

ESTUDIOS EN EL HUMANO SOBRE TOLERANCIA INMUNOLOGICA ADQUIRIDA¹

DRES. Ma. SOLEDAD CORDOVA,² BERNARD PIROFSKY,³ ANDRÉS AGUAYO⁴
LUIS M. SENTÍES^{2, 4}

Se hacen consideraciones sobre los conocimientos alcanzados en la inducción de un estado de tolerancia inmunológica, cuyo mecanismo adquiere cada vez mayor importancia ante su posible aplicación en los trasplantes de tejidos y de órganos. Se presentan los resultados del estudio realizado con el fin de inducir un estado de tolerancia inmunológica en el humano. Para tal objeto, se expusieron niños de grupo sanguíneo O a un antígeno específico, la sustancia de grupo A, durante el curso de las seis últimas semanas del embarazo o durante los primeros cuatro días de vida. Se logró la inducción de un estado parcial de tolerancia inmunológica específica, aparentemente más acentuada cuando la exposición a la sustancia antigénica se llevó a cabo durante la vida intrauterina. Para mantener el estado de tolerancia se requirió de la aplicación intermitente del antígeno. (GAC. MÉD. MÉX. 98: 1468, 1968).

EL TRASPLANTE de células, de tejidos y de órganos con fines experimentales o terapéuticos establece dos tipos de problemas: 1o. de carácter esencialmente técnico es el acto del trasplante propiamente dicho y, 2o. de índole inmunológica el fenómeno de histoincompatibilidad. Los avances logrados en el campo de la cirugía han salvado prácticamente todos los obstáculos referen-

tes a las técnicas quirúrgicas; en cambio, continúa siendo un enigma la incompatibilidad de los trasplantes, cuya naturaleza inmunológica es indiscutible y que constituye la mayor limitación a los trasplantes de órganos. Aparentemente ocurre en todas las especies de vertebrados con gran semejanza en lo que respecto a las alteraciones histológicas observadas y al período de tiempo en que se presentan.¹

Se han empleado diversos procedimientos con el fin de lograr una supervivencia mayor de los trasplantes. Todos ellos están dirigidos a conseguir un es-

¹ Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina, presentado en la sesión ordinaria del 23 de octubre de 1968.

² Académico numerario.

³ University of Oregon Medical School.

⁴ Hospital de Gineco-Obstetricia No. 1, Instituto Mexicano del Seguro Social.

tado de inmunosupresión y se basan en el principio de la tolerancia inmunológica² (Tabla 1). Se considera como tolerancia inmunológica a un estado de indiferencia o a la falta de respuesta a un estímulo antigénico capaz de producir, en otras condiciones, una reacción inmunológica. No obstante el gran

TABLA 1

PROCEDIMIENTOS TERAPEUTICOS
EMPLEADOS FRECUENTEMENTE
PARA EVITAR EL RECHAZO
DE LOS TRASPLANTES

Quirúrgicos

Esplenectomía
Tímectomía

Radiaciones

Generalizadas
Localizadas sobre bazo
Localizadas sobre timo

Quimioterapia

Corticoesteroides
Alquilaminas
Antifólicos
Antipurinas
Antibióticos de acción tóxica

Linfopenias

Suero antilinfocítico
Drenaje del conducto torácico

número de trabajos realizados, a partir de la producción experimental de este fenómeno por Billingham, Brent y Medawar³ en 1953, no se ha logrado precisar su mecanismo y sólo se conocen diversos aspectos del mismo. La tendencia actual es el de considerarlo como un fenómeno único cuya inducción y mantenimiento varían de acuerdo a las características del organismo que se pretende hacer tolerante, de los métodos utilizados para conseguirlo y de la naturaleza del estímulo antigénico empleado.⁴

Gran parte de los recursos experimentales con que se cuenta para inducir un estado de tolerancia inmunológica inutilizan el mecanismo de defensa al producir un abatimiento prácticamente total de toda respuesta inmunológica.⁵ En tal situación se encuentran los procedimientos terapéuticos empleados con frecuencia en la producción de inmunosupresión y de esta forma alargar la sobrevida de los trasplantes. Entre los más comunes están:

a) La aplicación de radiaciones^{6, 7} en dosis subletales y la administración de las llamadas drogas inmunosupresoras^{8, 9} (alquilaminas, antifólicos, antipurinas, antibióticos de acción tóxica, etc.) que actúan probablemente a través del daño ocasionado en células, tejidos u órganos encargados de la respuesta inmunológica. Considerándose que en cierto modo modifican la naturaleza inmunológica de un organismo adulto a una situación semejante a la que prevalece durante el periodo neonatal.

b) El uso del suero antilinfocítico tiene una acción inespecífica y totalmente irrelevante a las características del antígeno empleado para inducir la tolerancia inmunológica.¹⁰ Su efecto inmunosupresor es indudable ante la capacidad que tiene de prolongar la sobrevida de los trasplantes y es particularmente útil en las reacciones inmunológicas celulares sin la participación de anticuerpos humorales. El mecanismo de acción del suero antilinfocítico no es a través de la destrucción de linfocitos circulantes, puesto que, otros procedimientos que producen mayores linfopenias, como el drenaje crónico

del conducto torácico, son menos efectivos.

c) El abatimiento de las funciones del timo mediante radiaciones o la timectomía, se traduce por la supresión del papel inmunológico de este órgano,¹¹ esto es, la de proporcionar células inmunológicamente competentes o la de un posible factor humoral que condiciona inmunológicamente a los órganos linfoides.

A la luz de los conocimientos anteriores se hace evidente el gran interés que se tiene en todo procedimiento capaz de inducir un estado de tolerancia inmunológica para antígenos específicos. Con el primer ejemplo de esta condición particular descrito por Owen¹² en 1945; y con la corroboración experimental posterior por otros autores,³ se demuestra que la presencia del antígeno durante al vida embrionaria o en el periodo neonatal induce un estado de tolerancia inmunológica específica. Innumerables son los hechos experimentales que reproducen este fenómeno valiéndose de las más variadas estrategias tales como la parabiosis embrionaria;¹³ las inyecciones al feto in útero;¹⁴ la implantación de un aumento en la permeabilidad placentaria;¹⁵ etc. Resultados también satisfactorios se obtienen con estimulaciones antigénicas inmediatas al nacimiento, uno de los métodos más empleados por su fácil aplicación.

Es fundamental la dosis del antígeno suministrado antes o después del nacimiento para una fácil inducción y un mantenimiento prolongado de la tolerancia inmunológica. La respuesta está en relación directa a las dosis em-

pleadas, y además hay un aumento de los requerimientos de acuerdo a la madurez inmunológica alcanzada.^{16, 17} A este respecto conviene señalar que la tan discutida "parálisis inmunológica" no es sino un estado de tolerancia inmunológica inducido en animales adultos con dosis excesivas de antígeno.⁴

La tolerancia inmunológica no es una característica permanente,¹⁸ salvo en el caso de que se haya producido por la administración de células vivas. Su duración tiene un límite variable, supeeditada a la persistencia del estímulo antigénico y a naturaleza de los antígenos empleados. Al interrumpir el suministro de antígenos, la duración de la tolerancia difiere según el antígeno, la vida media de éste y su velocidad de eliminación.¹⁹ Con antígenos inertes como proteínas, polisacáridos y compuestos químicos purificados, el estado de tolerancia inmunológica puede mantenerse por el tiempo que se quiera, con la administración sostenida del antígeno a dosis y por periodos apropiados.^{16, 20}

Cuando se emplean como antígenos células o tejidos vivos con capacidad de proliferar y de ubicarse permanentemente en el sitio del transplante, se establece una situación peculiar denominada "quimera".²¹ En tales condiciones el estado de tolerancia se mantiene indefinidamente por la continua presencia del antígeno que tiene vida propia. Si bien es indudable que aun cuando éste podría considerarse como el procedimiento ideal para inducir tolerancia, su establecimiento implica en ocasiones una seria complicación, como es la aparición de la enfermedad debi-

litante, enfermedad secundaria o reacción de injerto contra huésped²² ("runt disease").

La existencia de un estado natural de tolerancia inmunológica y la presencia de quimeras de grupo sanguíneo²³ son datos de que la tolerancia inmunológica ocurre y puede mantenerse en el ser humano. No obstante la importancia que tiene su producción experimental, ésta no se ha intentado por diversos motivos, principalmente el peligro ya mencionado de producir una reacción injerto contra huésped o enfermedad debilitante. Tal obstáculo, sin embargo, puede salvarse si se emplea para tal fin una sustancia antigénica incapaz de reproducirse.²⁴

De acuerdo a los conocimientos enunciados, diseñamos una investigación encaminada a inducir un estado de tolerancia inmunológica que se reflejará en la supresión de la producción de anticuerpos anti-A en niños recién nacidos de grupo sanguíneo O. Para ello se utilizó como antígeno específico, la sustancia de grupo sanguíneo A que, además de ser incapaz de reproducirse, no es extraña al organismo humano y por lo tanto se evitan sensibilizaciones peligrosas e innecesarias. Por otra parte, tiene las ventajas de poder probarse la posible supresión de anticuerpos mediante pruebas "in vitro" y la de que en caso de fracasar, los anticuerpos producidos existen normalmente en el suero de sujetos de grupos sanguíneo O.

El estudio se realizó en partes; en la primera se incluyeron 36 recién nacidos de grupo O, de los cuales 20 fueron tomados como controles y los restantes se

agruparon de acuerdo a dosis y frecuencia con que se les administró la sustancia antigénica A. En esta forma se consideraron 3 grupos: *a*) grupo control de 20 niños; *b*) grupo de 8 niños a los cuales se les aplicó 25 ó 50 mg de sustancia A por vía intramuscular, como dosis total, al nacer y cada 24 horas durante los primeros 4 días de vida y al que designaremos en esta presentación como grupo inicial; y *c*) grupo de 8 niños quienes, además de las dosis iniciales de 25 ó 50 mg de sustancia A aplicadas durante los primeros 4 días de vida, recibieron 10 mg cada seis semanas hasta los 8 meses de edad. Este grupo lo designaremos como grupo continuo.

La presencia de anticuerpos anti-A se determinó por el método de microtitulación a partir de muestras de sangre del cordón y capilar obtenidas cada 3 semanas hasta la semana 20, y posteriormente, cada mes hasta los 10-11 meses de edad. La lectura de la aglutinación se hizo macro y microscópicamente, calificando el grado de la misma en puntos. En la última muestra de sangre, tomada a los 10-11 meses de edad, se investigó también la presencia de anticuerpos anti-B.

En la tabla 2 se representa el análisis estadístico de los resultados. Al nacer, todas las muestras de sangre del cordón tuvieron anticuerpos anti-A: la media de los títulos encontrados en los tres grupos fue semejante y éstos probablemente son anticuerpos maternos que atraviesan la placenta. En el grupo control, los títulos descendieron entre las 5 y 10 semanas de edad y a partir de este momento, el aumento en los

TABLA 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PUNTUACION DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-A EN LOS 36 NIÑOS ESTUDIADOS, DEL NACIMIENTO A LOS 11 MESES DE EDAD

	Nacimiento	EDAD EN SEMANAS						
		5	10	15	20	25	35	40-45
<i>Grupo control</i>								
Núm. de casos	20							
Valores extremos	1-5	0-18		17	15	14	14	14
Mediana	4.5	4.0		4.0	4-18	7-18	7-18	6-38
Media	5.5	4.8		7.0	10.0	14.0	14.0	19.0
					10.2	12.3	13.0	19.6
<i>Grupo inicial</i>								
Núm. de casos	8	8						
Valores extremos	3-11	1-3		8	7	6	—	3
Mediana	6.0	1.5		0-11	3-14	4-15	—	14-25
Media	6.3	1.7		5.0	6.0	12.0	—	19.0
P*	>0.5	0.1		<0.5	6.3	11.3	—	19.3
					0.05	>0.5	—	>0.5
<i>Grupo continuo</i>								
Núm. de casos	8	8						
Valores extremos	0-13	0-3		8	8	7	4	8
Mediana	4.0	1.1		0-5	1-4	1-10	1-7	1-7
Media	5.8	1.1		2.5	2.0	4.0	1.5	3.0
P*	>0.5	0.015		2.4	2.3	5.4	2.8	3.0
					<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* Valor de p comparado con el grupo control y determinado por la prueba t.

títulos se hizo evidente y continuó hasta el final del estudio en que se alcanzó una media de 19 puntos. En el grupo inicial, a quienes se aplicó la sustancia A solamente durante los primeros días de vida, se observó un patrón en todo semejante al encontrado en el grupo control, con descenso de los títulos entre las 5 y 10 semanas y ascenso posterior. En cambio, en el grupo continuo, es decir, con dosis inicial y cada 6 semanas, el promedio en los títulos alcanzados fue menor con respecto al del grupo control desde la 5a. y 7a. semana; a partir de los 5 meses esta diferencia se hizo estadísticamente significativa (prueba t; $p < 0.001$) y se mantuvo hasta el final del estudio, con un promedio de 3 puntos. Los títulos de anticuerpos anti-B en los dos grupos experimentales fueron semejantes a los del grupo control con un promedio de 20 puntos (Fig. 1).

En base a los resultados presentados se continuó con la 2a. fase en el estudio. En ella, la sustancia A se aplicó in útero. Para este fin se escogieron 6 mujeres embarazadas de grupo sanguíneo O con antecedentes de incompatibilidad feto materna en el sistema Rho, en quienes se requirió practicar amniocentesis para estudio espectrofotométrico del líquido amniótico. En todos los casos, el esposo de la mujer seleccionada era de grupo sanguíneo O. Inicialmente se hicieron dos grupos de 3 casos cada uno: en el 1o. se planeó inyectar 3 dosis de 20 mg de sustancia A en líquido amniótico en las semanas 33, 36 y 39 del embarazo. Por causas fuera de nuestro control, en un sólo caso se pudo seguir el procedimiento indicado; los restantes 2 casos recibieron únicamente una aplicación de 20 mg de sustancia A en la semana 33 del embarazo. En el 2o. grupo la aplicación de la

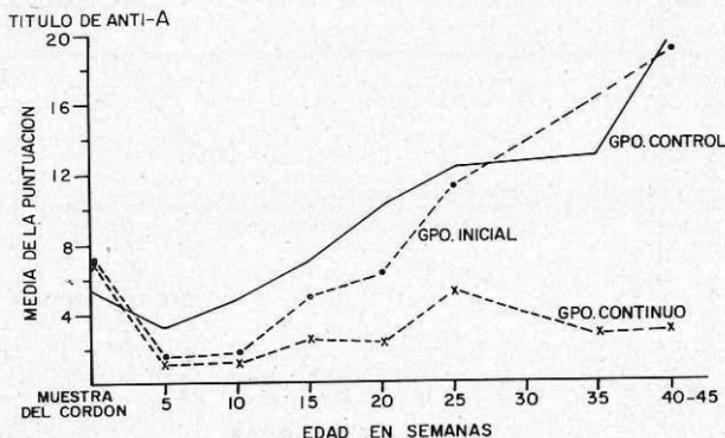


FIG. 1. Promedio de la puntuación de anticuerpos anti-A en los tres grupos de la primera parte del estudio.

TABLA 3
TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-A EN 6 NIÑOS CON SUBSTANCIA
"A" IN UTERO

	EDAD EN SEMANAS						
	Nacimiento	4	8	12	16	20	40
<i>Grupo control</i>							
Núm. de casos	20	20	20	—	17	15	14
Valores extremos	1-5	0	0-13	—	1-18	4-18	6-38
Media	5.5	3.2	4.8	—	7.0	10.2	19.6
<i>Grupo con sustancia "A" in útero</i>							
Núm. de casos	6	6	6	6	6	5	3
Valores extremos	0-11	0	0	0	0-1	1-2	1-4
Media	6.1	0	0	0	0.3	1.2	2.0

sustancia A a la dosis señalada, se realizó en la semana 37 del embarazo, en los 3 casos.

A los 6 niños en el momento del nacimiento y cada mes durante los 6 primeros meses de edad, se les aplicaron 10 mg de sustancia A por vía intramuscular. Las titulaciones de anticuerpos anti-A se

realizaron a partir de las muestras de sangre del cordón y capilar, tomadas cada mes hasta los 10 meses de edad.

Los resultados obtenidos en los 6 casos fueron muy semejantes por lo que se consideraron como un solo grupo. Sólo 3 de los niños han llegado al final del estudio; el número de casos es por lo

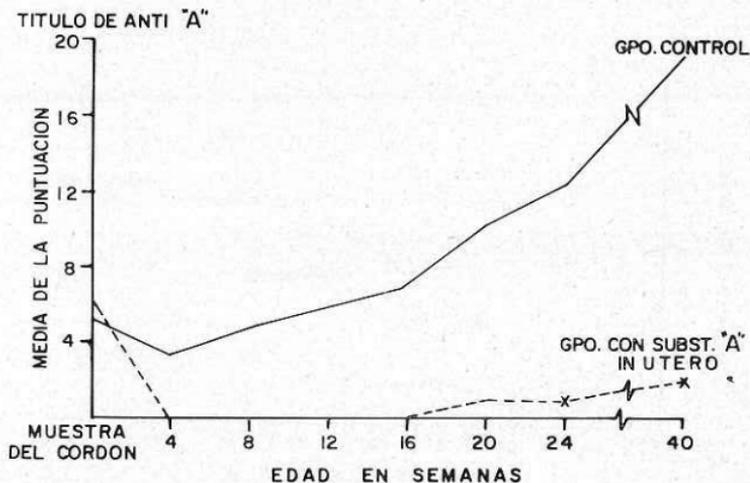


Fig. 2. Promedio de la puntuación de anticuerpos anti-A en el grupo control y en el grupo inyectado in utero con sustancia A.

tanto reducido y hemos omitido el análisis estadístico. En la tabla 3 se muestra que aparentemente no hay formación de anticuerpos anti-A hasta la edad de 16 semanas, cuando la puntuación de los títulos alcanzados en los 6 niños es en promedio de menos de uno. En los 3 casos que han llegado a las 40 semanas de edad la media de la puntuación es de 2 puntos, es decir, cerca de 10 veces menor a la observada en los controles de la fase. Estos datos confirman la observación ya señalada de que a mayor inmadurez del producto es mayor la probabilidad de inducir la tolerancia inmunológica (Fig. 2).

Los datos de este estudio preliminar, indican que es posible inducir en el ser humano un estado de tolerancia inmunológica parcial y específica sin reacciones adversas ni efectos colaterales mediante el empleo de una sustancia antigénica purificada. Además sugieren que, una vez establecido el estado de tolerancia, éste requiere para su mantenimiento de la presencia intermitente del antígeno.

El alcance de estas observaciones es grande ya que de lograr inducir estados de tolerancia semejantes o aún más acentuados con otros extractos antigénicos purificados, se podrían iniciar los trasplantes de tejidos y de órganos sobre mejores bases y con probabilidades de aceptación total y definitiva.

REFERENCIAS

1. Medawar, P. B.: *The homograft reaction*. Proc. Roy Soc. (Biol.) 149: 145, 1958.
2. Medawar, P. B.: *Immunological tolerance*. Science 133: 303, 1961.
3. Billingham, R. E., Brent, L. y Medawar, P. B.: *Actively acquired tolerance of foreign cells*. Nature 172: 603, 1953.
4. De Weck, A. L. y Frey, J. R.: *Monographs in allergy. I Immunotolerance to simple chemicals*. P. Kállós, Helsingborg, H. C. Goodman, Basel, S. Karger AG. 1966, p. 43, 52.
5. Billingham, R. E. y Silvers, W. K.: *Immunological diseases. Immunological aspects of tissue transplantation*. Ed. Max Samter. Boston. Little Brown and Co. (Inc.), 1965, p. 179.
6. Koller, P. C., Davies, A. J. S. y Doak, S. M. A.: *Radiation chimeras*. Advances Cancer Res. 6: 181, 1961.
7. Uhr, J. W. y Scharff, M.: *Delayed hypersensitivity. V The effect of X-radiation on the development of delayed hypersensitivity and antibody formation*. J. Exp. Med. 112: 65, 1960.
8. Nachtigal, D. y Feldman, M.: *Immunological unresponsiveness to protein antigens in rabbits exposed to X-radiation on 6-mercaptopurine treatment*. Immunology (Lond.) 6: 365, 1963.
9. Hitchings, G. H. y Elion, G. B.: *Chemical suppression of the immune response*. Pharmacol. Rev. 15: 365, 1963.
10. Levy, R. H. y Medawar, P. B.: *Anti-lymphocytic serum. The mode of action of antilymphocytic serum*. Ed. G. E. W. Wolstenholme. London. J. and A. Churchill, LTD. 1967, p. 72.
11. Metcalf, D.: *Recent results in cancer research. The thymus*. P. Rentchnick Berlin, Springer-Verlag. 1966, p. 75.
12. Owen, R. D.: *Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins*. Science 102: 400, 1945.
13. Hasek, M.: *Parabiosis of birds during their embryonic development*. Csl. Biol. 2: 25, 1953.
14. Gregg, M. B. y Salvin, S. B.: *Immunologic unresponsiveness to purified proteins in guinea pigs*. J. Immunol 90: 368, 1963.
15. Schwartz, J., Kletter, J. y Klopstock, A.: *Partial immunological unresponsiveness to virus antigens in guinea pigs*. Int. Arch. Allergy 25: 83, 1964.
16. Smith, R. T. y Bridges, R. A.: *Immunological unresponsiveness in rabbits produced by neonatal injection of defined antigens*. J. Exp. Med. 108: 227, 1958.
17. Siskind, G. W., Paterson, P. Y. y Thomas, L.: *Induction of unresponsiveness*

- and immunity in newborn and adult mice with pneumococcal polysaccharide.* J. Immunol. 90: 929, 1963.
18. Sorem, G. L. y Terres, G.: *The temporal relationship of acquired tolerance and immune response following injection of bovine serum albumin into neonatal mice.* J. Immunol. 90: 217, 1963.
 19. Dresser, D. W.: *Specific inhibition of antibody production. III. Apparent changes in the half-life of bovine gamma globulin in paralysed mice.* Immunology (Lond.). 6: 345, 1963.
 20. Ivany, J. y Hraba, T.: *A contribution to the study of immunological tolerance to proteins antigens in the chicken.* Folia Biol. 9: 354, 1963.
 21. Trentin, J. J. y Session, J.: *Lymphoid chimerism and immunological tolerance. Conceptual advances in immunology and oncology.* New York, Hoeber-Harper, 1963, p. 384.
 22. Simonsen, M.: *Graft versus host reactions. Their natural history, and applicability as tools of research.* Progr. Allergy. 6: 349, 1962.
 23. Dunsford, I., Bowley, C.C. Hutchinson, A. M., Thomson, J. S., Sanger, R. y Race, R. R.: *A human blood-group chimera.* Brit. Med. J. 11: 81, 1953.
 24. Pirofsky, B., Córdova, M., Aguayo, A. y Senties, L. M.: *Production of immune tolerance in humans.* Nature. 218: 284, 1968.
-