

INJERTOS DE PIEL EN CABRAS Y OBTENCION DE SUEROS REACTIVOS PARA EL ESTUDIO DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CAPRINO (GLA).

SKIN GRAFTING IN GOATS AS A POSSIBLE SOURCE OF REACTIVE SERA TO STUDY THE GOAT MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX (GLA).

Molina Alcalá A., M.C. Crespo Giráldez, E. Camacho Vallejo, J.V. Delgado Bermejo y D. Llanes Ruiz.

Departamento de Genética. Instituto de Zootecnia. Facultad de Veterinaria. 14005 Córdoba. España.

Palabras clave: Inmunogenética, Antígenos linfocitarios, Aloantisueros, MHC.

Keywords: Immunogenetics, Skin grafting, Lymphocyte antigens, Aloantibodies, GLA, MHC.

Summary

A simple surgical technique in goats for skin grafting to produce reactive sera against GLA (goat major histocompatibility complex) is described.

After 15 days the graft was rejected. Rejection occurred when the macroscopic changes of the allograft were substantial when compared to those of the autograft.

In this preliminary study, after one and two months of skin grafting, the cytotoxicity titers were of 256 and 128, respectively for the two animals involved. This was encouraging for further use of the technique as a putative source of GLA typing reagents.

Resumen

Se describe una técnica quirúrgica para la realización de injertos de piel en caprino, con vistas a la obtención de sueros reactivos frente al complejo mayor de histocompatibilidad caprino (GLA).

Se realizó un aloinjerto y un autoinjerto de control en cada animal. El momento del rechazo (a partir de los 15 días) se determinó por observación de los cambios macroscópicos substanciales producidos en el aloinjerto en relación con los ocurridos en el autoinjerto.

Los títulos de citotoxicidad obtenidos fueron de 1:256 para el suero 94, al mes del in-

jerto y de 1:128 para el suero 39 a los dos meses del mismo. Ello sugiere que la técnica podría ser potencialmente de interés como fuente de reactivos GLA.

Introducción

La importancia del estudio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las especies domésticas ha sido demostrada en estudios de paternidad, trasplantes de órganos en animales de gran valor, en relación con caracteres productivos y en asociación con resistencia a enfermedades y respuesta inmune.

La cabra no es una excepción, así el estudio de su MHC puede contribuir al desarrollo de una tecnología moderna de actuación en la mejora genética, y sanidad de este ganado que, por su censo y repercusión social, tanta representatividad está adquiriendo.

Tradicionalmente son dos las estrategias de obtención de sueros re-

activos a los antígenos del MHC: a) a partir de hembras paridas, que desarrollan anticuerpos frente a los antígenos paternos del feto; y b) a partir de individuos inmunizados con antígenos MHC, mediante aloinjertos y aloimplantes de piel, o mediante inoculación de suspensiones linfocitarias.

El estudio del complejo mayor de histocompatibilidad caprino se inicia en 1976 con los trabajos de Van Dam, quien propone el término de GLA (Goat Lymphocyte Antigens) para designarlo, describiendo nueve especificidades frente a antígenos detectables serológicamente (SD) asignados a dos *loci* ligados, demostrando así mismo la influencia del GLA del donante y del receptor en el tiempo de supervivencia del injerto (Van Dam 1981).

Desde entonces, diversos autores han obtenido sueros reactivos frente al GLA mediante distintas estrategias. Así Newman *et al.* en 1984 obtuvieron sueros reactivos frente al GLA a partir de cabras multiparas, mediante injertos e inmunizaciones cruzadas; Ruff y Lazary (1984) obtuvieron 23 aloantisueros a partir de hembras primíparas y mediante inmunizaciones; Nesse y Larsen (1987^{a,b}) obtuvieron diez especificidades distintas en cabras noruegas mediante inmunizaciones de cabras primíparas con sangre completa de sus propios cabritos.

La técnica de obtención de sueros reactivos mediante injertos de piel ha sido ampliamente utilizada en múltiples especies de mamíferos, entre otras en cerdos (Binns 1967), primates

(Balner 1969), vacuno (Spooner *et al.* 1979), marsupiales (Stone *et al.* 1987) o cabras (Van Dam 1981), y en aves como las palomas (Delgado *et al.* 1987).

En todos estos casos se ha seguido una técnica parecida con pequeñas variaciones según la naturaleza y tamaño de la especie investigada. Así la técnica se compone de la fijación de uno a varios aloinjertos procedentes de otro individuo y uno a varios autoinjertos de control.

En el presente trabajo se describe una técnica de injerto de piel, llevada a cabo por primera vez en España en cabras, con el propósito de obtener sueros reactivos frente a antígenos del sistema de histocompatibilidad caprino (GLA), determinando la intensidad de respuesta inmune y persistencia de la misma.

Material y Métodos

Elección de la pareja para el injerto.

Los injertos fueron realizados a dos cabras adultas, cada una de las cuales sirvió de donadora para la otra. Ambas, de raza Malagueña, fueron escogidas del rebaño experimental del Departamento de Genética por no presentar reacción de citotoxicidad cruzada en el test de microlinfocitotoxicidad. Es decir, el suero de cada una de ellas carecía de anticuerpos reaccionantes con los linfocitos de la otra. Los tipos GLA de estas cabras se desconocían por carecer en nuestro país de reactivos tipificadores de los antígenos correspondientes. No obstante, el injerto se llevó a cabo bajo la hipóte-

sis de que las dos cabras diferían en al menos uno de los antígenos del MHC, circunstancia muy frecuente, dada la riqueza de antígenos de este complejo. Se comprobó el estado sanitario de los animales sometiéndolos a un chequeo general, consistente en un análisis de sangre (velocidad de sedimentación, recuentos globulares, fórmula leucocitaria, glucemia y calcemia), temperatura basal, pulsaciones/minuto y respiraciones/minuto en reposo.

Preoperatorio. Los animales fueron desparasitados diez días antes de la operación, mediante inoculación subcutánea de una solución de ivermectinas^a al 1%; asimismo les fue suministrada una dosis de concentrado adicional, quedando compuesta la ración diaria por pradera y paja de cereales *ad libitum*, 200 g/animal y día de un pienso compuesto^b granulado (14,5% de proteína bruta) y 150 g/animal y día de concentrado proteico (habas secas).

Veinticuatro horas antes de la operación, los animales fueron sometidos a un ayuno absoluto, en prevención de reacciones eméticas provocadas por los anestésicos.

Técnica quirúrgica. En la región costal derecha se depiló una superficie de unos 25 dm² en un área de piel flexible lavada previamente con jabón, seca y desinfectada con una solución de permanganato potásico.

Los animales fueron sedados con xilacina^c al 2% mediante inyección intramuscular de 0.5 ml de dicha solución/animal, complementándose

con anestesia local por inoculación subcutánea de Lidocaína-HCL^d.

Se señalaron con un lápiz grasoso áreas de 4 cm de lado sobre la piel de esta zona, después fueron obtenidas mediante incisión y disección roma, incluyendo epidermis más porción apical de la dermis, por encima de la raíz del pelo, a través del tejido elástico fibroso de la dermis. Estos dos explantes de piel fueron colocados con la cara pilosa hacia abajo en placas de Petri conteniendo 10 ml de MEM^e estéril. Los explantes de piel fueron separados de las adherencias paniculares y fascias tisulares mediante raspado con escalpelo.

Seguidamente se procedió a la implantación de los explantes de piel en los huecos preparados por la disección (comenzando por los aloinjertos), en los que previamente se habían detenido con adrenalina las pequeñas hemorragias. El implante se extendió sobre la zona a reparar y se sometió a una suave pero persistente presión hasta que la dermis quedó entretejida con el tejido subyacente, sujetando cada cuadro de piel por los vértices a sus homónimos del lecho mediante pinzas hemostáticas curvas de 12 cm. A continuación fueron suturados los lados del cuadrilátero mediante cuatro puntos de sutura independientes (seda número 1), y se sustituyeron las pinzas hemostáticas por sendos puntos de sutura de la misma naturaleza.

La superficie depilada, y en especial la intervenida, fué rociada con un aerosol antibiótico y propelante^f. Toda la superficie fué cubierta con una gasa impregnada de parafina y fijada con un esparadrapo; sobre

a) Ivomec, Merk.

b) Sanders.

c) Scandinibsa, Inibsa.

d) Rompum, Bayer.

e) Difco.

f) Andreu.

esta se colocó una capa de algodón para absorber exudados y amortiguar posibles traumatismos, rodeando todo ello con un vendaje elástico circular.

Postoperatorio. Los animales fueron aislados en corrales individuales, donde se les sometió a un ayuno de 12 horas, suministrándoles a continuación una alimentación progresivamente más rica hasta alcanzar los niveles del preoperatorio.

Seguimiento del injerto. El vendaje elástico fué retirado al cuarto día, cambiando diariamente desde entonces la protección de los injertos, después de tratar con el aerosol antibiótico.

Al sexto día fueron retirados los puntos de sutura.

Diariamente fueron observados los cambios macroscópicos en los injertos a fin de determinar el día del rechazo.

Obtención de sueros reactivos. Se obtuvo sangre venosa de la yugular de los animales transplantados mediante vacutainer estériles impregnados con heparina-sodio, un día antes del injerto, cada 15 días a partir del mismo durante dos meses, al tercer mes y una última extracción a los cinco meses del injerto.

Test de citotoxicidad. Se utilizó la técnica de microlinfocitotoxicidad en dos etapas (Molina *et al.* 1988), a fin de determinar la capacidad reactiva de cada suero obtenido, tanto frente a estos dos animales, como a un panel control de 30 cabras.

Resultados y Discusión

Evolución de los injertos. La evolución de los injertos fue observada a diario a fin de determinar el momento del rechazo. A los 2-3 días de la implantación los injertos se tornaron rosáceos (debido a la restauración del riego en la zona, con una hipervascularización de la misma). A la semana, tanto auto como aloinjertos aparecieron ligeramente hinchados y flexibles (debido a una ligera hiperplasia epidérmica y a un edema moderado); los aloinjertos comenzaron a necrosarse en los bordes.

El momento de rechazo se determinó por observación de los cambios macroscópicos producidos en el aloinjerto, así como por comparación con los cambios del autoinjerto. El rechazo apareció a partir de las dos semanas, apreciándose palidez, hinchazón, algo de hemorragia, isquemia y necrosis de la zona en el aloinjerto, terminando con una necrosis total, una coloración negruzca y la caída del explante y restauración por tejido propio en 1-2 días. Los autoinjertos comenzaron a restablecer la salida de pelo a partir de los 15 días después del injerto.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por Van Dam (1981) en cabras (usando parejas de donante-receptor que diferían en los antígenos de Clase I), en las que se observó un rechazo agudo entre los días 7 y 16 desde la operación, que se completó en 1-3 días desde su inicio.

Obtención de sueros reactivos. En la figura 1, se observa la evolución del

INJERTOS DE PIEL EN CABRAS

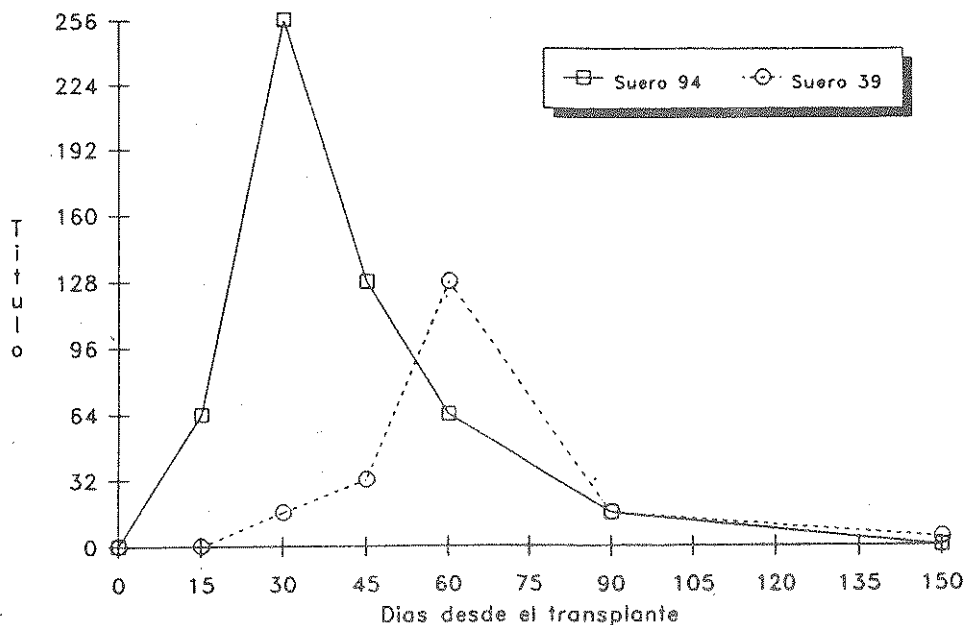


Figura 1.- Evolución de la citotoxicidad de los sueros obtenidos tras el injerto

título de citotoxicidad, los máximos fueron de 1:256, para el suero 94 al mes del injerto y de 1:128, para el suero 39 a los dos meses del mismo. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores (Van Dam 1981), que obtuvieron títulos de 1/256 y superiores a los que se obtienen a partir de hembras primíparas y múltiparas, en su mayoría de 1/1 a 1/4, no superando el título 1/8 (Molina *et al.* 1988., Van Dam 1981, Nesse y Larsen 1987^a). En cuanto a los obtenidos a partir de inmunizaciones con suspensiones linfocitarias, oscilan entre 1/64 y 1/128 (Nesse y Larsen 1987^{a,b}).

Destaca así el elevado título de ambos sueros reactivos, (1:128 y 1:256 respectivamente), lo que apunta a la gran eficacia de este método en la producción de inmmosueros. En ambos

casos, su capacidad citotóxica desaparece del animal a los cinco meses, existiendo a los tres meses una disminución sustancial del título (1/16).

Tipificación frente a un panel de células. El estudio de estos dos sueros frente a un panel de animales, da lugar a dos comportamientos claramente distintos; mientras el 39 detecta un porcentaje del 14% de animales positivos en 28 animales estudiados, el 94 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%), sugieren que estos sueros distinguen un antígeno o grupo de antígenos pertenecientes al mismo *locus* y que los animales implicados en el intercambio de injertos

diferían efectivamente, según la hipótesis, en al menos un antígeno del MHC. Una comprobación más exacta de ésta hipótesis necesitará del estudio del comportamiento frente a un mayor número de animales, así como de pruebas de absorción para comprobar si retrata sueros mono o poliespecíficos.

Los sueros positivos obtenidos no perdieron su capacidad citotóxica tras la absorción con eritrocitos de cabra, quedando así clara la inexistencia de especificidad frente a antígenos del sistema de grupos sanguíneos eritrocitarios. Estos resultados, por tanto, animan a considerar el aloinjerto

como un método prometedor para la obtención de reactivos frente a antígenos del GLA. Aunque estos resultados son preliminares, parecen apuntar también que frente al método de obtención de suero reactivo a partir de hembras multíparas, el método de injerto de piel presenta como ventaja un mayor título de los sueros obtenidos, lo que permite estudios posteriores basados en absorciones. Por otra parte, dicha metodología parece exigir un menor tiempo para la obtención de sueros que el requerido por las técnicas de inmunización con suspensiones linfocitarias.

Bibliografía

- Balner, H. 1969. Skin grafting in monkeys and apes. *Transplantation* 8, 206-209.
- Binns, R. 1967. Bone marrow and lymphoid cell, injections of the pig foetus resulting in transplantation tolerance or immunity, and immunoglobulin production. *Nature* 214: 179-181.
- Delgado J.V., A. Molina, A. Camacho, y D. LLanes. 1986. Investigations on leucocyte pigeon antigens. Production of alloantisera by leucocyte immunizations and skin grafting. XXth Congreso Isabr Finland, Helsinki p. 40.
- Molina, A., M.C. Crespo, y D. LLanes. 1988. El sistema mayor de histocompatibilidad en cabras (GLA): I. Prueba de microcitotoxicidad y obtención de sueros reactivos. *Arch. Zootec.*, 37: 167-174.
- Nesse, L. and J. Larsen. 1987^a. Production of alloantibodies against caprine lymphocyte antigens. *Anim. Gen.* 18: 159-165.
- Nesse, L. and J. Larsen. 1987^b. Lymphocyte antigens in Norwegian goats: serological and genetic studies. *Anim. Gen.* 18: 261-268.
- Newman, J. and D. Antczak. 1974. Histocompatibility polymorphisms of domestic animals. *Adv. Vet. Sci. and Comp. Med.* 27: 61-62.
- Ruff G. and S. Lazary. 1984. Investigation on the goat leucocyte antigen (GLA) system. *An. Blood. Groups and Biochem. Gen.* 16 Supl. 1: 123-124.
- Spooner R. L., P. Miller and R.A. Oliver. 1979. The production of anti-lymphocyte sera following pregnancy and skin grafting in cattle. *An. Blood. Groups and Biochem. Gen.* 10: 99-105.
- Stone, W. A., N. Samples and E. Kraig and J. Vandeberg. 1987. Definition of class I antigens of the MHC of a Marsupial Monodelphis domestica. *Arch. Zootec.* 36: 219-235.
- Van Dam, R. 1981. The major histocompatibility complex of the goat: definition and some aspects of its biological function. Tesis Doctoral. Departament of Veterinary Immunologie. Faculty of Veterinary Medicine. University of Utrech. The Netherland.