

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE FILOSOFIA Y EDUCACION
DEPARTAMENTO CENTRAL DE CIENCIAS MATEMATICAS Y NATURALES

UCH-FC
BIC-B
B298
C.1

Dr. DANKO BRNCIC
Profesor Patrocinante

Dr. GUSTAVO HOECKER
Profesor Director

Estudio del desarrollo ontogenético
de los antígenos de histocompatibilidad
del sistema H-2 del ratón

Tesis de prueba para optar
al título de Licenciado en
Filosofía con mención en
Biología.



1514



Julio Bascuñán Naranjo

1964



A MI ESPOSA E HIJOS.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a las siguientes personas la valiosa cooperación y ayuda prestada, sin la cual la realización de este trabajo no hubiese sido posible:

Dr. GUSTAVO HOECKER por su valiosa dirección y estímulo.

Dr. DANKO BRNCIC por sus constantes consejos.

Dr. ISAAC KIRSHBOM por su incansable estímulo.

Dr. CARLOS MORENO

Dra. ALICIA RAMOS

Personal técnico agregado a la Cátedra de Biología de la Escuela de Medicina.

INTRODUCCION

El determinismo de la especificidad de los antígenos ocurre como una relación simple de codominancia, e sea que la presentación de el gen en el genotipo al estado homocigoto como heterocigoto comanda la presencia del antígeno correspondiente (1). Inicialmente se postuló para estos casos una relación simple y directa entre gen y antígeno (2), (3). Algunos escasos ejemplos que tienden a aumentar, obligan a reconocer las existencias de interacción factorial en el determinismo de los antígenos (1). Por otra parte la extensa evidencia genética acumulada en los últimos años y los desarrollos conceptuales en inmunología han revelado que la relación un gen un antígeno es una sobresimplificación insostenible y lo frecuente es que los alelos, muchas veces múltiples, de los sistemas inmunogenéticos determinan no un antígeno sino varios que se heredan en bloques, ejemplos más conocidos de esta situación son los sistemas Rh y MNS del hombre (1), (4), BGK del bovino (5) y H-2 del ratón (16). (22)

En el estudio genético de los antígenos el mayor énfasis en la identificación de los genes se ha basado en la demostración de la existencia de ellos por lo general en un sólo tipo de material celular o humoral vgr. glóbulos rojos (6), glóbulos blancos (7), piel (8), suero sanguíneo (9), u otro humor.

Las razones anteriores hacen deseable, por lo tanto, disponer de una información mayor acerca de las características de los sistemas inmunológicos que permita una definición más completa de ellos. En este contexto y referido al material empleado en esta tesis en el sistema de histocompatibilidad -2(H-2) del ratón se ha estudiado la distribución cuantitativa de los antígenos



específicos en los tejidos y se ha visto que es diferente al de otros sistemas como ser histocompatibilidad 1(H-1) e histocompatibilidad 3(H-3) (10,11) y por lo tanto constituye una propiedad del sistema genético mismo. La ontogenia de estos antígenos ha sido tema de estudio para varios autores; en diferentes cepas de ratones: Billingham et al. (12) encontraron que cuando se inoculan ratones adultos de diferentes cepas con tejidos embrionarios de once y medio días, al sexto día se provoca el rechazo de injertos realizados tres días antes de la inoculación. Medawar (13) demuestra que los antígenos del sistema H-2 están presentes en embriones de 11 días, Möller (14,15) por inmunización encuentra que células embrionarias de 12 días tienen antígenos H-2 suficientes como para provocar la formación de anticuerpos humorales, Gorer (16) demostró que los eritrocitos de ratones con sistema H-2 los antígenos no son detectados con técnicas de aglutinación en suero fisiológico hasta algunos días después del nacimiento así por ejemplo, los glóbulos rojos de la cepa A/sn no reaccionan con los anticuerpos humorales hasta después de la sexta semana del nacimiento. Sin embargo, con técnicas más sensibles que utilizan suero humano como coagulante diseñada por Gorer y Mikulska (17) Mitchison (18) encontró que los hematíes de la cepa A/sn. y C.B.A., reaccionan con los isoanticuerpos a los 8 días después del nacimiento. En contraste con estos resultados, Pizarro et al.(10), Amos(19) y Möller(20) empleando la técnica de suero dextran de Gorer, encontraron independientemente que tanto los glóbulos rojos como las células esplénicas de A/sn. estos antígenos aparecen al séptimo día del nacimiento llegando al nivel adulto más o menos al sexto día. Sin embargo, en las cepas B10 y C57L, este sistema antigénico está presente en el momento del nacimiento (23). Estos

últimos resultados hacen suponer la existencia de dos tipos de cepas: aquellas que maduran antes o en el momento del nacimiento, y aquellas en que esta maduración se produce algunos días después de éste en relación con los antígenos H-2.

Cruzamientos realizados entre estos dos tipos de cepas, por ejemplo A/sn. y B10 dieron híbridos F₁ que mantenían las propiedades de sus progenitores, es decir, que aquellos antígenos determinados por la cepa A/sn. aparecían en el híbrido al segundo día mientras que las provenientes de B10 estaban presentes en el momento del nacimiento.

Este trabajo tiene por objeto confirmar las observaciones acerca de diferencias en el tiempo de aparición y maduración de los antígenos H-2 hechas por Möller (14,20) y extender a un número mayor de alelos y cepas de ratones portadores de un mismo alelo con el objeto de precisar si la acción de estos genes en el desarrollo es o no independiente del genotipo residual.

MATERIAL Y METODOS

- 1.-Animales: Los ratones utilizados pertenecieron a las siguientes cepas: A-SW., portadora del alelo H-2^B para los experimentos con tejidos embrionarios; B10 y B10 (5M) ambas H-2^b y B10.H-2^d y B10.H-2^d pt. portadoras del alelo H-2^d para los experimentos con tejidos de recién nacidos.
- 2.-Preparación de los antígenos: De todas las cepas antes mencionadas los antígenos fueron preparados picando finamente con tijeras trozos de tejido hepático, el cual fué pasado posteriormente a través de una jeringa de tuberculina con agujas N°24, 25, 26 y 27 en forma consecutiva, y la pulpa así obtenida fué lavada con salino isotónico en una centrifuga refrigerada International Equipment Co. per 3 veces a 23.000 x g. durante 15 minutos a 0°C. El sobredadante se descartó y el sedimento a probar fué guardado a -20°C. hasta el momento de usarse (no más de una hora).
- 3.-Preparación de los anticuerpos: Los anticuerpos se prepararon inoculando intraperitonealmente en el receptor 0,1 ml. de una mezcla en partes iguales, de tejido hepático y esplénico homogeneizados del dador por 3 o 4 veces con un plazo de 6 días entre cada inoculación, después de las cuales los animales fueron sangrados por la aorta y la sangre obtenida incubada a 37°C por una hora. El suero obtenido se centrifugó a 600 x g. durante 5 minutos y fué envasado en ampolletas que contenían 0.1 ml cada una, desecada al vacio en frío durante 24 horas y mantenido a -20°C hasta el momento de usarse.

Para nuestros experimentos, las cepas dadores y

receptoras de tejidos fueron las siguientes:

Cepas dadoras	Cepas receptoras
A.SW (H-2 ^g)	AC.A (H-2 ^f)
B10 (H-2 ^b)	B10 (H-2 ^d)
B10 (H-2 ^d)	B10 (H-2 ^b)

4.-Medición de los antígenos: Se hizo por absorción de anticuerpos. Para esto se coleccionó un volumen de pulpa de hígado y un volumen igual del anticuerpo, diluido al 1:4 y esta mezcla fué incubada a 37°C por una hora y luego centrifugada a 23.000 x g. en una centrifuga refrigerada a 0° C Durante 15 min.; El título de los anticuerpos fué probado en el sobrenadante con glóbulos rojos del dador correspondiente para cada caso mediante la técnica de hemaglutinación de Gorer y Mikulka (17). Los resultados interpretados como:

- +++ = aglutinación completa (sin células libres)
- ++ = aglutinación fuerte
- + = aglutinación débil
- ± = duda
- = sin aglutinación

RESULTADOS

Con el objeto de saber si existía alguna diferencia, en relación con el tiempo de maduración de los antígenos H-2, entre cepas de ratones portadoras del mismo alelo de histocompatibilidad pero diferentes en su genotipo residual, se realizaron experimentos en recién nacidos de las cepas: B10.H-2^d y B10.H-2^d pt para el alelo H-2^d y B10 y B10(5M) para el alelo H-2^b. El alelo H-2^d determina la presencia de los siguientes antígenos: C, D, F, H, J, N, M; siendo C y D los que dan reacciones más claras, en tanto que el alelo H-2^b, determina la presencia de los siguientes antígenos: C, D, F, H, J, N, M; siendo C y D los que dan reacciones más claras, en tanto que el alelo H-2^b, determina la presencia de los antígenos B, E, F, N; B y E fueron los estudiados en nuestro experimento. Ver table 1.

Los antígenos B y E de B10 y B10(5M) y los antígenos C y D de B10.H-2^d y B10 H-2^d, pt. se estudiaron en ratones recién nacidos de 12 horas, 2, 3 y 6 días y los resultados que aparecen resumidos en la Tabla 2, gráfico 1 demuestran que la aparición de los antígenos determinados por el alelo H-2^b en B10 y B10(5M), comienza antes del nacimiento de tal manera que a las 12 horas tiene una cantidad de antígenos capaz de bajar el título del anticuerpo específico desde 1:1024 a 1:16 llegando al nivel adulto más o menos al segundo o tercer día.

Los antígenos C y D determinados por el alelo H-2^d en B10 H-2^d y B10 H-2^d, pt. comienzan a madurar, a diferencia de B10 y B10 (5M), al segundo día después del nacimiento ya que en ese momento la cantidad de antígenos presentes reduce el título del anticuerpo específico desde 1:1024 a 1:64 y alrededor del séptimo día absorben totalmente los anticuerpos correspondientes en la misma forma que los tejidos de ratones adultos, es decir, hay una caída total del título.

Cuando se realizó un estudio diferencial de los antígenos determinados por un mismo alelo ($H-2^d$) en una misma cepa, B10. $H-2^d$ en nuestros experimentos, se encontró, como se demuestra en la tabla 2, gráfico 3 que la especificidad antigénica C, probada aisladamente, comienza a aparecer más o menos al segundo día después del nacimiento alcanzando el nivel adulto alrededor del quinto día en tanto que el antígeno D llega a dicho nivel, recién al séptimo día.

Al realizar experimentos en recién nacidos de la cepa A/SW se encontró que los antígenos C - E - S determinados por el alelo $H-2^s$, tenían ya su nivel adulto a las 12 hs. después de nacidos. Se extendió entonces el estudio a etapas más tempranas del desarrollo embrionario, para lo cual se analizaron embriones de 12, 14, 15, 16 y 17 días. Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla 2 gráfico 2, demuestran que estas tres especificidades, probadas en bloque comienzan a aparecer alrededor del duodécimo día de vida intra-uterina llegando al nivel adulto a los 17 días de vida embrionaria aproximadamente cuatro días antes del nacimiento.

Comparando el tiempo de maduración de la especificidad antigénica C determinada por el alelo $H-2^d$ se demostró que a pesar de que ambas reaccionan específicamente frente al mismo anticuerpo, estas maduran a tiempos diferentes así, el antígeno C de $H-2^s$ aparece entre los 14 y 15 días llegando al nivel adulto más o menos a los 17 días de vida embrionaria, en tanto que el mismo antígeno C determinado por el alelo $H-2^d$ aparece al segundo día después del nacimiento, alcanzando al nivel adulto alrededor del quinto día de vida.

D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos con tejido hepático embrionario, demuestran que en la cepa A.SW los antígenos C, E y S aparecen muy temprano en el desarrollo, a los 12 días de vida intrauterina. Estos datos estarían de acuerdo con los sostenidos por Möller (14), este autor inocularó tejido hepático de embriones de 12 días de la cepa A/Sn en adultos de la cepa C3H, encontrando que los ratones tratados con células embrionarias rechazaron el injerto con una típica reacción secundaria. Billingham et al.(12) encontró que los tejidos hepáticos y esplénicos de embriones de la cepa CBA eran capaces de producir un franco estado de tolerancia inmunológica a los 11 días de vida intrauterina. Los datos obtenidos con estas técnicas indicarían por una parte que los antígenos de trasplante H-2 pueden aparecer muy temprano en el desarrollo y por otra existen datos que indican que estos pueden aparecer en el momento del nacimiento o pocos días después (10, 19, 20). Las discrepancias descritas parecen deberse en parte a diferencias en la sensibilidad de las técnicas pero además es claro en nuestras observaciones en las que se empleó una misma técnica, que el tiempo de maduración de los antígenos determinados por el locus H-2 no tienen un período definido para todos los alelos del sistema si no que varía según sea el alelo implicado.

Parece ser que la responsabilidad del tiempo de maduración estuviera íntimamente ligada al alelo que determina la presencia de estos antígenos de tal modo que dicho tiempo sería el mismo para todas las cepas que tengan un mismo alelo en su genotipo. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, en las cepas B10 y B10

(5M) ambas portadoras del alelo H-2^b el tiempo de maduración de las especificidades antigénicas B y E es el mismo, igual cosa sucede con B10 H-2^d y B10 H-2^d, pt. ambas portadoras del alelo H-2^b; estos datos confirman lo encontrado por Möller (14) en las cepas C57BL/KL y C57L/K, ambas H-2^b en las cuales, al igual que en nuestros experimentos sus antígenos H-2 están presentes en el momento de su nacimiento.

Más aún, este mismo autor observó que los híbridos F₁ provenientes de un cruzamiento entre animales de cepas de maduración antigénica tardía como A/Sn y tempranas como C57 LK. presentaron respecto al periodo de apareamiento y maduración antigénica las características de sus padres para cada antígeno, por ejemplo los antígenos característicos del alelo H-2^a de la cepa A/Sn aparecieron al segundo o tercer día en tanto que aquellos que provenían de la cepa C57 LK (H-2^b) aparecieron más temprano. No hay datos con respecto a cruzamientos entre cepas como A/Sn y ASW.

Ahora bien, llama la atención que en las cepas estudiadas por nosotros los antígenos determinados por un mismo alelo presentaron velocidades de maduración diferentes dentro de una misma cepa, así por ejemplo, en nuestros experimentos encontramos que en la cepa B10.H2^d el antígeno C. llega al nivel adulto con tres días de anticipación con respecto al antígeno D. Este hecho en ningún caso estaría en contra de lo dicho anteriormente ya que la variación encontrada es pequeña si se compara con las diferencias que existen entre los tiempos de maduración determinados por alelos diferentes. Estas diferencias son difíciles de interpretar pero podrían explicarse a base de diferencias en las velocidades de síntesis de los diversos antígenos del sistema H-2.



RESUMEN

De nuestros experimentos surgen las siguientes conclusiones:

- 1.- El tiempo de maduración de los antígenos H-2 está determinado genéticamente, por el alelo del sistema implicado.
- 2.- Existen pequeñas variaciones en la velocidad de maduración de las diferentes especificidades antigénicas determinadas por un mismo gen alelo.
- 3.- Una misma especificidad antigénica determinada por distintos alelos maduran en tiempos diferentes, que son característicos para cada uno de ellos.
- 4.- Los antígenos del sistema H-2 pueden aparecer muy temprano en el desarrollo (alrededor de los 15 días de gestación para la cepa A.SW.)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Race, R.R. and Sanger R., "Blood Groups in Men"
2d. ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford
1954.
- 2.- Irwin, M.R., and L.J. Cole., J. Exptl. Zool. 73:85,
1936.
- 3.- Haldane, J.B.S., "Perpectives in Biochemistry",
Cambridge U.P., N.Y. 1938.
- 4.- Winer, A.S., and I.B.Wexler, Bateriai Revs. 16:69,
1952.
- 5.- Sterment C., R.D. Owen and M.R. Irwin, Genetics.
36:134, 1951.
- 6.- Landsteiner, K. and P. Levine, J.Exptl.Med. 47:757.,
48:731, 1928.
- 7.- Ames, D.B., Brit.J.Exptl.Pathol., 34:464, 1953.
- 8.- Billingham, R.E. and P.B. Medawar., J.Exptl. Biol.
28:385, 1951.
- 9.- Beid W.C. "Fundamentals Of Immunology", Intereience
Publishers London 1947.
- 10.- Pizarro, O., Hoecker, G., Rubinstein, P., Ramos,A.,
Proc. Nat Acad. Sc. 47: 1900, 1961.

- 11.- Snell, G.D. and L.C. Stevens, *Immunology* 4:366, 1961.
- 12.- Billingham, R. E., L. Brent and P.B. Medawar., *Nature* 178:514, 1956.
- 13.- Medawar, P.B. Iso-antigens. In *Symp. Biol. Problems Of Grafting., International organizations of Medical Sciences.* Ed. F. Albert and P.B. Medawar. Oxford: Blackwell, 1959.
- 14.- Möller, G., *Transplant. Bull.* 29:114, 1962.
- 15.- Deria, G., *Transplantation* 1:311, 1963.
- 16.- Gorer, P.A., *J. Path. Bact.* 47:231, 1938.
- 17.- Gorer, P.A. and Z.B. Mikulska., *Canc. Res.* 14:651, 1954.
- 18.- Mitchison, N.A., *Genetics.* 2:406, 1953.
- 19.- Ames, P.B. *Canad. Canc. Conference* 3:241, 1959.
- 20.- Möller, G., *J. Immunol* 86:56, 1961.
- 21.- Stimpfling, J. H. and G.D. Snell., *Proc. Internat. Symp. on Tissue Transplantation., Viña del Mar, Valparáiso.* 1961. Eds. Hoecker, G. and Christoffanini, University of Chile.
- 22.- Hoecker, G., Counce, S. and P. Shith. *Rec. Nat. Acad. Sc.* 40: 1040, 1954.

TABLA 1

Seis alelos H-2, su fenotipo antigénico y cepas que los llevan:

alelos H-2	fenotipo antigénico H-2	cepas
a	A - C D E F - H - J K M N A' B' C' - - -	W Y A/sn
b	- B - - E F - - - - - N A' B' C' - - V - -	B10, B10(5M)
d	- - C D - F - H - J - M N A' B' C' - - - - -	B10 H-2 ^d , B10 H-2 ^d Pt
e	- - C - E F - - - - - M . A' B' C' D' - . - Y	ST04.
f	. - - - - . G H I - - - . A' - - - - . - -	A.C.A
k	A - C - E - - H - - K - - - - - - - W Y	C B A C 3H
s	. - C - E F G - - . - - . - B' - - S . - -	A.S.W.

(-) negativo; (.) no probado.

2 A B C D nombres provisórios de algunos antígenos. J.A Stimpfling y O. Pizarro, Transpl.Bull, 28: 02.1961.

22 Gorer prefiere llamar a este antígeno D. Formas alélicas de los antígenos D, E y K, E y N respectivamente han sido descrita por Amos et al. (19) y Gorer et al (17).



TABLA 2.

Cepas	Antígenos	Titulo	Titulo anticuerpo absorbido con					
			tej.hep. de embriones de:					
			sin absorb.11	12	14	15	16	17 ds

A/Sw.	C,E,S.	1/4096	1/4096./4096./512- /128. /16.				
-------	--------	--------	-------------------------------	--	--	--	--

Titulo anticuerpo absorbido con tejido sedimentado hepático de recién nacido de:

12 hs. 2 3 4 5 6 7 8 días

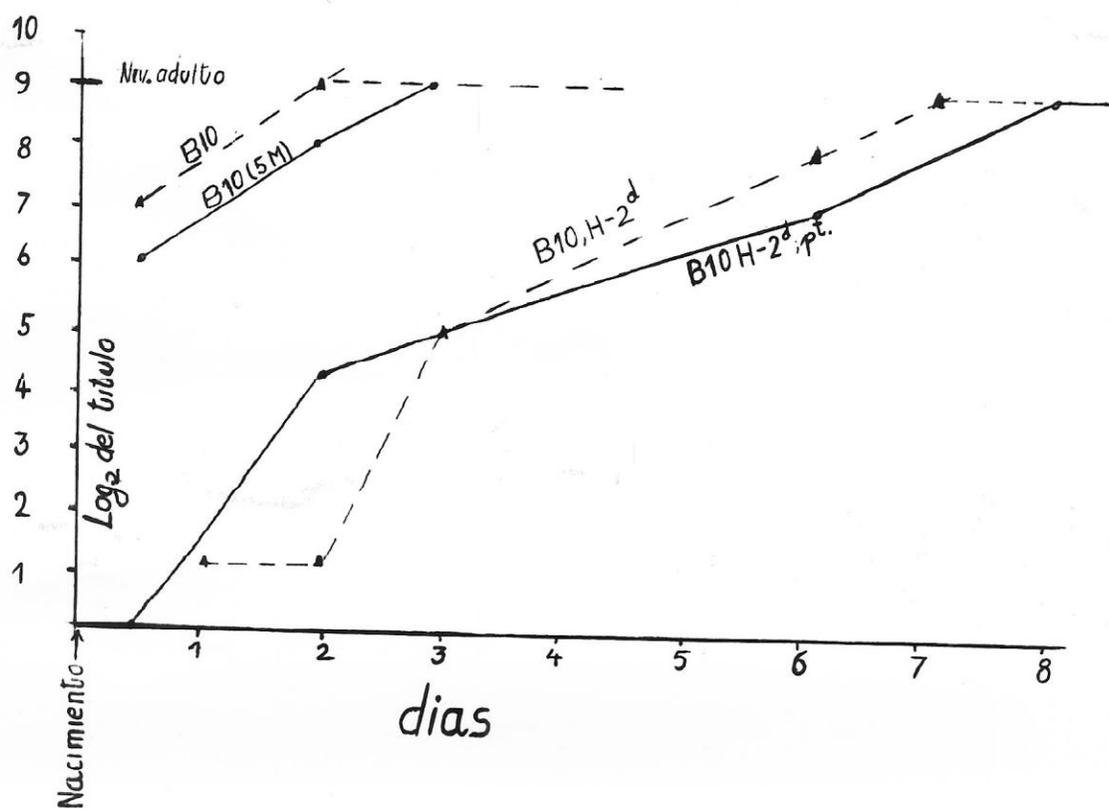
5M	B,E	1/1024	1/16	-	-	-	-	-	-
B10	B,E	1/1024	1/16	-	1/4	-	-	-	-
B10.H-2 ^d pt.	C,D	1/1024	1/1024	1/64	1/34	⊘	⊘	1/8	-
B10.H-2 ^d	C,D	1/1024	1/512	1/512	1/64	⊘	⊘	1/4	-
B10,H-2 ^d	C	1/1024	⊘	1/1024	1/64	⊘	1/16	-	-

⊘ no probado

- absorción completa

GRAFICO 1.

Curva comparativa de la maduración de los antígenos determinados por los alelos: H-2^b y H-2^d, en las cepas B10., B10(5M), y B10.H-2^d, B10.H-2^d_{pt.}, respectivamente.



Curva de maduración de los antígenos C ,E ,S ,determinados por el alelo H-2^S en la cepa A.SW.

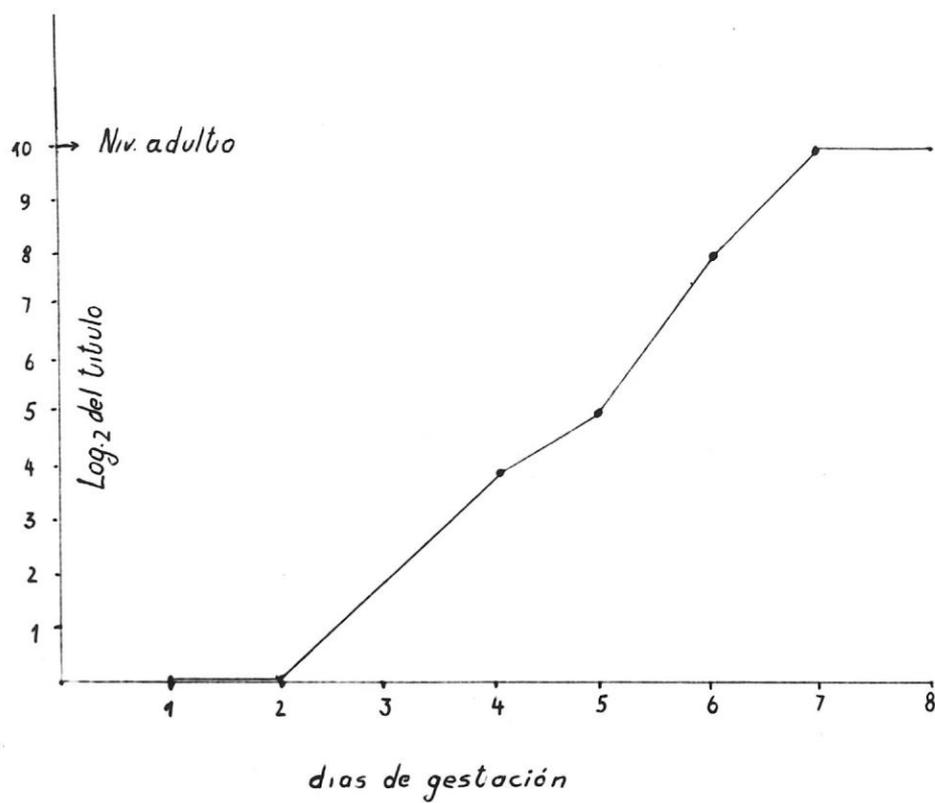


GRAFICO 3.

Curva comparativa de la maduración de los antígenos C y C,D en ratones de la cepa B10.H-2^d.

