

EL SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN CABRAS (GLA): I. PRUEBA DE MICROCITOTOXICIDAD Y OBTENCIÓN DE SUEROS REACTIVOS.

(MAJOR HISTOCOMPATIBILITY SYSTEM IN GOAT (GLA): I. MICROCYTOTOXICITY TEST AND REACTIVE SERA PRODUCTION).

Molina Alcalá, A., M.C. Crespo Giráldez y D. Llanes Ruiz

Departamento de genética. Instituto de zootecnia. Facultad de veterinaria. Córdoba (España).

Palabras clave: Inmunogenética. Capra hircus. Antígenos linfocitarios.

Keywords: Immunogenetics. Capra hircus. Lymphocyte antigens.

Summary.

A microcytotoxicity test to detect lymphocytes antigens in goats was described. According to our data, a two-step test, 1.077 Ficoll density and rabbit serum as the source of complement were the best procedures for detecting lymphocyte antigens in goats.

Using this test and sera produced through skin grafting and immunizations with cells, we described two antisera (39 and 94) SC₁ and SC₂ that detect two antigens or two groups of antigens of the histocompatibility complex in goats (GLA). These antisera, with title of 1/128 and 1/256 respectively, react with cells from different animals presenting clear cut behaviours: SC₁ recognized 14% positives animals and SC₂, 42%. The sera activity lasted for three months after the final inoculation.

Resumen.

Se ha realizado la puesta a punto de una prueba de microcitotoxicidad para detectar antígenos linfocitarios en cabras. Mediante esta dócima y utilizando sueros producidos por trasplantes de piel en cabras, se describen dos antisueros (SC₁ y SC₂), capaces de detectar distintos antígenos o grupos de antígenos pertenecientes al sistema de histocompatibilidad caprino (GLA).

Recibido para publicación: 2-3-88. Aceptado: 27-4-1988.

Introducción.

El mayor interés del estudio del GLA, en cabras, radica en la búsqueda de las posibles relaciones del GLA con la sensibilidad o resistencia a determinadas enfermedades, hecho ya demostrado en otras especies (Dausset, 1977; Cudwort, 1981; Millot, 1982; y Davis, 1984).

Por otra parte, el GLA puede servir de base para la realización de estudios filogenéticos, y contribuir a los controles de paternidad y a la búsqueda de posibles relaciones con caracteres productivos.

El estudio del sistema de histocompatibilidad caprino se inició en 1976 con los trabajos de Van Dam, quien propuso el término de GLA (Goat Lymphocyte Antigens) para designarlo, describiendo 9 especificidades SD asignadas a dos loci ligados.

Nesse (1987a, 1987b) ha descrito diez especificidades distintas en cabras noruegas, aunque no se ha determinado el número de loci implicados.

Tradicionalmente, son dos los métodos de obtención de antisueros frente a antígenos de MHC: a) A partir de suero de hembras paridas, que desarrollan anticuerpos frente a los antígenos que no comparte con el feto; b) A partir de inmunizaciones inducidas con antígenos MHS, bien mediante aloinjertos de piel, bien mediante inoculaciones de linfocitos.

En nuestro trabajo realizamos la puesta a punto de una técnica que permita la detección de estos antígenos, eligiéndose la prueba de la microcitotoxicidad por ser la más extendida y permitir una más fácil comparación de resultados. Una vez realizado esto, procederemos a obtener sueros reactivos por dos de los métodos más utilizados: hembras multíparas e inmunizaciones. En este último caso, se usarán injertos cruzados de piel e inoculaciones de linfocitos, procediendo finalmente a demostrar cuáles de los sueros producidos tienen un mayor valor para detectar antígenos del GLA.

Material y métodos.

CÉLULAS. Las suspensiones linfocitarias se obtuvieron a partir del lote de cabras de raza malagueña que el Departamento de genética y mejora tiene en la Facultad de veterinaria de Córdoba.

La técnica seguida fue básicamente la de Boyum (1968).

SUEROS.

Control positivo. Se obtuvo mediante hiperinmunización de conejos con linfocitos de cabra (inoculaciones semanales de 1 ml de suspensión linfocitaria ajustada a 6-8 millones linfocitos/ml, durante 4 semanas).

Sueros reactivos. Los sueros analizados fueron obtenidos, por una

MOLINA ET AL.: EL SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN CABRAS (GLA).

parte, a partir de cabras paridas del rebaño y, por otra, a partir de cabras aloinmunizadas mediante un injerto cruzado de piel.

La técnica seguida para el trasplante fue la utilizada por Balner (1969) en injertos de piel entre monos (Macacus rhesus), realizándose un aloinjerto y un autoinjerto de control en cada cabra. Se obtuvo suero, antes del trasplante, cada 15 días a partir del mismo, durante los tres primeros meses y, por último, a los cinco meses del trasplante.

COMPLEMENTO. Como fuente de complemento se utilizó, por una parte, suero de cobayas y, por otra, suero de conejos.

TÉCNICA DE MICROCITOTOXICIDAD. Se utilizó, básicamente, la técnica de Terasaki y McClevelan (1964), con algunas modificaciones.

Las placas (Greiner. Co) se preparaban con antelación, añadiendo a cada pocillo una gota de parafina y 2 microl. de los sueros a probar, según el diseño de la placa. Estas se guardaban a -20° C durante un tiempo máximo de dos semanas.

La suspensión linfocitaria era ajustada a 2.000 linfocitos viables/microlitro.

TÉCNICA EN UNA ETAPA. Una vez descongeladas las placas, se le añade a cada pocillo 2 microl. de linfocitos, y a continuación, 1 microl. de complemento, dejando incubar a $37-40^{\circ}$ C. Transcurrido este tiempo, se le añaden 2 microl. de eosina al 2% como colorante de discriminación, fijando la reacción a los cinco minutos con 3 microl. de formalina al 30%.

TÉCNICA EN DOS ETAPAS. Difiere del anterior método en que, tras la adición de las células, se somete a una incubación de 30 minutos antes de la adición del complemento (después de ésta, se lleva a cabo otra incubación de 30 min.).

En cada placa se incluyen controles positivos, negativos de complemento y de suero.

La lectura se realiza en microscopio invertido de contraste de fases, considerándose positivos sólo aquellos pocillos que presentan más de un 60% de porcentaje de citotoxicidad (% de células muertas).

TITULACIÓN DEL COMPLEMENTO Y SUEROS POSITIVOS. Se llevaron a cabo pruebas de microcitotoxicidad en dos etapas, siendo el título la mayor dilución del reactivo que determinó un mínimo del 60% de mortalidad celular.

ABSORCIÓN CON GLÓBULOS ROJOS. Se utilizó la técnica de Nguyen (1980).

Resultados y discusión.

PRUEBA DE MICROCITOTOXICIDAD.

Se estudiaron, detenidamente, los principales parámetros de la técnica de Terasaki, destacando:

Fuente de complemento. El complemento de conejo presentó un título de citotoxicidad de 1/64, frente al 1/128 del complemento de cobaya, como se observa en la figura 1. Además, el complemento de cobaya presentaba una capacidad citotóxica algo más elevada que el de conejo.

A pesar del mejor comportamiento del complemento de cobaya, las escasas diferencias con el de conejo a la dilución de utilización en la pruebas (1:1, 1:2) y la mayor facilidad de obtención del suero de conejo, hicieron que nos decidiésemos por este último para su uso en ellas.

Estos datos coinciden con los obtenidos por Van Dam (1981), aunque son menos concluyentes.

Densidad del Ficoll-urografin. Se determinó una densidad óptima de 1.077, resultado que concuerda plenamente con el obtenido por Van Dam (1981).

Control negativo. Se analizaron, como fuente de control negativo, el suero de macho cabrío, el suero de hembras nulíparas y PBS, sin que hubiese variación apreciable en la citotoxicidad espontánea.

Técnica. La técnica que determinó mejores resultados en las pruebas de microcitotoxicidad en cabras, es la descrita en el apartado de material y métodos, y no se encontraron diferencias significativas entre el método en una y en dos etapas; aunque este último se mostró más sensible en pruebas que exigen una mayor exactitud en la determinación del porcentaje de citotoxicidad (como son las titulaciones).

La diferenciación de células muertas y vivas, basándonos en criterios de coloración, tamaño y forma de las células, resultó ser un método fácil. Se consideraron sueros positivos aquellos cuyo porcentaje de citotoxicidad fue superior al 60% (siempre que los controles negativos fuesen inferiores al 20%).

OBTENCIÓN DE SUEROS REACTIVOS.

A partir de cabras múltiparas. Se mostró un método fácil y muy eficaz de obtención de sueros positivos. El enfrentamiento de los sueros de las cabras múltiparas con el panel de células, determinó la existencia de un 50%

de posibles sueros positivos, con título, en su mayoría, de 1:1 a 1:4, no superando nunca 1:8. Estos resultados son similares a los obtenidos por Nesse y Larsén (1987a).

A partir del trasplante de piel. El rechazo de los aloinjertos apareció, aproximadamente, a las dos semanas. En la fig. 2 se representa la evolución del poder citotóxico de ambos sueros positivos. La menor eficacia del rechazo se observa en la cabra nº 39 (puede ser debida a las deficiencias nutricionales, GLA, etc.).

En la tabla I, la evolución del título muestra también esta menor eficacia (menor título y mayor tiempo necesario para detectarse anticuerpos frente a los aloantígenos), así como el elevado título de ambos sueros reactivos SC₁ y SC₂ (suero cabra 1 y suero cabra 2), (1:128 y 1:256, respectivamente), demostrativo de la gran eficacia de este método en la producción de inmunosueros. En ambos casos, su capacidad citotóxica desaparece a los tres meses, y al mes hay una disminución sustancial del título (1/16). Estos datos deben ser tenidos en cuenta cuando se utilicen como fuente de suero las hembras multíparas, ya que posiblemente al mes del parto no existan anticuerpos contra los antígenos de histocompatibilidad.

El estudio de estos dos sueros, frente a un panel de animales, da lugar a dos comportamientos claramente distintos: mientras el SC₁ detecta un porcentaje del 14% de animales positivos, en 28 animales estudiados, el SC₂ lo hace en un 42% de 30 animales. Estos datos, junto con la evidencia de que son escasos los animales que se presentan positivos con los dos sueros (7%), nos inclina a pensar que estos sueros distinguen un antígeno o grupo de antígenos pertenecientes al mismo locus. Una más exacta comprobación de esta hipótesis necesitará del estudio del comportamiento frente a un mayor número de animales, así como de pruebas de absorción dirigidas a comprobar si nos encontramos ante sueros mono o poliespecíficos.

Los sueros positivos obtenidos no perdieron su citotoxicidad tras la absorción con eritrocitos de cabra, quedando así clara la no existencia de especificidad por el sistema de grupos sanguíneos eritrocitarios.

Estos datos demuestran que ambos métodos de obtención de sueros reactivos frente al GLA son igualmente válidos. Aunque, evidentemente, el mayor título de los sueros producidos mediante el trasplante los hacen idóneos para futuros estudios de herencia, así como para procesos de absorción; no ocurre lo mismo con los sueros obtenidos a partir de hembras multíparas, que necesitan de posteriores estudios estadísticos estando las absorciones dificultadas por el escaso título que poseen.

Agradecimiento.

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por el proyecto de investigación nº. CP8414/1985, concedido por la Junta de Andalucía, y por una beca de F.P.I., Junta de Andalucía, que disfruta el Ldo. Antonio Molina Alcalá.

Bibliografía.

- Balner, H. 1969. Skin grafting in monkeys and apes. *Transplantation* 8, 206-209.
- Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 77-89.
- Cudworth, A., and E. Wolf. 1981. The HLA system and disease. *Clin. Science* 61, 1.
- Van Dam, R.H. 1981. The major histocompatibility complex of the goat: definition and some aspects of its biological function. Tesis doctoral. Universidad de Utrech.
- Dausset, J., and A.Svejgaard. 1977. HLA and disease. Munksgaard Copenhag.
- Davis, W.C, J.W. Shelton, and C.W. Weems. 1984. Characterization of the bovine immune system and the genes regulating expression of immunity with particular reference to their role in disease resistance. Proceedings from a Symposium held at Honolulu, Hawaii.
- Millot, P, J. Chatelain, and F. Cathala. 1982. Le complexe majeur d'histocompatibilité OLA du mouton. Frecuence des facteurs chez des ovins atteints ou non de tremblante (scrapie). *C.R. Acad. Sci., París.* 294: 87-89.
- Nesse, L., and J. Larsen. 1987. Production of alloantibodies againstst caprine lymphocyte antigens. *Animal Genetics.* 18: 159-165.
- Nesse, L., and J. Larsen. 1987. Lymphocyte antigens in Norwegian goats: serological and genetic studies. *Animal Genetics* 18: 261-268.
- Nguyen, T.C., and T.D. Bunch. 1980. Blood groups and evolutionary relationships among domestic sheep (*Ovis aries*), domestic goats (*Capra hircus*), Aoudad (*Ammotragus lervia*) and European mouflon (*Ovis musimon*). *Ann. Genet. Sel. Anim.* 12 (2): 169-180.
- Terasaki, P., J. McClelland, M. Park, and B. McCurdy. 1973. Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Manual of Tissue Typing Techniques.* p. 54.

Tabla I. Título de los sueros positivos obtenidos por inmunizaciones y trasplante

Día		SC ₁	SC ₂
1. 0	Suero antes del injerto	---	---
2. 15	Suero a las dos semanas del injerto	---	1:64
3. 30	Suero después de 1 inoculación	1:16	1:256
4. 45	Suero después de 2 inoculaciones	1:32	1:128
5. 60	Suero después de 3 inoculaciones	1:128	1:64
6. 90	Suero al mes de la última inoculación	1:16	1:16
7. 150	Suero a los 3 meses de la última inoc.	---	---

TITULACION DEL COMPLEMENTO DE CONEJO Y COBAYA

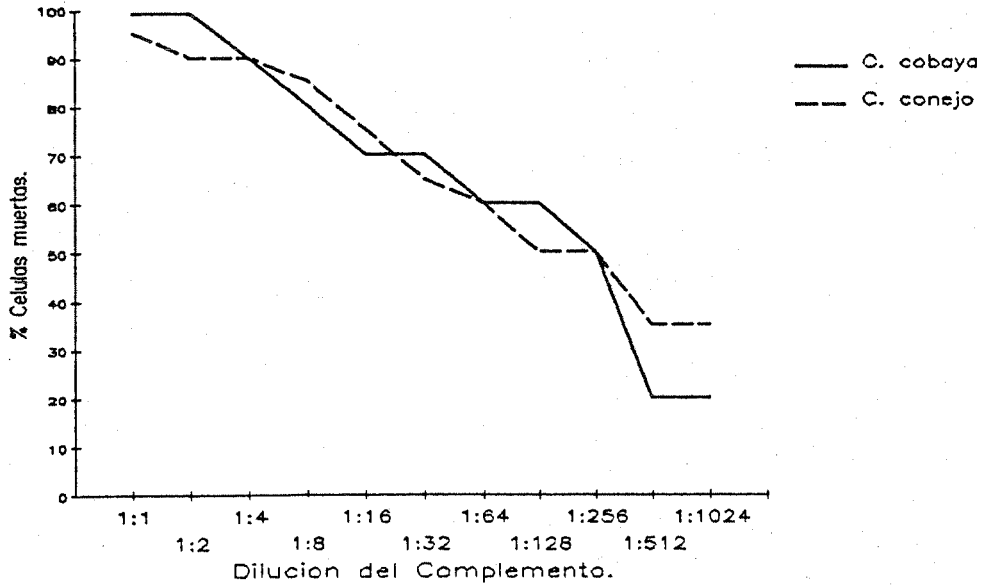


Fig. 1

Figura 1. Titulación del complemento de conejo y cobaya.

EVOLUCION DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS SUEROS POSITIVOS SC1 Y SC2

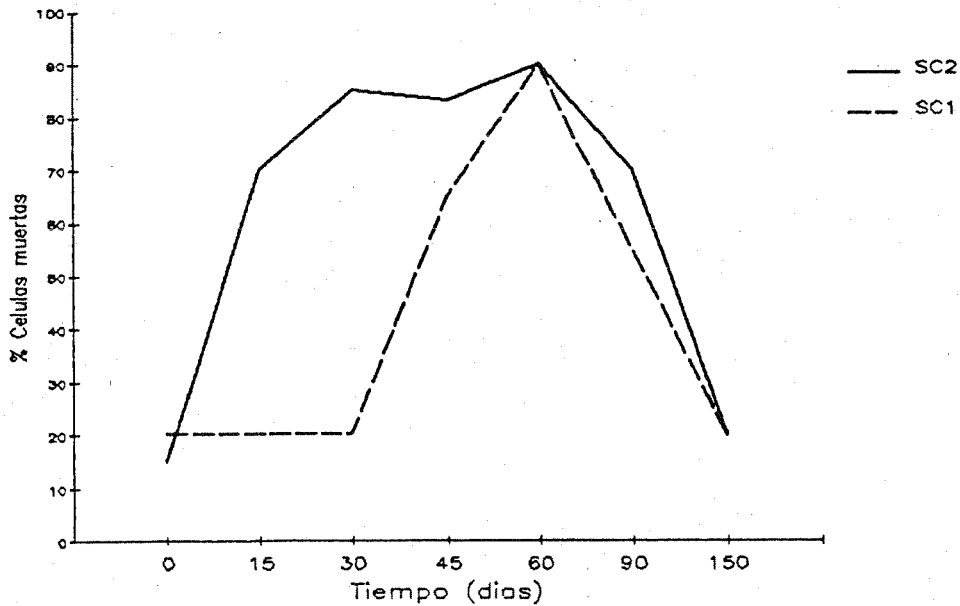


Fig.2

Figura 2. Evolución de la citotoxicidad de los sueros positivos SC₁ y SC₂