz de producir reacciones de hiper--sensibilidad celular intensa en los ratones de la cepa BALB/C. Estas reacciones fueron cuantificables micrométricamente y --por comprobación histológica.
2. El DNFB no sensibilizó a los ratones atímicos nu/nu por lo --que se le consideró que este tipo de respuesta inmune depende de la respuesta inmune de los linfocitos T.
3. La aplicación de 10 o 20 mg. de NaIO_4 por Kg. de peso y por --día, evitó en los ratones el desarrollo de la reacción de hi--persensibilidad celular que debería haber causado el DNFB, --por lo que se consideró que el NaIO_4 resultó ser un agente inmunodepresor potente in vivo. Esto no había sido investigado--antes.
4. El NaIO_4 resultó no ser tóxico a las dosis de 10 a 20 mg. por Kg. de peso y por día en los ratones BALB/C, a juzgar por el--examen de los animales y los resultados de las pruebas de la--boratorio y exámenes histopatológicos que se les efectuaron a los 30, 60 y 90 días de la aplicación del NaIO_4 .
5. El NaIO_4 tuvo un efecto inmunodepresor hacia el DNFB transfe--rible adoptivamente de unos animales a otros mediante la apli--cación de linfocitos esplénicos procedentes de animales trata--dos con NaIO_4 .

6. El NaIO_4 no deprimió la síntesis de anticuerpos anti-albúmina en los ratones.

R E F E R E N C I A S
= = = = =

1. Calne R: Inhibition of the rejection of renal homografts - in dogs by purine analogues. Transpl. Bull. 28:445, 1981.
2. Stanal T E, Putnam C W, Hulgrimson C G, Groth C. G, Renal transplantation under cyclophosphamide. En. Clinical transplantation. D M Hume y I T Rapaport. Grune Stratton. N. Y. p 35 1972.
3. Nuboer J I: Opening address. En: Organ transplantation today N A M: Tchinson, I M Greep, I C M Hattings Verschura (Eds). Excerpta Medica Foundation. Amsterdam. p 1, 1969.
4. Borel J I. Ciclosporin A-Present experimental status. Transpl. Proc. 13:244, 1981.
5. Reinherz L E, Schossman S. F. Regulation of the Immune Response. Inducer and suppressor T-Lymphocyte subsets in human - beings. N. Engl. J. Med. 303:370, 1980.
6. Reinherz LE, Schlossman S F.: The characterization and function of human immuno regulatory T Lymphocyte subsets. Pharmacol. Rev. 34: 17, 1982.

7. Lammitzer R, Rabson A R.: Induction of suppressor cells - after activation of human peripheral blood mononuclear -- cells with periodate sodium. J. Immunol. 45:7-13, 1982.
8. Douglas S.D.: Células que intervienen en las respuestas - inmunitarias En: Fudenberg H H, Stites D P, Caldwell J L y Wells J V. Manual de Inmunología Clínica. El Manual Moderno. México p84. 1980.
9. Nayne S J. Tolrenace or hipertensivity to 2,4-Dinitro-- Flurobanzano J. Invest. Dermatol. 74:319-322, 1980.
10. Ning J E y Remington S J. Hipersensibilidad retardada y -- funciones de los macrófagos. En Fudenberg H H, Stitas D P Caldwell J L y Wells J V. Manual de Inmunología Clínica.- El Manual Moderno, México. p 103, 1980.
11. Marchalonis J.J. Cooperación celular en las respuestas in- munitarias En: Fudenberg H H, Stites D P, Caldwell J L y Wells J V? Manual de Inmunología Clínica. El Manual Moder- no. México. p120. 1980.
12. Novogrosky A, Katcatski A, Membrane sita modified on induc- tion of the transformation of lymphocytes by periodate. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69:3207, 1972.
13. Parker J W, O'Brien R L y Lukas R J: Transformation of hu- man lymphocytes by sodium periodate, Lancet, 1:103, 1972.

14. Greinader D K, Rosenthal A S: The requirement for macrophago-lymphocyte interaction in T lymphocyte proliferation induced-by generation of aldehydes on cell membranes. J. Immunol, - 115:932, 1975.
15. Thyрман, G.B. Giovanelle B, Goldstein A L. Evidence for the - T cell specificity of sodium periodate induced lymphocyte -- blastogenesis. J. Immunol. 113:810, 1974.
16. Guenounou M. Agnaray J: Induction of suppressor cells by - - sodium periodate. The oposite expression of periodate induced lymphocyte activation in spleen cells of normal and nude mice Immunol. 37:57, 1979.
17. Novogrodsky A. Induction of lymphocyte transformation by pe-riodate. En: Proceedings of the Sixt leucocyte Culture confe-rence. M. R. Schwranz (Ed). Academic Press. N.Y.: 167:1972.
18. O'Brien L L, Parker J W, Paolilli P, Steinar J. Periodate -- induced lymphocyte transformation. IV- Mitogenic affect of - NaIO_4 treated lymphocytes upon autologous lymphocytes. J. - Immunol. 112:1884, 1974.
19. Biniaminow M. Ramot B, Novogrosky A: Effect of macrophages- on periodate-induced transformation of normal and chronic-lymphatic leukemia lymphocytes. Clin. Exp. Immunol 16:235, 1974.

20. Brunner C J, Johnson D N, Muscoplat C C: Induction of - - blastogenesis in bovine paripharal blood lymphocytes by - oxidation with sodium periodate. Am. J. Vet Res. 40:1386, 1979.
21. Klin Kart W C I, Bowers W.E. Dendritie cells from different rat tissues are potent accesory cells in oxidative mitogenesis. J. Cell. Biol. 87:62a. 1980.
22. Phyllips M.L., Parker J W, Irelinger J, O'Brien R. L.: - Characterization stimulation. II Identification of an I-a-Bearing adherent accesory cell. J. Immunol. 124:2700, 1980.