

Cuantificación (por nomogramas) de parámetros fisiopatológicos en un modelo experimental de anafilaxia pasiva por inmunocomplejos

A. Portolés, J. M. Rojo y R. Díaz*

Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, C.S.I.C.
Velázquez, 144. Madrid-6

(Recibido el 23 de enero de 1984)

A. PORTOLES, J. M. ROJO and R. DIAZ. *Evaluation (by Nomograms) of Physio-Pathological Parameters in an Experimental Model of Passive Anaphylaxis by Immune Complexes.* Rev. esp. Fisiol., 40, 297-310, 1984.

Pharmacological changes in a model of passive anaphylaxis by immune complexes in mice have been studied. The results have been evaluated by nomograms to overcome the difficulties observed when using classical criteria as 50 % lethal dosis or 50 % infective dosis in experimental models which do not allow serial dilutions of the reagents. Mean lethal time, maximal pathogenic capacity and relative survival time can be easily determined, allowing the comparison of the immunopharmacologic protection for each administration schedule.

By these criteria, we have observed a different degree of anaphylactic reaction depending on the genetic background of the hosts as well as a protection against anaphylactic shock using the antiserotoninic cyproheptadine and, to a lesser extent, by the platelet antiaggregant ticlopidine.

Key words: Passive anaphylaxis, Endotoxin, Immune complexes.

La inducción experimental de lesiones por inmunocomplejos (IC), puede ayudar al conocimiento del mecanismo patogénico fundamental de gran variedad de lesiones en la red capital y microvascular (8, 17), además de ser imprescindible para una mejor interpreta-

ción clínica y control posterior de gran número de enfermedades (6, 29). Pese a conocerse la significación fisiopatológica de ciertos caracteres de los IC formados (tamaño, tipo de inmunoglobulina, participación o no del complemento, constante de afinidad entre antígeno y anticuerpo, etc.), no se han establecido aún, de un modo concluyente, los mecanismos que determinan una formación excesiva del IC o su insuficiente

* Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

eliminación; factores, éstos, que influyen en el depósito de los IC y en su patogénesis.

En cuanto al tamaño de los IC, de acuerdo con KOHLER (18), según que su Pm sea mayor o menor a 10^6 (equivalente a una sedimentación de 19S) que, a su vez, depende de que la relación Ag/Ac sea 2:1 (< 19S), 3:2 ($\approx$ 19S) o incluso 4:6 (> 19S), puede condicionar que la eliminación del IC sea lenta, intermedia o rápida. Dependiendo de estas condiciones, también varía la posibilidad de que el complemento sea activado (con los dos últimos) o no (en el primer caso) (18). De acuerdo con sus caracteres físicos, los IC tendrán unas propiedades biológicas que, asociadas a ciertas características genéticas y celulares del huésped, permiten suponer un cierto destino *in vivo* de estos IC y, en consecuencia, las lesiones histopatológicas que tienen lugar al quedar depositados (16). Coincidente con este depósito de los IC, se produce un incremento de la permeabilidad vascular, que resulta condicionado por las plaquetas como elementos reservorio de aminas vasoactivas. Este efecto se produce mediante dos tipos de mecanismos: a) dependiente de una activación del complemento —cuando hay exceso de anticuerpos— que produce la inmunoadherencia tisular, agregación plaquetaria y liberación de mediadores; y b) cuando existe un determinado exceso de antígeno, con lo que el IC resulta independiente del complemento. Estas últimas son las condiciones más frecuentes *in vivo* y resultan dependientes de ciertas reacciones leucocitarias en las que intervienen inmunoglobulinas (Ig) citofílicas que se fijan a células diana (monocitos, basófilos y mastocitos) a través de su fragmento Fc. Esta reacción conduce a la liberación de un factor activador de plaquetas de Pm $\approx$ 1,2 MD (PAF), que provoca la agregación plaquetaria y la liberación de aminas vasoactivas (4); es-

tos factores incrementan la permeabilidad vascular y hacen que los IC de coeficiente menor de 19S queden atrapados en la membrana basal de las venas.

En el modelo de anafilaxia pasiva por IC diseñado por nosotros, para ensayo de antiagregantes plaquetarios (25), no hay participación del complemento y el anticuerpo citofílico es heterocitotrópico de la clase Ig G2 (en lugar de IgE), con posible intervención de basófilos y de mastocitos distribuidos por el tejido conjuntivo, principalmente a lo largo de los capilares bronquiales y con liberación final de serotonina. A lo largo del gran número de ensayos efectuados con este modelo experimental, hemos comprobado la dificultad de evaluar algunas resistencias individuales en ratones, consecuente con los muchos parámetros biológicos que influyen en la respuesta del huésped murino; y máxime, cuando estas diferencias de resistencia relativa pueden ser debidas a diferencias en el sistema MHC, a mínimas variaciones en la dosis de antígeno (razón Ag/Ac), o incluso al empleo de distintas moléculas antianafilácticas de parecido efecto. En este modelo experimental se hacía necesario disponer de un sistema que permitiera cuantificar la respuesta biológica, mediante datos relativos al tiempo medio de muerte (TM_{50}) y a un índice patológico que permita la comparación entre las distintas poblaciones animales; hecho que es difícil conseguir por los métodos habituales de determinación de dosis letal media (DL_{50}) y dosis infectiva media (DI_{50}). Con el método nomográfico que se propone pueden quedar reflejadas la variable resistencia del huésped, según las condiciones del ensayo, y establecerse algunas interrelaciones dosis-efecto en función de distintos parámetros experimentales. Esto permitirá aproximarse a posibles mecanismos para controlar la lesión por IC, después de la intervención combinada de distin-

tas moléculas inmunofarmacológicamente activas.

Material y métodos

Animales. Las pruebas se han realizado sobre distintas estirpes de ratón, de características genéticas conocidas, como son las estirpes BALB/C, DBA/2 y C57BL/6. También se han utilizado ratones Swiss, no consanguíneos, criados en el laboratorio.

Antígeno. Se utilizó una molécula endotóxica, equivalente a la fracción P5 de Westphal, obtenida a partir de cultivos de *Brucella abortus* (3).

Anticuerpos. Se preparó un suero de conejo anti-*B. abortus* 16 M (cepa muy virulenta), inyectando por vía endovenosa una suspensión con 2×10^9 bacterias vivas en 0,5 ml de solución fisiológica. Los animales se sangraron a los treinta días de la infección para obtener los sueros hiperinmunes.

Fármacos. En ocasiones, para controlar variaciones en el efecto patogénico, los ratones fueron tratados por distintos fármacos como clorhidrato de ciproheptadina (Periactin), ticlopidina (Tiklodone) y clonidina (Catapresan) a las dosis y condiciones indicadas en los resultados. Como disolvente de estas sustancias y del LPS-P₅, se utilizó solución salina tamponada con fosfato a pH = 7,0 (PBS).

Determinación de proteínas. En los complejos de antígeno-anticuerpo, así como en el LPS de *B. abortus* y en el suero de conejo, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de LOWRY *et al.* (21).

Curvas de inmunoprecipitación. Para conocer las posibles relaciones antígeno-

no-anticuerpo en la formación del IC desencadenante del cuadro de anafilaxia pasiva, se realizaron curvas de precipitación cuantitativa. Se utilizó el método clásico de HEIDELBERGER y KENDALL (13), determinando en cada tubo la concentración del precipitado, en función de las proteínas, después de disolverle en carbonato sódico 0,1 M (26).

Pruebas de anafilaxia pasiva. Basándonos en un fenómeno, previamente descrito (1, 2), se diseñó un modelo para estudios inmunofarmacológicos (25) en el que se establecen intervalos de 3 h entre la administración de 0,2 ml del antisuero (dosis sensibilizante) y 0,2 ml de la solución endotóxica, disuelta en PBS a las concentraciones que se indican en resultados (dosis desencadenante del *shock*); ambas dosis son inyectadas i.v. en el plexo retroorbital. En estas condiciones, y a tiempos variables, se empiezan a observar los fenómenos de erizado del pelo, disnea, descensos de presión sanguínea por vasodilatación hasta llegar a la cianosis, colapso vascular y muerte por *shock*. Estos síntomas se agravan cuando los animales son tratados con clonidina (50 µg/kg), que aumenta la hipotensión y, como consecuencia, la hipovolemia (23); y se protegen variablemente tratándolos con clorhidrato de ciproheptadina (60 µg/kg) como antiserotoninico bloqueador H₂, o con ticlopidina (30 mg/kg) que actúa como antiagregante plaquetario.

Análisis de los resultados. En cada caso, se consideran los datos obtenidos como gráficas acumulativas de muerte de los animales y se determinan, mediante nomogramas, las variaciones en el tiempo medio de muerte (TM₅₀) y en la capacidad de resistencia al *shock* anafiláctico según las modificaciones del grado de supervivencia calculados en función de un índice patogénico (IMCP). Para conocer el grado de signi-

ficación, en algunas determinaciones comparativas, se utilizó el análisis estadístico aplicando la *t* de Student (27).

Resultados y discusión

En primer lugar, conociendo la concentración de proteínas en el antígeno (endotoxina de *B. abortus*) y en el antisuero de conejo, se determinó la curva de inmunoprecipitación cuantitativa (figura 1) para evaluar la interacción antígeno-anticuerpo. Partiendo de estos datos se seleccionaron, en la zona de exceso de antígeno, cuatro distintas relaciones Ag/Ac para ser ensayadas posteriormente *in vivo*. Como puede verse en la zona donde existe exceso de antígeno (parte derecha de la figura), la

proporción de anticuerpo en el precipitado va disminuyendo según aumenta la concentración del antígeno.

Para estudiar las variaciones en el efecto patogénico de estos inmunocomplejos, por modificación de algunos parámetros biológicos, la expresión de resultados utilizada previamente (25) no permitía cuantificar pequeñas diferencias de respuesta, sobre todo en casos en que no mueren todos los animales; tampoco las gráficas acumulativas de índice de mortalidad permitieron interpretar algunas variaciones de respuesta individual, producidas por tratamientos farmacológicos, en los colectivos de ratones ensayados.

Tiempo medio de muerte e índice patogénico en anafilaxis pasiva por inmu-

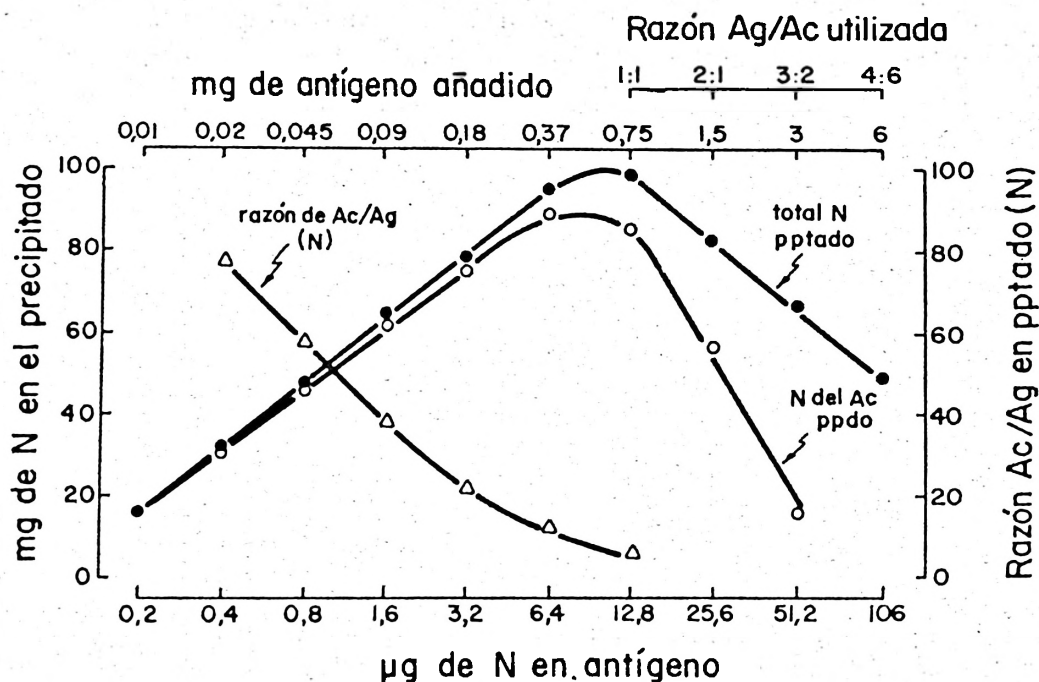


Fig. 1. Curva de inmunoprecipitación cuantitativa, por adición de cantidades crecientes de endotoxina de *B. abortus* a 0,2 ml de suero anti-endotoxina.

Quedan expresamente indicadas las zonas de equivalencia, las proporciones entre cada elemento reaccionante, y las razones Ag/Ac a utilizar en los ensayos *in vivo*, expresadas como contenido en nitrógeno (N).

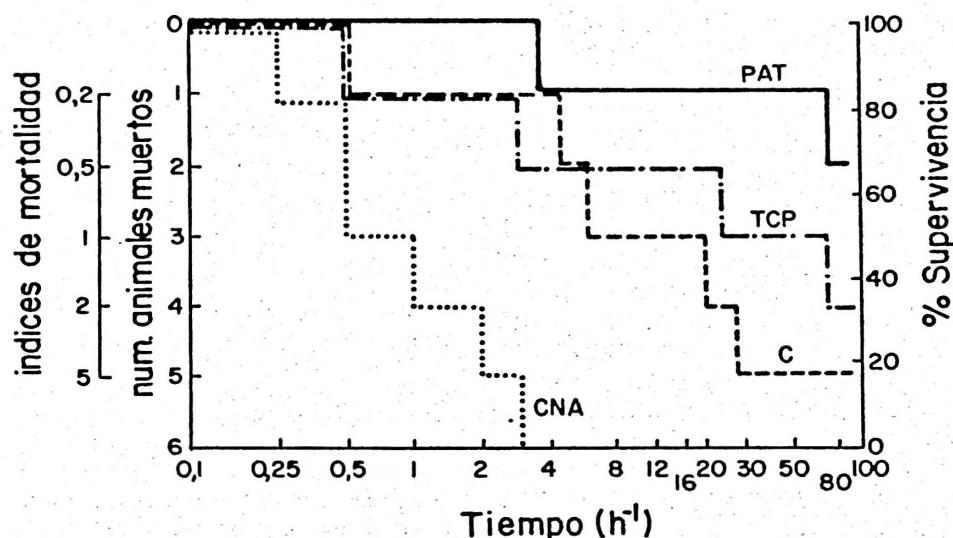


Fig. 2. Cinéticas de mortalidad en cuadros experimentales de anafilaxia pasiva por inmuno-complejos anti-endotoxina de *B. abortus*.

En estos experimentos control se representan de modo acumulativo, en función del tiempo, los índices de mortalidad y porcentajes de supervivencia de los grupos de ratones testigo sin tratamiento (C) y de los tratados con ciproheptadina (PAT), ticlopidina (TCP) y clonidina (CNA).

no-complejos. Se presentan las curvas de cinética de muerte por *shock* anafiláctico pasivo (fig. 2), producido por complejos antígeno-anticuerpo sobre distintos grupos homogéneos de seis ratones; experimentos semejantes, efectuados con grupos de 9 y 13 animales, dieron análogos resultados. La variabilidad de resistencia individual observada puede estar condicionada por el complicado mecanismo fisiopatológico de formación de los IC, asociado a algunas características genéticas y celulares del huésped que pueden modificar el destino y la cronicidad de las lesiones. A esto habrá de añadirse el distinto efecto de los fármacos administrados, según que actúen como protectores (ciproheptadina, ticlopidina) o no (clonidina), de la lesión producida por los IC. Se aprecia una cierta heterogeneidad, de respuesta, en la relación mortalidad/tiempo para los grupos tratados con ticlopidina y clonidina.

Si el momento de muerte de cada animal se anota en un sistema de coordenadas relacionando en escalas logarítmicas los índices de mortalidad ($\text{Log}_{10} m/v$, en abscisas) y los momentos de muerte observados ($\text{Log}_{10} t$, en ordenadas) (fig. 3), se puede conseguir la medida del tiempo medio de muerte (TM_{50}) para cada intervalo de observación utilizando un sistema gráfico semejante al empleado por EISENSTEIN *et al.* (9) para determinar la capacidad de protección máxima de vacunas ribosomales. En nuestro caso, el punto por el que cada línea corta el eje de ordenadas (Log TM_{50}) significa el tiempo de supervivencia que cabría esperar para el 50 % de la población de respuesta, cuando se representan en abscisas los valores de índice de mortalidad ($\text{Log}_{30} m/v$). Si esta determinación se realiza tomando como origen distintos tiempos de observación inicial, en los que existe el mismo índice de mortalidad (fig. 3), manteniendo

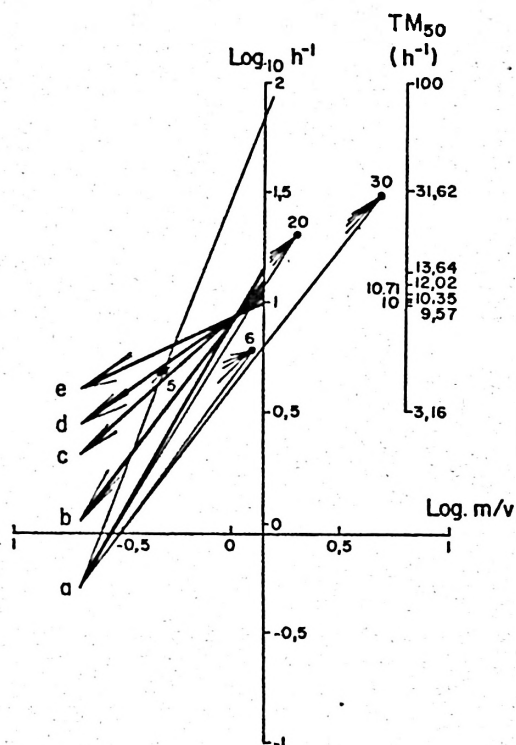


Fig. 3. Cálculo nomográfico de los tiempos medios de mortalidad (TM_{50}).

En ordenadas se representan los diversos tiempos de muerte a considerar ($Log_{10} h^{-1}$) y sus valores se corresponden, en cada caso, con los índices de mortalidad observados (m/v) y que se indican en abscisas ($Log_{10} m/v$). Se representan comparativamente las relaciones entre las medias muestrales de cada experimento (trazos finos) y la media poblacional total (trazos gruesos) para todos los puntos, observados cada hora, en cinco grupos control de 12 ratones sometidos a shock anafiláctico pasivo por IC. En todos los experimentos se tomó como origen el menor índice de mortalidad ($i = 0,1$; $Log_{10} = -0,698$) para los distintos tiempos considerados ($a = 0,5$; $b = 1$; $c = 2$; $d = 3$ y $e = 4$ horas, respectivamente). También, en ordenadas paralelas, se indican mediante su antilogaritmo los valores correspondientes de TM_{50} en h^{-1} .

grandes intervalos de observación, los valores medios muestrales se desvían poco del valor de la media poblacional (fig. 4). Basta una observación de 96 h con 6 animales (datos no mostrados)

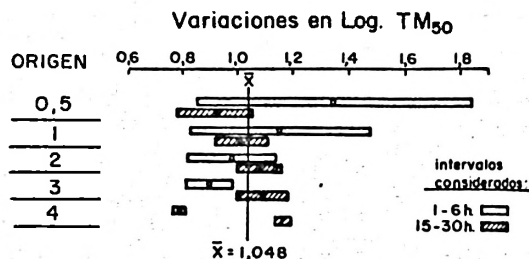


Fig. 4. Análisis de las variaciones de TM_{50} — según datos experimento representado en la figura anterior— considerando los distintos orígenes ($0,5-5 h^{-1}$) con idéntico índice de mortalidad ($i = 0,2$) y para dos intervalos de observación distintos.

Dentro de cada experimento, las barras representan oscilaciones de los resultados con indicación de los valores medios muestrales ($\bullet$; $\circ$) y de la media poblacional ($\bar{x}$) correspondiente a todos los grupos de 12 ratones sometidos a anafilaxia pasiva experimental por inmuno-complejos.

para cuantificar significativamente ($P < 0,1$) pequeñas diferencias de respuesta entre dos grupos de animales según se indica más adelante.

Mediante este método nomográfico, se determinan las variaciones del TM_{50} en distintos grupos de ratones tratados con PAT ($60 \mu g/kg$), TCP ($30 mg/kg$) o CNA ($50 \mu g/kg$) y se comparan con el grupo control (C) sin tratamiento alguno (fig. 5). Así, resulta perfectamente clara, frente al síndrome anafiláctico, la variable protección conseguida por tratamientos con un antiserotonínico (PAT) o un antiagregante plaquetario (PAT). De acuerdo con los datos mostrados en las figuras 3 y 5, el valor TM_{50} para el grupo control sin tratamiento es de 11 h con 10 min, mientras que si se calcula por otros métodos más laboriosos es de 11 h con 45 min. Este procedimiento nomográfico es particularmente útil para calcular diferencias entre grupos cuya mortalidad no llega al 100 % en el período de observación; bien sea porque las lesiones orgánicas producidas hayan adquirido una cierta cronicidad o por-

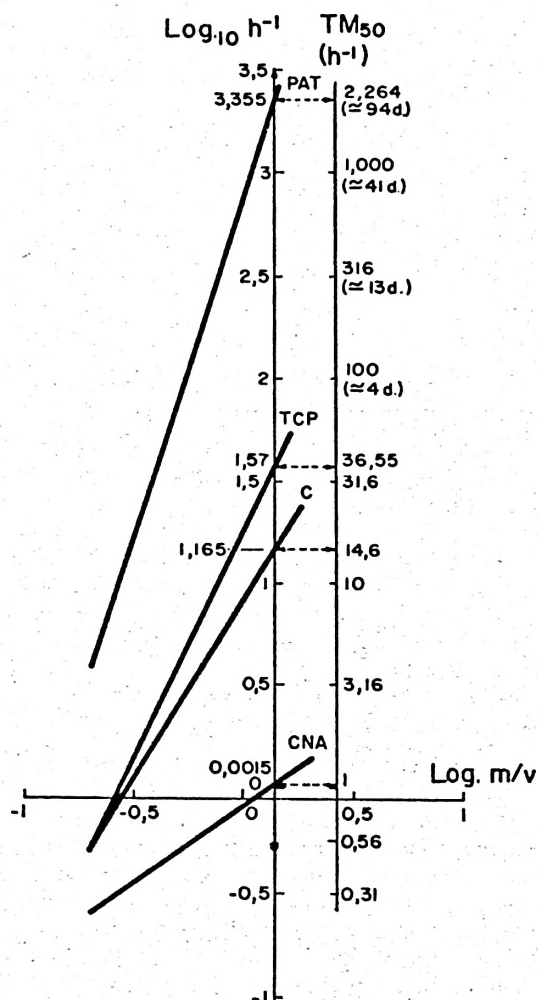


Fig. 5. Cálculo nomográfico de los tiempos medios de mortalidad (Tm_{50}) de distintos grupos de 12 ratones sometidos a shock anafiláctico pasivo por inmunocomplejo endotóxico.

Se comparan los resultados obtenidos entre los grupos control (C) y los tratados con ciproheptadina (PAT), ticlopidina (TCP) y clonidina (CNA). Las intersecciones en ordenadas indican, para cada caso, $\text{Log}_{10} h^{-1}$ de las medias poblacionales calculadas a partir del origen (muerte del primer ratón) y para todos los momentos de muerte del resto de los animales. Paralelamente, mediante su anti-logaritmo, se traducen estos valores en medidas del tiempo medio de mortalidad (Tm_{50}) expresado en horas. Las abscisas indican las variaciones del índice de mortalidad en $\text{Log}_{10} m/v$.

que debido a tratamientos farmacológicos, u otras causas, se originen curvas atípicas de muerte entre los distintos animales observados.

En ocasiones, también puede ser necesario comparar entre distintos grados de resistencia relativa del huésped frente al poder patogénico de inmuno complejos circulantes y para ello se examinan (fig. 6) las relaciones existentes entre los tiempos de muerte ($\text{Log}_{10} t$, en abscisas) y los correspondientes porcentajes de supervivencia ($\text{Log}_{10} \% \text{ mortalidad}$, en ordenadas). Cuando se estudian así los valores experimentalmente obtenidos, las intersecciones sobre el eje de ordenadas son indicativos de variaciones de mortalidad y dan una serie de valores, cuyo anti- Log_{10} da idea del poder patogénico del síndrome anafiláctico por IC, dentro de un determinado grupo de ratones y para unas condiciones experimentales dadas.

Se aprecia una mayor protección por el antiserotonínico (ciproheptadina) que por el anti-agregante plaquetario (ticlopidina) para un mismo intervalo de observación (0,5 - 72 h) en el que, para ambos casos, se ha llegado al 80 % de mortalidad (fig. 6).

A diferencia de la modalidad anterior, se pueden estudiar grupos con respuestas del 100 % de mortalidad durante el período de observación. Este procedimiento sirve para cuantificar una capacidad relativa de resistencia al shock anafiláctico, según el índice de máxima capacidad patogénica (IMCP) y este dato puede, a su vez, sustituir a los de determinación de dosis letales (LD_{50}) o dosis infectivas (ID_{50}) (19) en los que, por la propia naturaleza del fenómeno de anafilaxia pasiva por IC, no se pueden utilizar series de diluciones del décimo de la dosis desencadenante del shock, en animales previamente sensibilizados, ya que este procedimiento cambiaría la razón Ag/Ac y, por tanto, se modificarían las premisas experimenta-

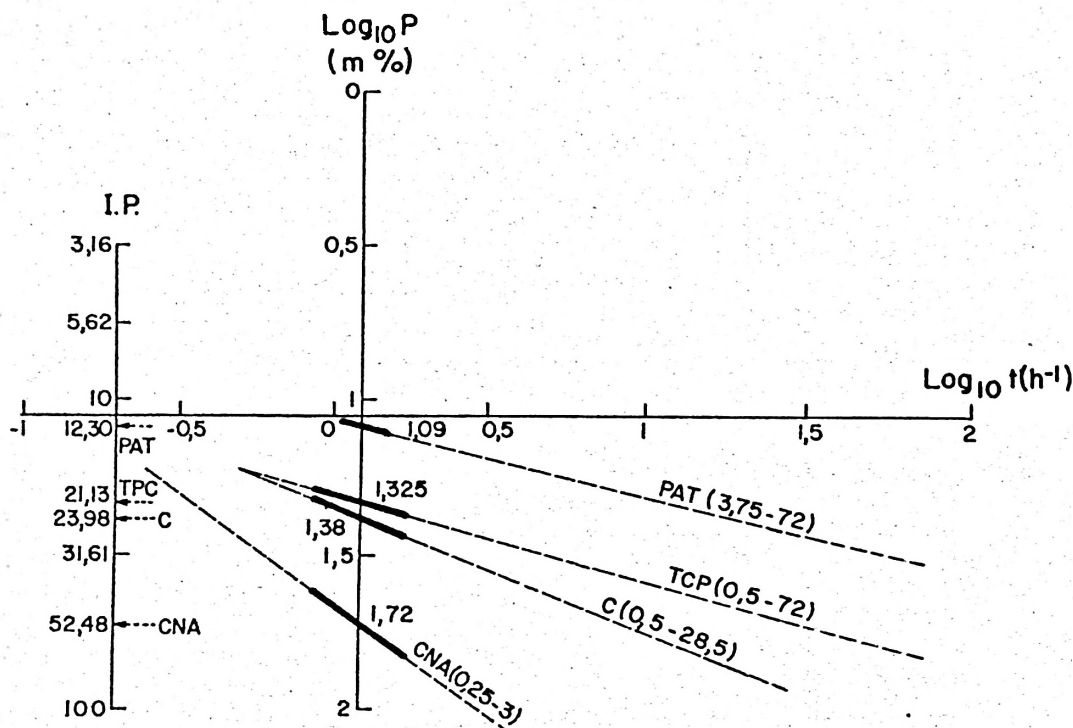


Fig. 6. Cálculo nomográfico de Índices de máxima capacidad patogénica (IMCP) del IC, sobre distintos grupos de 10 ratones.

En abscisas se representan los diversos tiempos de muerte a considerar ($\text{Log}_{10} t$ en h^{-1}) y sus valores se corresponden, en cada caso, con los porcentajes de mortalidad observados y que se indican en ordenadas ($\text{Log}_{10} M$ en %). Se comparan los datos obtenidos entre los grupos control (C) y los tratados con ciproheptadina (PAT), ticlopidina (TCP) y clinidina (CNA). Las intersecciones en ordenadas indican, para cada caso, los valores medios relativos a patogénesis para cada población murina, expresadas en logaritmos ($\text{Log}_{10} P$) y referidos a intervalos concretos de observación (de 0,25 a 72 h^{-1}) según el grupo que se considere. Paralelamente, los anti-logaritmos, señalados sobre la ordenada IP, indican los valores de IMCP obtenidos según el tratamiento.

les. Estos datos nomográficos permiten a su vez calcular un índice relativo de supervivencia (IRS) y, con éste, establecer comparación sobre un posible incremento de protección inmunofarmacológica producido por un determinado tratamiento.

Variaciones en el grado de patogénesis in vivo según la razón Ag/Ac utilizada. Las consecuencias inmunológicas y clínicas de la presencia de IC en el huésped pueden variar en función de: a)

la localización anatómica donde se realice la unión de Ag y Ac (29); b) las cantidades absolutas y relativas en que se encuentren ambos reactantes (29); y c) otros factores críticos que también determinan el tipo de IC formado (18). Según las condiciones fisiopatológicas de formación o eliminación de los IC, se pueden inducir anafilaxias sistémicas (11), reacciones cutáneas por aumentos de permeabilidad vascular (15) o incluso necrosis vasculares (7). En este caso, se ha comprobado que la patogénesis del

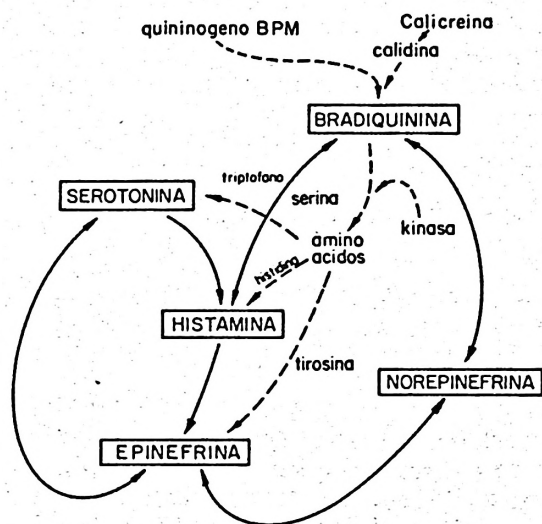


Fig. 7. Esquema de interdependencia bioquímica o metabólica, entre distintas aminas biógenas, con posible aplicación a estudios inmunofarmacológicos mediante empleo de inhibidores enzimáticos adecuados y moléculas precursoras marcadas. Sobre los quinínógenos de alto y bajo peso molecular (BPM) que darán lugar a bradiquinina, actúan las quinínogenasas liberadas en la lisis celular por la acción de los complejos Ab-Ac al activar el complemento.

cuadro anafiláctico por IC circulantes varía en intensidad según las relaciones Ag/Ac empleadas (tabla I) y, asimismo, que posiblemente estas relaciones Ag/Ac influyen en los factores críticos

de resistencia del huésped, en función de las características de formación y depósito vascular de los IC originados. Se ha comprobado por los datos obtenidos (tabla I) que: a) los inmunoprecipitados del grupo A (razón 1:1) carecen de efecto patológico mientras que en el grupo B (razón 2:1) aparece el máximo efecto, y b) que esta acción patológica va disminuyendo paralelamente a la disminución del anticuerpo precipitado en el IC (fig. 1), aumentando el índice relativo de supervivencia.

Variaciones en el grado de patogénesis dependientes de algunas características genéticas del huésped. Los complejos circulantes antígeno-anticuerpo pueden actuar en presencia o ausencia de complemento, dependiendo de su peso molecular y otros caracteres físicos, pero también en su acción patológica influyen determinadas características genéticas y celulares del huésped que pueden modificar el destino *in vivo* de los IC circulantes (16). Dado los antecedentes sobre la influencia de los sistemas de histocompatibilidad (MHC) en la susceptibilidad a ciertas enfermedades, particularmente a algunas de origen autoinmunitario (10), e incluso en fenómenos de modulación de las reacciones de hipersensibilidad por interferón (22), se ha ensayado la sensibilidad a IC cir-

Tabla I. Variabilidad patogénica en anafilaxia pasiva por inmunocomplejos endotóxicos, dependiente de la razón Ag/Ac en el precipitado (a).

Grupo experimental	Razón Ag/Ac	Proteínas en el IC (μg)	% de mortalidad ^(b)	TM ₅₀ (h ⁻¹) ^(c)	IMCP ^(d)	IRS ^(e)
A	1 : 1	680	0	—	—	—
B	2 : 1	568	80	6,76	30,54	2,27
C	3 : 2	462	66,6	2,213	1,42	69,42
D	4 : 6	341	6,6	N.D.	N.D.	N.D.

(a) El cuadro de shock por anafilaxia pasiva se ensayó en tres experimentos, sobre grupos de 15 ratones hembra de la estirpe Balb/c, utilizando cuatro razones Ag/Ac en la zona de exceso de Ag, indicados en la fig. 1; (b) Valores obtenidos a las 24 h de inyectada la endotoxina; (c) Datos obtenidos aplicando el procedimiento indicado en la fig. 3 para determinación de la media poblacional. La significación estadística entre los grupos A y B fue de $P < 0,005$. N.D. = no determinados; (d) Índice de máxima capacidad patogénica, calculado según el procedimiento que se indica en la fig. 6; (e) $IRS = \frac{100 - IMCP}{IMCP}$

Tabla II. *Influencia de características genéticas en la resistencia a cuadros de shock por anafilaxia pasiva experimental producidos con IC de endotoxina (a).*

Estirpes	Sistema MHC	% de mortalidad a las		TM ₅₀ (h ⁻¹)	IMCP ^(b)	IRS	Intervalos mediados (h ⁻¹) ^(b)
		6 h	24 h				
BALB/c	H-2 ^d	66,6	83,3	6,54	30,55	2,27	3 a 20
DBA2	H-2 ^d	83,3	83,3	2,27	46,23	1,16	1 a 4,5
C57Bl	H-2 ^b	83,3	83,3	0,95	47,86	1,08	1 a 3
Swiss	—	50	100	ND	23,71	3,21	6 a 24

(a) Determinado en tres experimentos, sobre grupos de 6 animales, de acuerdo con lo indicado en la tabla 1; (b) Para una más correcta comparación entre los distintos grupos experimentales, los puntos elegidos para la determinación de IMCP corresponden a intervalos de observación comprendidos entre 20 y 80 % de mortalidad.

culantes de cuatro diferentes estirpes de ratones (tabla II), siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Se observan algunas diferencias que no dependen tan sólo del sistema MHC, ya que dentro de un mismo sistema histocompatibilidad (H-2^d) la estirpe BALB/c es más resistente que la DBA2 y, por otra parte, estirpes histocompatiblemente diferenciadas como la C57Bl (H-2^b) y la DBA2 (H-2^d) tienen unos valores de IMCP y de IRS muy semejantes.

Sin embargo, en cuanto a la resistencia al *shock* en función del tiempo medio de muerte (TM₅₀), se aprecia una clara diferencia entre los cuatro grupos. Por los datos obtenidos parecen ser más resistentes la estirpe Swiss, con genoma más heterogéneo por su no consanguinidad, y después los de la estirpe BALB/c que es la que más se utiliza para este tipo de investigaciones.

Variaciones de respuesta, frente a cuadros de anafilaxia pasiva por inmunocomplejos, según la modalidad del tratamiento protector. Puesto que el cuadro anafiláctico pasivo por IC circulantes se instaura en dos fases —sensibilizante y desencadenante del *shock*, respectivamente— se han ensayado diferentes modalidades de protección, administrando tratamientos con un antiagregante plaquetario (0,3 mM TCP) antes de la sensibilización por suero o bien

antes de la administración de LPS. Con este experimento se ha podido comprobar una protección variable (tabla III), lo cual es lógico si se tiene en cuenta que la ticlopidina inhibe la agregación plaquetaria y como consecuencia disminuye la liberación de las aminas vasoactivas que intervienen en los mecanismos que facilitan el depósito de IC (5), incluso en reacciones leucocito-dependientes y sin intervención del complemento (14).

Por los datos obtenidos, según los valores de capacidad de protección inmunofarmacológica (PIF), el máximo de protección se alcanza en tratamientos previos a la sensibilización y dependiendo de ciertas características farmacocinéticas. Sin embargo, el tiempo de mortalidad relativo, para los distintos grupos (TM₅₀), es mayor cuando la acción anti-agregante plaquetaria se realiza en dos fases previas, a la sensibilización y a la del desencadenamiento del *shock*, respectivamente.

Aplicaciones del método nomográfico. El método aquí propuesto es de rápida y fácil aplicación para suministrar datos relativos a tiempos de letalidad (TM₅₀) y capacidad patogénica máxima (IMCP) en ensayos experimentales de respuestas de anafilaxia pasiva por complejos inmunes anti-endotoxina. Asimismo, se puede calcular un índice

Tabla III. Influencia de la modalidad del tratamiento protector con anti-agregantes plaquetarios en respuestas experimentales de anafilaxia pasiva por inmuno-complejos.

Grupo experimental		TM ₅₀ ^(a) (h)	IMCP ^(b) (%)	IRS ^(c)	ΔPIF ^(d) (%) control
A) Control sin tratamiento		22,11	36,72	1,72	100
B) Con 100 mg/kg de TCP 3 h antes de la sensibilización		12,88	13,18	6,58	382
Tratados con tidopidina	C) Con 100 mg/kg de TCP 1 h antes de la sensibilización	2,93	17,57	4,69	272
	D) Con 100 mg/kg de TCP 1 h antes del shock por LPS	5,70	21,84	3,57	207
	E) Con 50 mg/kg de TCP 1 h antes de la sensibilización y otros 50 mg/kg 1 h antes del shock por LPS	42,46	16,40	5,09	295

(a) Se representan los valores de la media de cada población para los tres experimentos realizados en cada caso; (b) valores calculados en todos los casos, entre 10 y 80 % de mortalidad; (c) $IRS = \frac{100 - IMCP}{IMCP}$; y (d) incrementos de protección inmunofarmacológica medidos en % de control sin tratamiento.

relativo de supervivencia (IRS) y, mediante este dato, establecer comparaciones entre la posible protección inmunofarmacológica (Δ PIF) usando distintos tratamientos. Los resultados mostraron una buena reproducibilidad entre los distintos grupos experimentales. El método de observación puede variar de 1 a 5 días, anotando en períodos fijos las variaciones de mortalidad, o también, tomando como puntos de referencia los momentos en que se produce alguna muerte.

En cuanto al número de animales mínimo, se han obtenido buenos resultados con grupos de 5-6 animales; los datos fueron tan reproducibles como los conseguidos con lotes de 10-15 ratones. Es conveniente que en el caso de determinar TM₅₀ se usen lotes en los que no se produzca el 100 % de mortalidad. Cuando se calculan valores comparativos de IMCP, entre distintos grupos experimentales, conviene utilizar límites de observación semejantes para todos los grupos reflejados en función

de iguales o parecidos porcentajes de mortalidad.

Como es sabido, la inyección de complejos inmunes preformados *in vitro* únicamente permiten estudiar los sistemas de defensa celular del huésped, pero no hacen posible el conocimiento de los mecanismos de depósito de estos IC a lo largo de las membranas basales del aparato vascular. Mediante nuestro modelo de anafilaxia pasiva se originan *in vivo* los IC circulantes y si, además, se coordinan métodos inmunohistoquímicos con empleo de antígenos marcados se pueden reproducir lesiones semejantes a las observables en patología humana. El hecho de que la hipersensibilidad ligada a IC pueda considerarse como un desequilibrio entre la formación del IC, su eliminación fisiológica y su depósito, permite aplicar este modelo para estudios inmunofarmacológicos. En éstos, al hacer intervenir diferentes fármacos, de conocida interdependencia fisiológica (fig. 7), se pueden ensayar distintas condiciones que influyan en el depósito de

los IC circulantes y en su posible control fisiopatológico con el fin de analizar el papel de distintas aminas biógenas, de sus precursores e inhibidores, e incluso comprobar el efecto de distintos mediadores autacoides sobre el *shock* anafiláctico por IC (12, 20, 24). Asimismo, cabe que estos resultados sean utilizados como modelos teóricos de supervivencia después de tratamientos simultáneos o secuenciales con distintos agentes farmacológicos, permitiendo prejulgar sobre la protección frente a una lesión a distintos niveles de patogenia.

Agradecimientos

Trabajo subvencionado por la CAICYT y perteneciente al Proyecto núm. 0034-CO5-81. Los autores agradecen la asistencia técnica de D.^a María Luisa del Pozo y D.^a Elena Cuesta, así como la excelente colaboración de A. Hurtado en el dibujo de gráficas y figuras.

Resumen

Se estudian las modificaciones producidas por distintos fármacos en cuadros de *shock* por anafilaxia pasiva debida a inmunocomplejos de endotoxina de *Brucella abortus* en ratón. Ante las dificultades para evaluar los resultados con criterios clásicos, se cuantifican los resultados mediante nomogramas. Este método es de aplicación fácil y rápida, consiguiéndose, en el modelo ensayado, datos relativos a tiempos medios de letalidad (TM_{50}), capacidad patogénica máxima (IMCP) e índice relativo de supervivencia (IRS), los cuales permiten comparar la protección inmunofarmacológica (Δ PIF) de distintos tratamientos y pautas de administración de los reactivos y fármacos. La representación nomográfica es de utilidad en aquellos fenómenos (como la anafilaxia pasiva por inmunocomplejos) que por su naturaleza no permiten el ensayo de diluciones seriadas de reactivos.

Se observa un diferente grado de reacción anafiláctica en función de ciertas características genéticas del huésped, así como una mayor protección frente al *shock* por un antiserotoninico (ciprohep-

tadina) que por un antiagregante plaquetario (ticlopidina), mientras que la clonidina produce efectos contrarios.

Bibliografía

1. ALVAREZ, D. M.: VII Congreso Nacional de Microbiología, Cádiz, 1979, p. 409.
2. ALVAREZ, D. M.: VIII Congreso Nacional de Microbiología, Madrid, 1981, p. 76.
3. BAKER, P. J. y WILSON, J. B.: *J. Bacteriol.*, **90**, 896-902, 1965.
4. BENVENISTE, J.: *Nature*, **249**, 581-582, 1974.
5. COCHRANE, C. G.: *J. Exp. Med.*, **118**, 503-513, 1963.
6. COCHRANE, C. G. y KOFFLER, D.: *Adv. Immunol.*, **16**, 185-264, 1973.
7. COCHRANE, C. G. y WEIGLE, W. O.: *J. Exp. Med.*, **108**, 591-604, 1957.
8. DIXON, F. J., FELDMAN, J. D. y VASQUES, J. J.: *J. Exp. Med.*, **113**, 899-919, 1961.
9. EISENSTEIN, T. K., ANGERMAN, C. R. y DEAKINS, L. W.: En «Immunomodulation by bacteria and their products» (H. Friedman, T. W. Klein and A. Szenrivanya, eds.). Plenum Press, Nueva York, 1981, pp. 199-214.
10. FESTENSTEIN, H. y DEMANT, P.: «HLA and H-2 basic immunogenetic, biology and clinical relevance» Edward Arnold Ltd. Londres, 1978, pp. 161-176.
11. GERMUTH, F. G. y MCKINNON, G. E.: *Bull. John Hopkins Hosp.*, **101**, 13-17, 1957.
12. HABERLAND, G. L.: *Klin. Wochenschr.*, **56**, 325-331, 1978.
13. HEIDELBERGER, M. y KENDALL, F. E.: *J. Exp. Med.*, **62**, 697-700, 1935.
14. HENSON, P. M. y COCHRANE, C. G.: *J. Exp. Med.*, **133**, 554-571, 1971.
15. ISHIZAKA, K. y CAMPBELL, D. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**, 635-641, 1958.
16. JACOTOT, B., REINERT, Ph., REYES, F., SOBEL, A. y SYLVESTRE, F.: «Abrégé d'Immunopathologie». Toray-Masson, S. A., París, 1980, p. 51.
17. KNIKER, W. T. y COCHRANE, C. G.: *J. Exp. Med.*, **127**, 119-135, 1968.
18. KOHLER, P.: *Medicine* (Baltimore), **52**, 419-429, 1973.
19. KUEHNE, R. W.: *J. Clin. Microbiol.*, **17**, 702-703, 1983.
20. LEVINE, R. J.: En «Duncan's disease of metabolism: The genetic and biochemical basis

- of disease» (Bandy and Rosenberg, eds.). W. G. Saunders Co., Filadelfia, 1974, pp. 1651-1684.
21. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-270, 1951.
 22. MAEYER, E. DE, y MAEYER-GUIGNARD, J. DE: *Nature*, **284**, 173-175, 1980.
 23. NAYLER, W. G. y STONE, J.: *Eur. J. Pharmacol.*, **10**, 161-167, 1970.
 24. PIPER, P. J. y VANE, J. R.: *Nature*, **223**, 29-35, 1969.
 25. PORTOLÉS, A., OJEDA, G., DÍAZ, R. y ÁLVAREZ, M.: En «Microbiología-83». Soc. Esp. Microbiol. Vol. 1/2 Valladolid, 1983, pp. 611-612.
 26. ROITT, I. M., CAMPBELL, P. N. y DONIACH, D.: *Biochem. J.*, **69**, 248-256, 1958.
 27. SOKAL, R. R. y ROHIF, F. J.: *Introduction to Biostatistics*. Freeman and Co., San Francisco, 1979, pp. 90-129.
 28. UNANUE, E. R. y DIXON, F. J.: *Adv. Immunol.*, **6**, 1, 1967.
 29. WILLIAMS, R. C. Jr.: *Immune complexes in clinical and experimental medicine*. Harvard Univ. Press. Cambridge (Mass) 1980, p. 548.

