



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

CARRERA DE BIOLOGIA

"VARIACION DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE  
ANTICUERPOS IgA e IgM DEBIDA AL SEXO, -  
EN RATAS".

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

LETICIA MORENO FIERROS.



LOS REYES IZTACALA ESTADO DE MEXICO.

1986.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI HIJA STEPHANIE

A MI MAMA

A MIS AMIGAS  
MARISOL, ANGELICA Y AUREA

A ELLAS EN ESPECIAL Y A LA MUJER EN GENERAL, CON  
LA ESPERANZA DE QUE ALGUN DIA NUESTRA SUPERIORIDAD  
BIOLOGICA LOGRE ACABAR CON EL CONCEPTO DE INFERIORIDAD  
QUE LA SOCIEDAD NOS HA IMPUESTO.

CON MUCHO CARINO:

A MI PAPA

A MI ESPOSO MIGUEL

Y A MIS HERMANOS  
ARMANDO Y PACO.

---

AGRADECIMIENTOS:

A MI GRAN ASESOR Y DIRECTOR DE  
TESIS, DR. RAFAEL CAMPOS R. QUIEN ME  
BRINDO SU TIEMPO, SU APOYO Y AMPLIOS  
CONOCIMIENTOS, PARA LA REALIZACION  
DE LA PRESENTE.

AL DR. ARMANDO ISIBASI A.

AL DR. JESUS KUMATE R.

Y A TODOS LOS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE LA DI  
VISION DE INMUNOQUIMICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL DEL  
I.M.S.S. QUE ME BRINDARON SU AYUDA.

## RESUMEN

En base a reportes que muestran que las hembras son más resistentes que los machos a varias enfermedades infecciosas, se iniciaron estudios para tratar de explicar la superioridad biológica de las hembras. Endichos estudios se ha encontrado que las hembras, respecto a los machos;

- a) Tienen niveles de IgM sérica más altos.
- b) Presentan respuestas inmunes totales contra antígenos t-dependientes y respuestas de IgM contra antígenos t-independientes significativamente mayores; y
- c) Muestran una inmunidad celular superior.

Las anteriores diferencias entre sexos, sugieren que existen genes en el cromosoma X que influyen en las respuestas inmunes, los cuales no sufren compensación de dosis.

Por otro lado, no se han encontrado diferencias significativas debidas al sexo en los niveles totales de IgA ni de IgG. Sin embargo, no existen trabajos en los que se haya comparado respuesta inmune específica de IgA e IgG entre machos y hembras. Por lo tanto, con el objeto de ampliar este aspecto del estudio de la respuesta inmune en relación al sexo, se determinó la variación de la respuesta inmune específica de anticuerpos IgA, IgM e IgG, entre ratas machos y hembras inmunizadas con una serie de antígenos T-dependientes simples y complejos, conjugados a DNP, por medio de un método de alta sensibilidad como es el ELISA.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, indican que en las ratas:

- a) Las hembras producen respuestas de IgA específicas significativamente mayores a las de los machos.
- b) La respuesta de IgM específica de las hembras hacia antígenos t-dependientes es significativamente mayor a la de los machos; y
- c) No existe variación debida al sexo en la respuesta de IgG específica.

También se estudió el control genético de la respuesta específica de anticuerpos.; y encontramos que:

- a) Las respuestas específicas de IgA e IgM se encuentran genéticamente controladas; ya que existen diferencias significativas en dichas respuestas entre ratas Long-Evans y Sprague-Dawley inmunizadas con DNP-LIS.
- b) Al comparar las respuestas específicas de IgA e IgM hacia DNP-LIS de las ratas LE y SD con los híbridos (SDxLE)<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, se encontró que los caracteres de altas respuestas específicas de IgA e IgM se transmiten de manera dominante a la progenie.
- c) Respecto a la respuesta específica de IgG hacia DNP-LIS, no se encontraron diferencias significativas entre ratas LE y SD; aunque dicha respuesta en los híbridos es muy similar a la presentada por los padres.

Se proponen mecanismos genéticos y hormonales para explicar las respuestas específicas de IgA e IgM superiores presentadas por las hembras, respecto a los machos.

-----

## INDICE

	Pag.
1.- Portada-----	1
2.- Agradecimientos-----	2
3.- Resúmen-----	5
4.- Índice-----	6
5.- Índice de Tablas-----	9
6.- Índice de Figuras-----	11
7.- Abreviaturas-----	13
8.- Prólogo-----	16
- Antecedentes-----	18
9.- Introducción-----	20
I- Control Genético de la respuesta Inmune-----	21
- Tipos de control genético de la respuesta inmune-----	24
- Control por genes Ir de la respuesta de cada clase de Inmunoglobulina-----	25
- Expresión de genes Ir-----	26
Inducción y terminación de la respuesta inmune-----	28
II- Antecedentes de la superioridad Biológica de las hembras.- Estudio del efecto del sexo en el sistema inmune-----	30
1) Evidencias que muestran que la susceptibilidad a las infecciones es mayor en machos que en hembras-----	31
2) Determinación de los niveles séricos totales de inmunoglobulinas en mujeres y hombres-----	31
3) Respuesta específica de inmunoglobulinas-----	32
A) Respuesta específica de Anticuerpos totales-----	32
B) Respuesta específica de anticuerpos IgA, IgG e IgM-----	34
4) Respuesta inmune celular en machos y hembras: y acción de las hormonas sexuales esteroides-----	35
i) Efecto de los esteroides sobre el timo y el tejido linfático-----	35
ii) Células T-citotóxicas y hormonas esteroides-----	35
iii) Células T cooperadoras-----	36
iv) Macrófagos en machos y hembras-----	37
5) Genes ligados al cromosoma X en el ratón, con funciones inmunoreguladoras-----	38
i) Respuesta inmune específica hacia antígenos T independientes-----	38
ii) Respuesta inmune específica hacia antígenos T dependientes-----	39
6) Las inmunodeficiencias ligadas al sexo son más frecuentes en machos que en hembras-----	40
7) Las enfermedades autoinmunes atacan preferentemente a las hembras-----	41
8) Otras diferencias encontradas en el sistema inmune de machos y hembras-----	42
i) Tolerancia-----	42
ii) Frecuencia de cáncer-----	42
iii) Producción de Interleucina II-----	42
III- Inactivación del cromosoma X en mamíferos/ Hipótesis de Lyon.--	43
- Evidencias que apoyan la hipótesis de Lyon-----	45
- El mosaiquismo-----	47
- Hipótesis alternativa de Lyon-----	50
- Evidencias que apoyan la hipótesis alternativa-----	52
- Algunos loci del cromosoma X inactivo que nosufren inactivación, actúan sobre el sistema inmune-----	53

10.-	Objetivo	57
	I- Resumen de antecedentes	57
	II- Justificación	58
	III- Hipótesis y plan de trabajo	58
11.-	Material y Métodos	60
	I- Purificación de antiseros	61
	II- Inmunoabsorbentes	65
	A) Acoplamiento de proteínas a sefarosa	65
	B) Insolubilización de proteínas con glutaraldehído	67
	III- Purificación de antiseros por cromatografía de afinidad utilizando columnas inmunoabsorbentes	69
	IV- Inmunodifusión en geles de agarosa	71
	A) Ouchterlony- Dobleinmunodifusión	72
	B) Inmunolectroforesis	74
	V- Animales	76
	VI- Antígenos: Conjugados hapteno- acarreador	78
	- Preparación de conjugados DNP- acarreador	81
	VII- Inmunización	85
	VIII- ELISA	87
	- Material	89
	- Procedimiento	91
	IX- Preparación de conjugados enzima-antiglobulina	92
	- Titulación de conjugados	93
12.-	Resultados	96
	A) Respuesta específica de anticuerpos IgA, IgM e IgG en ratas LE y SD machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS	97
	I- Control genético de la respuesta específica de anticuerpos IgA	97
	II- Respuesta específica de anticuerpos IgM e IgG en ratas LE y SD inmunizadas con DNP-LIS	102
	B) Respuesta específica de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG en ratas híbridas machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS	110
	III- Carácter dominante de la respuesta específica alta de anticuerpos clase IgA	110
	IV- Respuesta específica de IgM en ratas híbridas (SDxLE) <sub>F1</sub> machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS	111
	V- Respuesta específica de IgG en híbridos (SDxLE) <sub>F1</sub> machos y hembras inmunizados con DNP-LIS	111
	C) Respuesta específica de IgA, IgM e IgG en ratas híbridas machos y hembras inmunizadas con los conjugados: DNP-LIS, DNP-Cit-c, DNP-GAT, DNP-TGAL y DNP-OVA	116
	D) Respuesta específica de IgA, IgM e IgG en ratas LE machos y hembras inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-LIS	127
13.-	Discusión	135
	I- Control genético de la respuesta específica de anticuerpos IgA en ratas	136
	II- Carácter dominante de la alta respuesta de IgA específica en ratas	137
	III- Control genético de la respuesta específica de IgM en ratas	140
	IV- Carácter dominante de la alta respuesta de IgM específica en ratas	142
	V- Respuesta específica de IgG en ratas LE y SD inmunizadas con DNP-LIS	143
	VI- Respuesta específica de IgG en híbridos (SDxLE) <sub>F1</sub> inmunizados con DNP-LIS	143

VII- Respuesta específica de IgA en ratas LE y en híbridos SDxLE)F <sub>1</sub> machos y hembras-----	145
VIII- Respuesta específica de IgM en ratas LE y (SDxLE)F <sub>1</sub> machos y hembras-----	147
IX- Respuesta específica de IgG en ratas LE y (SDxLE)F <sub>1</sub> machos y hembras-----	151
X- Mecanismos propuestos para explicar las diferencias entre machos y hembras en la respuesta específica de IgA e IgM en ratas.-----	154
14.- Conclusiones-----	159
-Estudios posteriores.-----	160
15.- Bibliografía.-----	161

---

INDICE DE TABLAS:

No. de Tabla.

1. - Control genético de la respuesta específica de anticuerpos IgA en ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS.
  - 1.1 Respuesta específica de anticuerpos IgA anti DNP en ratas Long-Evans y Sprague-Dawley.
  - 1.2 Diferencias en la respuesta de IgA anti DNP entre ratas Long-Evans y Sprague-Dawley.
  - 1.3 Diferencias en la respuesta de IgA anti DNP debidas al sexo.
- 2.- Diferencias en la respuesta inmune específica entre ratas Long-Evans y Sprague-Dawley inmunizadas con DNP LIS y controles.
- 3 - Control genético de la respuesta específica de anticuerpos IgA en ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS.
  - 3.1 Respuesta específica de anticuerpos IgM anti DNP en ratas Long Evans, Sprague-Dawley e híbridos ( SDxLE) F<sub>1</sub>.
  - 3.2 Diferencias en la respuesta de IgM anti DNP entre ratas Long-Evans y Sprague-Dawley.
  - 3.3 Diferencias en la respuesta específica de IgM anti DNP debidas al sexo.
- 4.- Control genético de la respuesta específica de anticuerpos IgG en ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS.
  - 4.1 Respuesta específica de IgG anti DNP en ratas Long-Evans, Sprague Dawley e híbridos ( SDxLE) F<sub>1</sub>.
  - 4.2 Diferencias debidas al sexo entre ratas Long Evans y Sprague Dawley en la respuesta específica de IgG anti-DNP.
  - 4.3 Variación de la respuesta específica de IgG anti DNP en ratas Long Evans, Sprague-Dawley e híbridos ( SDxLE) F<sub>1</sub>.
- 5.- Diferencias en la respuesta inmune específica anti DNP debidas al sexo en ratas controles, Long-Evans y Sprague-Dawley.
- 6.- Respuesta de anticuerpos anti DNP en ratas controles, Long-Evans y Sprague-Dawley.
- 7.- Respuesta inmune específica anti DNP en ratas Long-Evans y Sprague Dawley inmunizadas con DNP-LIS.

8. Diferencias en la respuesta inmune específica anti DNP debidas al sexo - en ratas Long-Evans y Sprague-Dawley.
- 9.- Respuesta específica de anticuerpos IgA anti DNP en ratas híbridas (Sprague-Dawley x Long-Evans)  $F_1$ .
- 10.- Respuesta específica de anticuerpos IgM anti DNP en ratas híbridas (Sprague-Dawley x Long-Evans)  $F_1$ .
- 11.- Respuesta específica de anticuerpos IgG anti DNP en ratas híbridas (Sprague-Dawley x Long-Evans)  $F_1$ .
- 12.- Diferencias en la respuesta inmune específica entre ratas híbridas (Sprague-Dawley x Long-Evans)  $F_1$  machos y hembras. Pruebas de t.
- 13.- Análisis de Varianza de la respuesta inmune específica anti DNP en ratas Híbridas ( Sprague-Dawley x Long-Evans)  $F_1$  machos y hembras.
- 14.- Respuesta específica de anticuerpos anti DNP en ratas Long-Evans.
- 15.- Diferencias en la respuesta inmune específica anti DNP entre ratas machos y hembras de la cepa Long-Evans.

## INDICE DE FIGURAS:

### Material y métodos.

Fig. A - Ouchterlong que muestra bandas de precipitación de SNR con  $(\alpha\text{-IgA}_2)$ .

Fig. B - Ouchterlong en el que se observan bandas de precipitación de SNR con  $(\alpha\text{-IgA}_2)$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_4)$  y  $(\alpha\text{-IgG})$ ; y de  $(\alpha\text{-IgA}_3)$  con  $(\alpha\text{-IgA}_2)$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_4)$  y  $(\alpha\text{-IgA}_3)$ .

Fig. C - Ouchterlong que muestra bandas de precipitación entre SNR y:  $(\alpha\text{-IgA}_1)$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_2)$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_3)$  y  $(\alpha\text{-IgA}_4)$ .

Fig. D - Inmunolectroforesis en la que se observan bandas de precipitación de SNR con  $(\alpha\text{-IgA}_1)$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_2)$  y  $(\alpha\text{-IgA}_3)$ .

Fig. E - Inmunolectroforesis en la que se observan bandas de precipitación entre SNR y:  $(\alpha\text{ Tot})$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_2)$ ,  $(\alpha\text{-IgA}_3)$  y  $(\alpha\text{-IgA}_4)$ .

Fig. F - Ratas utilizadas: 1.- Long-Evans, 2.- Sprague-Dawley y 3.- Híbridos  $(\text{SD} \times \text{LE}) F_1$ .

Fig. G - Esquema de inmunización intraperitoneal de las ratas.

Fig. H - Sangrado por punción intracardiaca de las ratas.

Fig. I - Preparación de conjugados hapteno-carreador.

Fig. J - Esquema del ELISA utilizado.

### Resultados.

Fig. 1. Respuesta de IgA anti DNP en ratas LE y SD machos y hembras inmunizadas con  $\text{DNP}_{4\text{-LIS}}$ .

Fig. 2. Respuesta de IgM anti DNP de ratas LE y SD inmunizadas con  $\text{DNP}_{4\text{-LIS}}$ .

Fig. 3. Respuesta de IgG anti DNP de ratas LE y SD machos y hembras inmunizadas con  $\text{DNP-LIS}$ .

Fig. 4. Respuesta de IgA anti DNP en ratas híbridas  $(\text{SD} \times \text{LE}) F_1$  machos y hembras inmunizadas con  $\text{DNP-OVA}$ ,  $\text{DNP-LIS}$ ,  $\text{DNP-Cit-c}$  y  $\text{DNP-GAT}$ .

Fig. 5.- Respuesta de IgM anti DNP en ratas híbridas  $(\text{SD} \times \text{LE}) F_1$  machos y hembras inmunizadas con  $\text{DNP-OVA}$ ,  $\text{DNP-LIS}$ ,  $\text{DNP-Cit-c}$  y  $\text{DNP-GAT}$ .

- Fig. 6.- Respuesta de IgG anti DNP en ratas híbridas (SDxLE) F<sub>1</sub> machos y hembras inmunizadas con DNP OVA, DNP-LIS, DNP Cit c y DNP CAT.
- Fig. 7. Respuesta de IgA anti DNP en ratas LE machos y hembras inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit c y DNP-LIS.
- Fig. 8. Respuesta de IgM anti DNP en ratas LE machos y hembras inmunizadas con DNP OVA, DNP Cit-c y DNP-LIS.
- Fig. 9. Respuesta de IgG anti DNP en ratas LE machos y hembras inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-LIS.
- Fig. 10. Respuesta de IgA anti DNP en ratas LE, SD y (SDxLE) F<sub>1</sub> machos y hembras inmunizadas con DNP LIS.
- Fig. 11. Respuesta de IgM anti DNP en ratas LE, SD y (SDxLE) F<sub>1</sub> machos y hembras inmunizada, con DNP-LIS.
- Fig. 12.- Respuesta de IgG, anti DNP en ratas LE, SD y (SDxLE) F<sub>1</sub> machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS.

ABREVIATURAS:

- AP. = Células AP, células presentadoras de antígeno
- ( $\alpha$ -IgA<sub>1</sub>) = Suero de conejo anti Ig A de rata absorbido en suero normal.
- $\alpha$ -IgA<sub>2</sub> = ( $\alpha$ -IgA<sub>1</sub>) absorbido en IgG de rata.
- ( $\alpha$ -IgA<sub>3</sub>) = ( $\alpha$ -IgA<sub>2</sub>) absorbido por 2a. vez en IgG de rata.
- ( $\alpha$ -IgA<sub>4</sub>) = ( $\alpha$ -IgA<sub>3</sub>) absorbido en gammaglobulinas de rata.
- ( $\alpha$ -IgG) = Suero de conejo anti IgG de rata.
- ( $\alpha$ -Tot) = Suero de conejo anti total de rata.
- BSA = Albúmina sérica bovina.
- Células B = Linfocito B. célula que responde a los antígenos diferenciando se en células productoras de anticuerpos.
- Células T = Clase de linfocito derivado del timo capaz de responder a los antígenos T-dependientes y productos de los genes de MHC; éstas células regulan las respuestas inmunes y median las reacciones inmunes celulares.
- Cit-c = citocromo-c de corazón de paloma.
- Con A = Concanavalina A- substancia vegetal que se une a residuos de azúcar en superficies celulares y estimula la proliferación de células T.
- ( del Xp) = de lesión intersticial en el brazo corto del cromosoma X.
- DNP = Danotrfemil- un hapteno común.
- DNP<sub>42</sub>- ASB= conjugado DNP- albúmina sérica bovina.
- DNP<sub>3</sub>-Cit-c= conjugado DNP-Citocromo c
- DNP<sub>3</sub>-GAT = conjugado DNP- ( L-glutámico 60, L-alanina 30, L-tirosina 10)
- DNP<sub>4</sub>-LIS = conjugado DNP Lisozima.
- DNP<sub>10</sub>-OVA= conjugado DNP- Ovalbúmina.
- DNP<sub>10</sub>-TGAL= conjugado DNP (poli (Tir,Glu) -poli-OL-Ala-poli Lis).
- DNFB = 2,4 Denitrofluorobenceno sulfonato.
- ELISA = Enzyme linked Immunosorbent Assay.
- GAT = Copolímero de L-Glutámico: L-Alanina: L-Tirosina.

- G6PD= Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa.
- H= Complejo mayor de histocompatibilidad.
- H-2= Complejo mayor de histocompatibilidad en el ratón.
- HLA Complejo mayor de histocompatibilidad en el hombre.
- HC = hidrocortisona.
- I = Región del MHC donde se localizan los genes Ir y son codificadas las moléculas Ia.
- Ia= Antígenos de histocompatibilidad ( encontrados primeramente en células B, pero también en macrófagos, células T y en la piel), codificados en la región I del MHC.
- I-A, I-B, I-C, I-E, I-J = Subregiones de la región I del complejo H-2 del ratón.
- Ig = Inmunoglobulina
- IL = Interleucina.
- Ir= genes localizados en la región I del MHC que controlan la habilidad de desarrollar respuestas inmunes específicas hacia antígenos timo-dependientes.
- KLH = ( Keyhole Lim pet Hemocyanin), Hemocianina de lapar ojo de cerradura.
- LE = ratas de la cepa endogámica Long-Evans (  $H^2$ ,  $A_y$ -b<sup>2</sup> ).
- LIS = Lisozima de huevo.
- Ly = Sistema de antígenos encontrados en células T que distingue diferentes clases funcionales de células T.
- MHC- Complejo mayor de histocompatibilidad. gran región de material genético que contiene genes que codifican para antígenos de histocompatibilidad, genes de respuesta inmune y antígenos de superficie de linfocitos responsables del rechazo rápido de aloinjertos.
- MLR = o MLC.- Reacción o Cultivo de Linfocitos Mezclado; respuesta proliferativa de linfocitos alogénicos cuando son cultivados juntos.

- OKT<sub>4</sub> = células supresoras.
- OVA = Ovoalbúmina.
- PEC = Células formadoras de placas.
- PHA = Fitohemaglutinina.- Una lectina vegetal que aglutina células animales y estimula la proliferación de linfocitos, en su mayoría T.
- PVP= polivinilpirrolidona
- PPD = derivado protéico purificado.
- PBS = Regulador de Salinas Fosfatos.
- PWM = Mitógeno de fitolaca. ( Pokeweed Mitogen) Una sustancia vegetal que estimula la proliferación de linfocitos.
- SD = ratas de la cepa endogámica Sprague-Dawley x Long-Evans) F<sub>1</sub>.- Resultado la cruce de hembras Sprague-Dawley con un macho Long-Evans.
- SNR= Suero normal de rata.
- SRBC= Sheep Red Blood Celss.-Glóbulos rojos de camero.
- STS= Sulfatasa esteroide microsomal.
- T=Dependiente= timo-dependiente.
- TGAL= ( T,G)-A-L.-Polímero ramificado de ( L-tirosina: L-Glutámico) poly d, L-Alanina: poli-L-Lisina.
- Thy-Sistema de antígenos de células T.
- X = Cromosoma X.
- xid= Inmuno.eficiencia ligada a X.
- X<sup>S</sup> = Brazo corto del cromosoma X.
- X<sup>L</sup> = brazo largo del cromosoma X.

## P R O L O G O

Se sabe que existen marcadas diferencias cuantitativas y cualitativas en la respuesta de anticuerpos de diferentes individuos de especies diferentes y de la misma especie, Se ha observado que la gran variación en la respuesta inmune individual de los animales contra antígenos específicos; se puede deber a múltiples factores, entre los cuales podemos incluir: las propiedades físico químicas del antígeno, la cantidad de antígeno administrado, la vía de inmunización, el empleo de adyuvantes, y la edad y salud del receptor. Además, aún en el caso del empleo de un antígeno único; y controlando al máximo las variables anteriores, la respuesta de inmune de diferentes animales puede variar, = debido a la expresión de diferentes determinantes antigénicos en la misma molécula. (18) Se piensa que las variaciones en el aspecto cualitativo de la respuesta inmune humoral, descansan solamente sobre bases genética.; mientras que las variaciones en aspectos cuantitativos se deben tanto a factores genéticos, como ambientales. (64) Existen datos experimentales de una serie de locigenéticos que pueden limitar o modificar la fuerza y el carácter de la respuesta inmunitaria, a toda una gama de antígenos sintéticos y naturales. Aquellos genes de las respuestas inmunitarias asociados con el complejo mayor de histocompatibilidad ( MCH) han sido investigados, (13) pero se sabe de otros loci genéticos (12) que limitan o modifican grandemente la fuerza y el carácter de la respuesta inmunitaria; algunos de éstos loci se localizan en el cromosoma X, pues se

cuenta con evidencias tanto directas como indirectas que indican que la respuesta inmune varía debido al sexo; y en base a ellas se ha postulado la existencia de genes activos ligados al cromosoma X, los cuales regulan por un lado los niveles de las diferentes clases de inmunoglobulinas y por otro lado, la respuesta inmune específica de cada clase de anticuerpo. (2,12,16,29,39,44,47). A continuación citaré algunas evidencias que apoyan lo anterior y justifican la realización del presente trabajo.

## ANTECEDENTES

Es bien sabido, que en la población humana la longevidad de las mujeres supera a la de los hombres, a pesar de que el índice de natalidad de estos últimos, es mayor al de las mujeres. La mayor supervivencia mostrada por la población femenina, sugiere que, las hembras poseen algún mecanismo o condición diferente a los machos el cual les permite expresar dicha ventaja o superioridad biológica. (35,44, 65).

Existen reportes que indican que la susceptibilidad a enfermedades bacterianas y virales, es mayor en los hombres que en las mujeres. (3,11,49,62). Se sabe también, que las inmunodeficiencias (46) ligadas al sexo son más frecuentes en los hombres; y que por el contrario, las enfermedades autoinmunes (4) atacan preferentemente a las mujeres. (18,44)

En base a estas evidencias, se ha pensado que el sistema inmune de las hembras es superior al de los machos; y que por ello la supervivencia de las hembras es superior a la de los machos, sin embargo, para tratar de explicar el por qué de esta diferencia entre sexos, se han sugerido otras dos hipótesis: La primera dice que la disparidad en cuanto a longevidad en los sexos, se debe a que los ambientes en que se desenvuelve cada sexo, son diferentes; de lo cual resulta, que los hombres estén mayormente expuestos a los agentes infecciosos que las mujeres. La segunda hipótesis (14) postula que las diferencias hormonales, son las responsables de las diferencias en la supervivencia, observadas de un sexo a otro; sin embargo, se ha encontrado que la res

La respuesta inmune de las hembras supera a la de los machos, desde el nacimiento, o sea, antes de que existan diferencias hormonales marcadas entre ambos sexos.

En el presente trabajo se da mayor apoyo a las bases inmunogenéticas para explicar este fenómeno. De acuerdo con esta hipótesis, se sugiere que las hembras son superiores a los machos en su sistema inmune (44), y esta diferencia, posiblemente sea el resultado de la acción de genes localizados en el cromosoma X, cuya función se asocia al sistema inmune (44). Aunque, esto ocurriría solo suponiendo que, estos genes se encontraran activos en ambos cromosomas X de las hembras, es decir que no sufren compensación de dosis, tal como lo establece Mary Lyon en su hipótesis (23,33,37) Y así, la presencia de un cromosoma X más en las hembras que en los machos, determinará que éstas tengan ventajas en su sistema inmune; lo cual les proporciona a su vez, ventajas para una mayor supervivencia.

## I N T R O D U C C I O N

I.- Control Genético de la respuesta Inmune.

II.- Antecedentes de la Superioridad Biológica de las Hembras. Estudio del Efecto del sexo en el sistema Inmune.

III. Inactivación del cromosoma X en mamíferos. Hipótesis de Lyon.

Objetivo:

1.- Resumen de antecedentes.

2.- Justificación de la realización del presente trabajo.

3.- Hipótesis y plan de trabajo.

## I - CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA INMUNE.

El sistema inmune provee resistencia contra un amplio espectro de infecciones. La operación y mantenimiento del sistema inmune requiere la diferenciación, interacción y regulación de múltiples tipos celulares. La capacidad de generar respuestas inmunes humorales y celulares específicas se encuentra bajo control genético; los productos de los genes de respuesta inmune se expresan funcionalmente en las células que participan en la regulación de las respuestas inmunes: macrófagos, células T cooperadoras y T-supresoras. (5,9,12)

Las actividades independientes de muchos genes y sus productos se requieren para el desarrollo y mantenimiento de un sistema inmune funcional. Cualquier gen que modifica una función inmune puede ser clasificado como un gen de respuesta inmune. Es difícil estimar el número de genes Ir o de loci que están involucrados en el control de la respuesta inmune, especialmente porque algunos de éstos genes podrían ser no polimórficos. Sin embargo, para asegurar que las especies mantienen el potencial para resistir el más amplio espectro de agentes infecciosos, es esencial que exista polimorfismo en algunos genes Ir dentro de la población. (12,13)

Biozzi y col. han analizado la regulación genética de la respuesta inmune en ratones, por medio de la cría selectiva de líneas con altas y bajas respuestas de anticuerpos. Así, utilizando eritrocitos heterólogos como antígeno selector, éstos investigadores identificaron aproximadamente 10 loci Ir polimórficos independientes. Estos loci controlan la respuesta a muchos antígenos no relacionados con el antígeno usado para la cría selectiva. Entonces la mayoría de éstos genes Ir no son específicos para el antígeno. Aunque la cría selectiva ha probado ser una técnica de mucho valor para la enumeración de genes Ir no específicos para el antígeno, la identificación y análisis de genes Ir es pecíficos para el antígeno, ha requerido de un enfoque diferente. El estudio de los genes Ir específicos para el antígeno, comenzó con el descubrimiento de que la habilidad para responder hacia antígenos seleccionados estaba controlada por genes autosomales que eran heredados en una simple manera Mendeliana. (6,9,13, 52, 61)

Los tres tipos de antígenos más usados para la identificación de genes Ir antígeno-específicos son los siguientes: a) polipéptidos sintéticos con heterogeneidad estructural limitada; b) Aloantígenos que difieren ligeramente en sus contrapartes autólogas; y c) Antígenos complejos multideterminantes, administrados en dosis limitadas, en con condiciones donde solo los determinantes más inmunogénicos son reconocidos. Entonces, el descubrimiento de genes Ir específicos para el antígeno dependió de experimentos en los cuales, el sistema inmune fue presentado con un reto de heterogeneidad y especificidad altamente restringidas. (5,13)

La selección de tales inmunógenos, tendió a limitar las posibles interacciones es pecíficas entre antígenos y las clonas de células inmunocompetentes. Esta aproximación,

no revelado que las respuestas de una variedad de animales experimentales se encuentran bajo el control de genes Ir dominantes o codominantes.(12)

Mc Devitt y col., analizando el control genético de la respuesta inmune en el ratón, hacia (T, G)-A-L, notaron que éste gen Ir estaba ligado a los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, H-2. Posteriormente estos autores demostraron que los genes Ir ligados a H, mapeaban en una nueva región del complejo H-2, de la región I.

El MHC codifica para los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, que determinan el rechazo de los tejidos y para los antígenos que se expresan en macrófagos, células B y células T que son responsables del reconocimiento de la inmunogenicidad.

Los genes Ir ligados al MHC, que son responsables del reconocimiento de antígenos específicos como inmunógenos; permitiendo así la formación de respuestas inmunes ( que se caracterizan por inmunidad celular y síntesis de anticuerpos contra determinantes de los antígenos), se han verificado en: ratones, perro, caballos, monos rhesus y humanos. 9,13,17,64.

En la rata, también se ha demostrado la presencia de genes de respuesta inmune ligados al MHC.<sup>17</sup> Los altos respondedores producen anticuerpos con constantes de afinidad mayores en comparación con los bajos respondedores.<sup>29</sup> La rata ha sido poco utilizada para el estudio de los genes Ir, debido a que el MHC de ésta, es poco conocido y a que existe poca disponibilidad de cepas recombinantes. Kunz y col. han establecido que el MHC de la rata (RTI) es muy

parecido al del ratón. ( Tomado de 9).

Se piensa, que los genes Ir ligados al MHC son los principales genes Ir antígeno-específicos; aunque, hay evidencias de la existencia de otros loci genéticos que también influyen en la capacidad de producir respuestas inmunes, (ver página siguiente). (43)

Las respuestas inmunes que están reguladas por genes Ir ligados a H, requieren de la presencia de linfocitos derivados del timo. No se ha observado control por genes ligados a H, de respuestas timo independientes. (5,9)

Los genes Ir controlan la respuesta inmune hacia antígenos simples y complejos, y posiblemente cada gene Ir controla la respuesta hacia un solo de terminante antigénico de la molécula antigénica con múltiples determinantes. (5,18)

Se piensa que el macrófago juega un papel fundamental en seleccionar, dentro de un antígeno complejo, la porción que será reconocida por las células T y B. Este proceso de selección, podría ser la función de los genes de respuesta inmune que operan a nivel de la célula presentadora del antígeno. Los antígenos Ia, como productos de los genes Ir, tendrían sitios de unión capaces de fijar determinadas secuencias primarias, reconocidas por células T con especificidad para los antígenos Ia, más secuencias de aminoácidos cortas del antígeno. ( más adelante se describe con más detalle la función de los genes Ir). (5,9,47)

Tipos de control genético de la respuesta inmune.

La respuesta inmune está regulada genéticamente a dos niveles principales. (1) El control específico está asegurado por genes de respuesta inmune específica ( Ir), expresados fenotípicamente en inmunicitos y operando a nivel del reconocimiento del antígeno. (56)

La acción de cada gen Ir está limitada específicamente a el control de uno o pocos epitopes. Estos genes se encuentran frecuentemente ligados con el locus H-2 o con los marcadores alotipo de Inmunoglobinas. Sin embargo, también hay estudios que indican a) control por genes no ligados a H-2, b) interacción de dos genes ligados a H-2, c) participación de genes no ligados a H-2 en una respuesta controlada por genes Ir ligados a H-2, d) control por genes ligados al alotipo de la cadena pesada, e) control por genes ligados a X, y f) control multigénico, particularmente evidente con antígenos complejos. (17,43)

(2) La regulación general de las respuestas inmunes opera a través de un grupo de loci, que controlan la síntesis cuantitativa de anticuerpos hacia muchos inmunógenos complejos no relacionados.

Por el momento la hipótesis más aceptada, postula que éstos genes son expresados fenotípicamente en macrófagos y también en linfocitos; ellos controlan el procesamiento del antígeno y consecuentemente regulan el efecto inmunogénico del antígeno, en la velocidad de multiplicación y diferenciación de linfocitos B. (56)

CONTROL POR GENES Ir DE LA RESPUESTA DE CADA CLASE DE  
INMUNOGLOBULINA.

Las cepas de ratones podrían diferir en las magnitudes de sus respuestas de anticuerpos hacia un antígeno dado, a causa de un defecto selectivo en la habilidad para producir anticuerpos específicos de una clase particular de inmunoglobulina.

Desde luego, este es el caso en algunos sistemas en los cuales, los genes Ir pueden controlar la producción de ciertas clases de inmunoglobulinas.

Así, varios grupos han mostrado que genes dentro del complejo H-2 pueden controlar la habilidad para producir anticuerpos IgG. Por ejemplo, Kelso y col. demostraron que los ratones altos y bajos respondedores, podían generar respuestas de IgM específicas para el antígeno X, pero que solo los ratones altos respondedores producían respuestas de anticuerpos IgG. La observación de que la respuesta primaria de IgM, la cual es típicamente independiente, es de igual magnitud tanto en el alto respondedor, como en el bajo respondedor; sugirió que ésta respuesta no se encuentra bajo el control de genes Ir ligados a MCH. Sin embargo, la respuesta T-dependiente de IgM, si se encuentra bajo el control de genes Ir, ligados al MCH, que se sitúan en la región IA. (913)

El control de genes Ir de otras clases de inmunoglobulinas, tales como IgE ha sido también bien documentado. (13)

Por lo que respecta a la respuesta de anticuerpos de la clase IgA en el suero y en las secreciones, se sabe muy poco acerca de su regulación; aunque, se ha establecido la participación de células T cooperadoras y T supresoras. Por lo tanto se piensa que la respuesta de IgA también se encuentra bajo el control de genes de respuesta inmune. (9)

Diana M. Popp., estudiando el control genético de los niveles de IgA en el ratón, encontró que los niveles absolutos y relativos de IgA diferían entre dos líneas. Además, sus resultados sugieren que la regulación de los niveles séricos de IgA se encuentra genéticamente controlada, y que los niveles de IgM están controlados por el mismo o un gen ligado. Los niveles de  $IgG_1$ ,  $IgG_2b$  e  $IgG_2a$  son controlados independientemente de la regulación de IgA e IgM. (Tomado de 9)

### EXPRESION DE GENES Ir

Existen dos modelos para explicar la función de los genes Ir, cada uno se encuentra basado en evidencias de varios laboratorios realizadas en varios sistemas experimentales. (5)

i) El primer modelo postula que los genes Ir controlan a las moléculas Ia en macrófagos y células B. Estas moléculas tienen la habilidad de interactuar con antígenos T dependientes, de tal manera que se forma un complejo Ia-antígeno, el cual es capaz de activar únicamente a las células T cooperadoras o de hipersensibilidad retardada con especificidad para la señal de disparo que involucra a ambos componentes.

De acuerdo con esta hipótesis, un macrófago que porte una molécula Ia incapaz de interactuar apropiadamente con el antígeno nominal X, y que por lo tanto es incapaz de presentar una señal inmunogénica a los linfocitos T; será un macrófago no respondedor para tal antígeno.

La inyección del antígeno X en un animal con tales macrófagos defectuosos, favorecerá la estimulación de células T supresoras.

Este modelo "macrófago-gen Ir", implica que los productos de los genes Ir y las moléculas Ia son idénticas y no se encuentran distribuidas clonalmente en los macrófagos.

Según este modelo, los mismos productos específicos de los genes Ir son expresados en las células B y en los macrófagos. Entonces, las restricciones de las células T-B controladas por el H-2 observadas para las respuestas secundarias podrían ser explicadas en base a la restricción impuesta en las células T de memoria por la estimulación inicial "Ia-antígeno" mediada por el macrófago durante las respuestas primarias. Tal modelo para la interacción T-B regulada por la región I provee una explicación para la observación de que las células T dirigidas al antígeno de (respondedor X no respondedor)  $F_1$ , solo cooperan con células B dirigidas que poseen el gen Ir "respondedor". Entonces podemos trazar un paralelo completo para estas restricciones reguladas por genes IR, de la siguiente manera: de macrófago-células T y de células T-células B. (Tabla de 5)

El concepto de que las células T reconocen un complejo antígeno-Ia en la membrana de las células B implica que la molécula Ia en las células B podría ser un importante sitio "blanco" para la activación de las células B. (47)

ii) El segundo modelo para la función de los genes Ir postula que los genes Ir son expresados primariamente en las células T; y son afectados con la producción de factores específicos cooperadores y supresores, los cuales llevan determinantes codificados por loci en la subregión I-A e I-J, respectivamente. (6)

También hay evidencias que apoyan la existencia de éstos factores. En cepas seleccionadas se han identificado defectos específicos del antígeno que involucran la ausencia de éstos factores, se ha mostrado que éstos defectos se encuentran controlados por genes de la región I. (5, 18)

Es difícil adaptar ambos modelos de la función de los genes Ir en uno solo que abarque teoría basada únicamente, en un solo tipo de producto de genes Ir y función.

Por lo tanto se piensa que ambos modelos son correctos, y reflejan el control por la región I, de las respuestas inmunes específicas, por dos mecanismos distintos, involucrando dos clases separadas de moléculas producidas por la región Ia. (Tomado de 5 y 41)

En base a lo anterior, uno podría esperar encontrar que las especificidades Ia en las células B y macrófagos deberían de ser diferentes de aquellas expresadas por los factores de las células T supresoras y cooperadoras, y que genes distintos codifican para éstos dos conjuntos de productos genéticos de la región I.

### MOLECULAS Ia Y SU PAPEL EN LA FUNCION DE LOS GENES Ir.

Se ha mostrado que los genes de respuesta inmune específica (Ir) localizados en la región I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de los mamíferos juegan un papel principal en las respuestas inmunes timo dependientes. Sin embargo, el mecanismo de expresión de la función de los genes Ir permanece aún como un área de intensa investigación y de gran especulación. A través de los años, surgió una atractiva hipótesis que sugiere que los determinantes antigénicos involucrados en la estimulación de las clonas de células T cooperadoras dirigidas, de hipersensibilidad retardada y proliferativas, son un complejo de fragmentos de antígeno en asociación con aloantígenos glicoproteínicos- Las moléculas asociadas a la respuesta inmune (Ia). Este complejo funcional de antígeno y moléculas Ia es exhibido apropiadamente a las células T por células presenta doras de antígeno de origen variable, incluyendo aquellas de la línea de fagocitos mononucleares (Mo). Hasta la fecha, la información que sugiere que las moléculas Ia se ecuentran involucradas directamente en la función de los genes Ir ha sido solo inferencial; la prueba de tal enlace requerirá experimentos que demuestren la actual asociación fisicoquímica del antígeno con Ia.

Los trabajos previos con antígenos proteínicos definidos tales como la insulina han contribuido mucho a la comprensión actual del mecanismo y naturaleza de la función de los genes Ir en el reconocimiento del antígeno. Por ejemplo, hay genes Ir ligados al MCH que regulan las respuestas murinas de células T proliferativas de ratones H-2<sup>b</sup> hacia la insulina de buey. Este control es dependiente de un proceso de selección de determi nante expresado por el Mo presentador de antígeno-Ia positivo y mapea en las subregiones K<sup>b</sup> y/o I-A<sup>b</sup> del complejo de genes H-2.

#### INDUCCION Y TERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE.

La respuesta inmune es extremadamente compleja ya que involucra un número de interacciones cruciales entre al menos cuatro tipos principales de células diversas: macrófagos, células T cooperadoras, células T supresoras y linfocitos B; cada una de éstas células interactúa, "reconoce", al antígeno por medio de moléculas receptoras, algunas de las cuales son diferentes unas de otras. También cruciales en la respuesta son los varios productos genéticos del MCH los cuales regulan las respuestas que involucran linfocitos T. Los estudios de cada tipo celular aislado muestran no solo un alto grado de complejidad, sino que también tienen capacidad para regular a los otros tipos celulares. Los macrófagos procesan el antígeno, pueden estimular la inducción de células T cooperadoras, pueden secretar factores moduladores que influyen linfocitos. Las células T cooperadoras ayudan a las células B y a otras células T. El subconjunto de células T involucradas en la sensibilidad retardada y en la inmunidad microbial a su turno influyen en la función del macrófago. Las células T supresoras controlan la respuesta inmune secretando factores específicos y no específicos. Finalmente, las células B responden de manera positiva o negativa dependiendo de la estructura del antígeno y de otras células reguladoras. (S, B, 21, 42).

Aunque se ha avanzado bastante la comprensión de la inducción inmune, no ha sido posible aún explicar, la secuencia correcta de eventos que procede desde el momento que el antígeno entra a un nódulo linfático hasta el momento que el último linfocito es activado y la respuesta termina. El número de interacciones potenciales, la facilidad con que una respuesta influencia otra hace muy difícil definir una secuencia completa de eventos. Pero a pesar de todas estas dificultades, ciertos fenómenos se distinguen claramente y son considerados pasos cruciales en cualquier respuesta:

A) Inducción de la respuesta inmune.-

1) La captación del antígeno por macrófagos es crucial para la respuesta a antígenos T dependientes. La presentación del antígeno por el macrófago es esencial para la inducción linfocitos T cooperadores a través de un paso controlado por el MCH.

2) Las respuestas inmunes con clonales, involucran células T y B con receptores uni-específicos.

3) Las respuestas inmunes involucran interacciones celulares de "llave" controladas por el MCH.

4) Pueden inducirse respuestas positivas y negativas en los linfocitos T dependiendo de la activación de células T cooperadoras o supresoras. La inducción de células T cooperadoras es influenciada críticamente por cantidades y formas de antígeno las cuales interactúan con macrófagos. La inducción de células T supresoras podría en sumo grado depender de la interacción con moléculas de antígeno las cuales no involucran un paso controlado por el MCH.

5) La respuesta de células B es afectada por el estado de maduración de la célula B, la estructura y cantidades del antígeno y por la presencia de células T cooperadoras. Claramente la respuesta de la célula B es un proceso de selección del antígeno que madura con el tiempo, e involucra receptores de afinidades variables.

B) Finalmente, lo que causa la terminación de la respuesta inmune es un conjunto de factores que han sido analizados y discutidos extensivamente, a continuación se describen los que se consideran de importancia:

1) La eliminación del antígeno. La duración del antígeno en una forma inmunogénica en los macrófagos es relativamente muy corta. Una vez que el antígeno desaparece del compartimiento inmunogénico la respuesta disminuye.

2) La presencia de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo pueden unir el antígeno disponible deteniendo su interacción eficiente con los linfocitos. Se piensa que fisiológicamente, los anticuerpos juegan un papel homeostático en el corte de la respuesta.

3) El surgimiento de las células T supresoras. Hay evidencias de estimulación por retroalimentación de células T supresoras específicas en respuestas inmunes hacia antígenos T dependientes convencionales. Estas células T supresoras son estimuladas por el surgimiento de células T cooperadoras Lyl+ y ayudan a terminar la respuesta.

4) La respuesta anti idiotipo. Hay evidencias en favor de la existencia de una respuesta de anticuerpos hacia los idiotipos expresados en las células B y T. Esta respuesta anti idiotipo podría también servir para terminar la estimulación de las clonas que llevan idiotipos en alguna etapa de la respuesta. (Tomado de 5418).

## II. Antecedentes de la superioridad Biológica de las Hembras.

### "ESTUDIO DEL EFECTO DEL SEXO EN EL SISTEMA INMUNE"

Aunque es ampliamente aceptado que las hembras son más resistentes que los machos a las enfermedades infecciosas (1,32,36,44,49,51,62) y que la supervivencia de las hembras (35,44,65) es mayor a la de los machos en cualquier etapa de la vida, los mecanismos que permitan explicar de manera convincente estos fenómenos aún no han sido esclarecidos.

La hipótesis más fuertemente apoyada por la evidencia experimental es la que sugiere que el sistema inmune de las hembras es superior al de los machos debido a que existen genes de respuesta inmune localizados en el cromosoma X, los cuales, asumiendo que no sufren inactivación en uno de los cromosomas X, confieren a las hembras ventajas inmunes sobre los machos por la expresión de una doble dosis de genes de respuesta inmune (41).

Por otro lado, se ha propuesto que las diferencias que existen entre machos y hembras en su sistema inmune, se deben a las diferencias hormonales que existen entre ambos sexos. ( 21,31,4,53,63,66)

El estudio del sistema inmune en relación al sexo y de la acción de las hormonas sexuales esteroides sobre el sistema inmune ha sido poco abordado. Los estudios realizados hasta la fecha se han enfocado sobre ocho aspectos básicamente que se describen a continuación, resumiéndose los resultados obtenidos en cada uno de ellos:

I.- EXISTEN NUMEROSAS EVIDENCIAS CIRCUNSTANCIALES, QUE MUESTRAN QUE LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS ES MAYOR EN MACHOS QUE EN HEMBRAS.

La incidencia de infecciones virales es más frecuente en machos que en hembras. Como ejemplos podemos citar: la poliomielitis, la hepatitis B, las infecciones respiratorias causadas por parainfluenza y por el virus sincitial, la infección a nivel de SNC por ECHO virus, la gastroenteritis por rotavirus, la panencefalitis esclerosante, la leucoencefalopatía multifocal progresiva, etc. (11,44,49,62)

Los machos también presentan enfermedades bacterianas infecciosas más frecuentemente que las hembras. Como ejemplos podemos citar: las infecciones producidas por estafilococos, E. coli y por Haemophilus influenzae. En ratones también se ha observado una mayor susceptibilidad a patógenos bacterianos en machos que en hembras. ( 3,41,48).

II. DETERMINACION DE LOS NIVELES SÉRICOS TOTALES DE INMUNOGLOBULINAS.

En humanos se ha encontrado que existe influencia del sexo en los niveles séricos de IgM; pues éstos son significativamente mayores en las hembras que en los machos. Además en estudios con mujeres con diferente número de cromosomas X ( desde 45,X hasta 48, XXXX) y en hombres, se ha reportado que existe una correlación positiva entre el número de cromosomas X presentes y la concentración sérica de IgM ( 8,46,48,22). Sin embargo, Mirmi en un estudio similar, reportó que no sólo los niveles de IgM se asocian al número de

mosomas X sino que también los de IgG. Indica también, que no existe tal asociación en cuanto a las concentraciones de IgA, IgD ni IgE. (41).

En otros estudios no se han encontrado diferencias entre ambos sexos en cuanto a los niveles séricos de IgA ni de IgG. (8,22,46). Sin embargo, Stoop ha reportado que las mujeres tienen niveles de IgG significativamente mayores que los hombres. (55)

### III. RESPUESTA ESPECIFICA DE INMUNOGLOBULINAS.

#### A) RESPUESTA ESPECIFICA TOTAL DE ANTICUERPOS.

##### i) En humanos.

-Rowley y Mackay midiendo la respuesta total contra flagelina de Salmonella adelaide, en humanos, encontraron que los títulos hemoaglutinantes totales eran significativamente mayores en hembras que en machos. (48)

-La respuesta a antígenos de E. coli y de Rubeola HAP, es mayor en niñas que en niños. (36)

-Las concentraciones de isoanticuerpos contra antígenos A y B son significativamente mayores en hembras que en machos. (22).

-Se ha reportado que existen diferencias entre ambos sexos en la respuesta inmune al virus de la hepatitis B. Además, la presencia de varias enfermedades hepáticas crónicas relacionadas con HBV tales como la hepatitis activa crónica, la cirrosis post necrótica y el carcinoma hepatocelular primario, es mayor en hombres que en mujeres. (32)

ii) En animales.

-Batchelor Chapman encontraron en ratones que las hembras tenían títulos de hemaglutinantes mayores que los machos contra un tumor incompatible. Observando también que la reactividad superior de las hembras no era debida a la presencia de tejidos ováricos, pero que la inferioridad inmunológica de los machos era debida, al menos parcialmente a la presencia de testículos. (4) .

- Los gatos machos producen menor respuesta de anticuerpos totales contra Bru-cella abortus que las hembras. (Tomada de 53).

- También se ha reportado que la repuesta total de anticuerpos hacia antígenos T-dependientes y T-independientes, es mayor en ratones hembras que en machos. (2,14)  
Más adelante se discuten con más detalle éstos datos, (ver inciso No.5).

#### B) RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS IgA, IgG e IgM.

##### i) En humanos

- La población femenina tiende a formar anticuerpos anti polio virus I de las clases IgA e IgG; mientras que los hombres forman IgG preferentemente, aunque ésta di-ferencia cualitativa de la respuesta inmune, no fue significativa ( 1 ).

- Rowley y Mackay, reportaron que los títulos de IgG anti flagelina no diferían entre ambos sexos, pero los títulos de IgM anti flagelina fueron significativamente mayores en las mujeres que en los hombres (48).

##### ii) En ratones.

- Terres y col. encontraron que las respuestas primaria y secundaria contra albúmina sérica bovina eran mayores en hembras que en machos. ( 59 ).

- La respuesta de IgM en los ratones hacia antígenos T-dependientes y T-independientes es mayor en las hembras que en los machos. (ver inciso No.5).

- Eidinger y Garrett evaluaron las respuestas primaria (IgM) y secundaria (IgG) hacia varios antígenos T-dependientes y T-independientes, encontrando que ambas respuestas eran mayores en las hembras que en los machos; y que la castración de los machos provocaba incrementos en la respuesta inmune. (14).

- Los estudios clínicos y en animales indican que las hormonas masculinas suprimen la producción de anticuerpos; mientras que las femeninas apoyan su producción. (4,14,36,44).

IV.- RESPUESTA INMUNE CELULAR EN MACHOS Y HEMBRAS; y ACCION DE LAS HORMONAS SEXUALES ESTEROIDES.

i) EFECTO DE LOS ESTEROIDES SOBRE EL TIMO Y EL TEJIDO LINFATICO.

Se ha observado que los esteroides adrenales y gonadales exhiben un efecto moderador en el crecimiento del timo y del tejido linfático; por ello se pensó que podrían influenciar la respuesta inmune. Se ha notado hipertrofia del tejido linfático, seguida de la adrenalectomía, la orquidectomía y la ovariectomía. Por otro lado se ha descrito atrofia del tejido linfático seguida a la administración de esteroides adrenales, andrógenos, estrógenos y de grandes cantidades de progesterona. (4, 14, 21, 66)

Se ha reportado que el tamaño del timo de las hembras es mayor al de los machos (63) y que la inyección de testosterona en ratones orquidectomizados causa involución del timo (63). Se ha encontrado también, que los estrógenos causan involución tímica y pérdida de linfocitos pequeños de bazo y nódulos linfáticos. (4).

ii) CELULAS T CITOTOXICAS Y HORMONAS ESTEROIDES.

Son bien conocidos los efectos inmunosupresores de los corticoesteroides, pero los efectos de las hormonas sexuales esteroides sobre el sistema inmune han sido poco estudiados. Sin embargo, algunos reportes sugieren que la progesterona y los estrógenos inhiben la inmunidad celular, esto ha sido evaluado por la prolongada sobrevivencia de aloinjertos de piel en animales a los que se han administrado estas dos hormonas. (66). Las hembras rechazan los aloinjertos de una manera más rápida y consistente que los machos; además la gonadectomía, la adrenalectomía y la adrenalectomía-orquidectomía combinada aumentan substancialmente la fuerza de rechazo de los aloinjertos en machos, y en menor extensión el rechazo de las hembras. (21).

Después de la gonadectomía, el porcentaje de rechazo de injertos de las hembras es mayor que el de los machos, pero la velocidad es menor. Al transplantar testículos a las hembras ooforectomizadas, éstas muestran un porcentaje de rechazo de los injertos significativamente menor al encontrado en las hembras ooforectomizadas sin transplante de testículos. En contraste, los machos orquidectomizados que recibieron trans

plantes de ovarios, mostraron un porcentaje de rechazo que no fué significativamente diferente al encontrado en los machos orquidectomizados sin transplantes. (21).

Se ha encontrado también, que la testosterona y los estrógenos producen susceptibilidad aumentada a las infecciones intracelulares, cuya inmunidad implica inmunidad mediada por células.

### iii) CELULAS T COOPERADORAS

Un estudio mostró que los linfocitos de mujeres que toman estrógenos/progesterona como anticonceptivos orales, tienen respuestas más bajas a la fito hemoaglutinina ( PHA). También se ha reportado que las hormonas progesterona, estradiol y testosterona, inhiben la transformación de linfocitos estimulados con PHA o con PPD; y al compararse el efecto de éstas tres hormonas con el marcado efecto inhibitorio del cortisol sobre los linfocitos estimulados con PHA, se encontró que: La progesterona y el estradiol tenían efectos inhibitorios moderados; mientras que la inhibición por testosterona era baja. (66).

En un estudio en el que se comparó el potencial inmunológico de linfocitos T y de células presentadoras de antígeno, en ratones machos y hembras, se encontró lo siguiente: los linfocitos de ratones machos o hembras que no pueden producir ni responder a testosterona ( Tfm/y= ratones con feminización - testicular), fueron más reactivos que los linfocitos de machos, a aloantígenos, en MLR (= Reacción de linfocitos mezclada- respuesta proliferativa de linfocitos alogénicos cultivados juntos). Se encontró también, que las células de

bazo estimuladas Con A, de ratones hembra, producen más interleucina 2 (IL 2) que las células de machos o hembras tratados con testosterona. Y por último, - al probarse la capacidad de los linfocitos de ratones inmunizados para responder a antígenos solubles " in vitro" ( KLH y DVA), se encontró que las células inmunocompetentes de las hembras respondían más vigorosamente que las células de los machos y que las células originadas en ratones hembras con implantes de testosterona. (3).

iv) MACROFAGOS EN MACHOS Y HEMBRAS.

Las células presentadoras de antígeno en el bazo de ratones hembras son más eficientes que las células AP de los machos para iniciar la respuesta secundaria en linfocitos activados.

La castración de los ratones machos aumenta la eficiencia en la presentación del antígeno; y el tratamiento de los ratones hembras con andrógenos la disminuye.

En resumen los datos de Weinstein sugieren que las células de las hembras son superiores a las de los machos, en funciones inmunológicas que están asociadas con: a) reacciones contra el antígeno, y b) reacciones de reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad; como son la presentación del antígeno y MLR. Además la reactividad diferencial de los inmunocitos entre ratones machos y hembras, depende del balance hormonal del animal; siendo los andrógenos inhibidores y los estrógenos activadores. (6).

Existen evidencias que muestran que la actividad fagocítica de los macrófagos de ratas es mayor en hembras que en machos (5,55)

V. GENES LIGADOS AL CROMOSOMA X EN EL RATÓN, CON FUNCIONES INMUNOREGULATORAS.

i) Respuesta inmune específica hacia antígenos T independientes.

-Se ha reportado que en ratones la respuesta de anticuerpos IgM contra antígenos T independientes como: el polisacárido del neumococo III y el ácido poly-I:poly-C, es mayor en las hembras que en los machos. También se ha encontrado que la habilidad para responder a DNA desnaturalizado se encuentra regulada genéticamente por un gen ligado al cromosoma X. (2,50,38,14).

-Zeicher et.al. han identificado un nuevo sistema de aloantígenos polimórficos controlado por loci en el cromosoma X, usando antisueros de ratones híbridos que difieren en su cromosoma X. Estos antígenos se asocian a los genes de respuesta inmune que controlan la respuesta inmune hacia los antígenos timo independientes; y también muestran asociación con el locus de histocompatibilidad presente en el cromosoma X. Estos antígenos fueron principalmente detectados en una subpoblación de linfocitos derivados del timo. (67):

-El cromosoma X del ratón inmunodeficiente OBA/N contiene un gen recesivo llamado "xid" ( X chromosome linked immunodeficiency gen), el cual es responsable de varios defectos inmunes incluyendo: bajos niveles séricos de IgM, ausencia de respuesta a los antígenos T independientes tipo 2 y ausencia de un subconjunto de células B de maduración tardía las cuales, en ratones normales expresan los antígenos de diferenciación: Lyb 7, Lyb 3, Lyb 5 e IaW39. (7,25,26,47)

-Se ha reportado que el gen *xid* tiene un profundo efecto protector sobre las enfermedades autoinmunes. Aún en la enfermedad autoinmune asociada al cromosoma Y (y sin relación hormonal) de los ratones machos BXSB y (NZBxBXSB) F<sub>1</sub>. (32).

ii) Respuesta inmune específica hacia antígenos T-dependientes.

En los ratones la respuesta de anticuerpos totales contra antígenos T-dependientes como son: los eritrocitos de carnero (14), la gammaglobulina humana altamente dinitrorenilada y la albúmina sérica bovina (59); es mayor en las hembras que en los machos. La respuesta a BSA de los ratones hembras también es de mayor duración que la de los machos. (59)

Debido a que la respuesta de anticuerpos primaria y secundaria de las hembras a los antígenos T-dependientes es de mayor duración e intensidad que la de los machos, puede pensarse que la respuesta a otros antígenos T-dependientes como son: el GAT (12) y la nucleasa del estafilococo puede estar asociada a genes ligados al cromosoma X. Pues, en los ratones la respuesta a estos dos antígenos muestra diferencias cuantitativas y cualitativas no asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad. (9).

VI.- LAS INMUNODEFICIENCIAS LIGADAS AL SEXO SON MÁS FRECUENTES EN MACHOS

QUE EN HEMBRAS .

Existen cinco inmunodeficiencias ligadas al sexo que atacan preferentemente a los hombres : la hipogammaglobulinemia congénica ligada al sexo, la inmunodeficiencia grave combinada, la inmunodeficiencia con hiper-IgM, la inmunodeficiencia con trombocitopenia, eccema e infección recurrente (síndrome de Wiskott-Aldrich), y la enfermedad granulomatosa crónica. (18, 20, 44)

Se ha reportado, que las mujeres con delección intersticial en el brazo corto del cromosoma X (del(Xp)) tienen bajas respuestas proliferativas de linfocitos a concana valina A (Con A) y una marcada depresión "in vitro" de la función de células B. Las pacientes con (del(Xp)) generaron muy pocas células formadoras de placas (PFC) inducidas por mitógeno de fitolaca (PWM), aún en presencia de hidrocortisona (HC) para inhibir células supresoras sensibles a HC. Las células B de las sujetos con del(Xp) secretaron muy pocas cantidades de IgA, IgG e IgM. Las células B de éstos pacientes fueron incapaces de secretar inmunoglobulinas aún en presencia de células T cooperadoras normales (OKT 4<sup>+</sup>). La función de las células OKT 4<sup>+</sup> de las pacientes con del(Xp) estaba ligeramente reducida, mientras que la actividad de sus células OKT 8<sup>+</sup> (supresoras) era normal. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la producción de anticuerpos se encuentra controlada al menos parcialmente por genes localizados en el brazo corto del cromosoma X. (16)

En ratones también existen genes ligados a X inmunoreguladores, los ratones CBA/N poseen una inmunodeficiencia recesiva ligada al cromosoma X. (2).

## VII.- LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES ATACAN PREFERENTEMENTE A LAS HEMBRAS.

Como ejemplos de algunas enfermedades autoinmunes que se desarrollan con mayor incidencia en las hembras que en los machos tenemos las siguientes:

La anemia hemolítica autoinmune espontánea de la cepa NZB/Bl, la artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas, en humanos el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, la tiroiditis Hashimoto, la miastenia gravis, la anemia hemolítica autoinmune adquirida, etc. (18, 20, 44).

En un estudio realizado en ratones se demostró que la respuesta de anticuerpos contra DNA está controlada por genes ligados a X. El modelo para lupus-erythematosus fue el ratón NZB (el cual muestra autoinmunidad aumentada asociada al sexo). La autoinmunidad timocitotóxica de ocurrencia natural (NTA), ocurre aproximadamente en el 50% de la descendencia de las hembras de ratones NZBxDBA; mientras que rara vez aparece en los machos. Pero la castración de éstos ratones machos híbridos, resulta en la aparición de NTA en aproximadamente el 50% de los animales. Ya que la castración abuele la diferencia entre machos y hembras en los ratones híbridos NZB/DBA, se piensa que las hormonas sexuales son las responsables de este fenómeno. Además, otro estudio demostró descubrimientos semejantes: La castración prepuberal de los ratones B/W machos acorta notablemente su sobrevivencia; mientras que la castración de las hembras B/W no tiene efecto alguno sobre la supervivencia. Se observó también que los machos castrados tenían cantidades mayores de anticuerpos anti DNA que los normales; y que mostraban un encendido prematuro en la producción de IgG. Por otro lado se encontró que las hormonas masculinas protegían contra la autoinmunidad.

Estos datos indican que las hormonas sexuales influyen grandemente en la formación espontánea de anticuerpos anti DNA y la enfermedad autoinmune en el ratón B/W.

Tatal ha sugerido, que el equilibrio entre células T cooperadoras y supresoras podría estar modulado por hormonas sexuales; estando la supresión favorecida por los andrógenos.

La enfermedad autoinmune del ratón NZB/W es suprimida por tratamiento con testosterona o con dihidrotestosterona. En contraste los estrógenos aceleran la aparición de enfermedades autoinmunes, que se sabe que ocurren con mayor frecuencia en hembras que en machos. (44, 52).

#### VIII.- OTRAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS ENTRE MACHOS Y HEMBRAS EN SU SISTEMA INMUNE.

##### i) TOLERANCIA

La no reactividad es más fácil de obtenerse en machos que en hembras. (19,44) Las hembras tienden a desarrollar inmunidad a dosis de antígeno que inducen tolerancia en machos de la misma edad. Esto podría explicarse en base a dos observaciones: a) En la respuesta a los antígenos T independientes es más fácil de obtener tolerancia que contra los antígenos T-dependientes y b) la respuesta de IgM contra los antígenos T-independientes se encuentra regulada por genes ligados a X. Por lo tanto las hembras producen mayores respuestas de IgM a los antígenos T-independientes y es más difícil obtener tolerancia en ellas que en los machos.

##### ii) Frecuencia de cáncer.

Los hombres padecen algunos cánceres con mayor frecuencia que las hembras. Especialmente linfoma y leucemia. (44)

##### iii) La producción de Interleucina II (65)..

Como ya se mencionó la testosterona y los estrógenos tienen efectos opuestos en el sistema inmune: los estrógenos aumentan y la testosterona disminuye la respuesta celular y de anticuerpos a los antígenos. Pero otro factor que podría contribuir a la débil respuesta de los machos es la producción de interleucina II (IL 2).

Las células de bazo de los machos o de las hembras tratadas con testosterona, producen menor cantidad de IL 2 que las células tomadas de hembras normales. Para producir IL 2 los linfocitos T-Lyt-1<sup>+</sup>2<sup>-</sup> deben interactuar con un macrófago Ia<sup>+</sup>, o con el mediador soluble Il 1.

Aún no se sabe si la reducida producción de IL 2 es el resultado del efecto de la testosterona sobre los macrófagos o sobre ambos tipos de células- linfocitos T y macrófagos.

### III. Inactivación del cromosoma X en mamíferos. Hipótesis de Lyon.

En el humano, las células de una hembra normal, contienen un pequeño cuerpo teñido oscuramente, situado justamente dentro de la membrana nuclear — éste es el llamado cuerpo de Barr o cromatina sexual; la cromatina sexual — no existe en las células de machos normales, pero se ha observado que en las células de individuos con constituciones anormales de cromosomas sexuales, — siempre hay un cuerpo menos de cromatina sexual que los cromosomas Y que — existen — por ejemplo un macho XXY tiene un cuerpo de Barr, una hembra XO no tiene ninguno, y una hembra XXX tiene dos. (19,40,65)

Así después del reconocimiento del cuerpo de cromatina sexual, o cuerpo de Barr, como un cromosoma X inactivo; Mary Lyon desarrolló la hipótesis del X inactivo. (33). De acuerdo con esta hipótesis "uno de los dos cromosomas de la hembra normal es inactivo irreversiblemente por heterocromatinización, alrededor de siete o doce días después de la fertilización. En algunas células es inactivado el cromosoma X materno, y en otras el paterno, pero el mismo cromosoma se mantiene persistentemente inactivo en todas las células descendientes". ( 33,40,65)

Como apoyo a esta hipótesis tenemos que: Muchos genes limitados por X producen el mismo efecto fenotípico, ya sea en dosis individual o doble. El organismo generalmente controla los genes limitados a X que no están involucrados con la determinación o diferenciación sexual, que se encuentra en una

cósis individual en machos y doble en hembras. Así el nivel de actividad es igual en ambos sexos; y esto es lo que se conoce como compensación de dosis. (33,65).

Se han observado genes limitados a X en humanos, que dan origen a mosaicismos funcionales, así, parece que la compensación de dosis en humanos es rutinariamente realizada por la supresión total de la acción de uno de los dos alelos presentes. Ya que la mayoría del DNA nuclear de eucariotas es normalmente inactivo transcripcionalmente, uno podría pensar que la compensación de dosis en humanos es una consecuencia de la activación de solo uno de los alelos presentes.

La Heterocromatización previene la transcripción:

Tanto en los efectos de posición de tipo V, como en los sistemas de elementos controladores, la presencia de heterocromatina afecta la expresión de los genes eucromáticos adyacentes, posiblemente por la heterocromatización - esparcida dentro de los genes eucromáticos evitando su transcripción. Un ejemplo de heterocromatización, es el agrupamiento de los cuerpos de Barr, lo cual previene a esos genes de ser transcritos. Esta conclusión se basa en la observación de que la incorporación de uridina radioactiva al RNA en la región del cuerpo de Barr de fibroblastos femeninos, constituye sólo el 18% de la cantidad incorporada por un volumen similar de una región del cromosoma X no perteneciente al cuerpo de Barr. Parece que hay igual probabilidad de inacti

var cualquiera de los X's normales ( aunque los X's con delecciones se encuentran preferentemente incluidos en los cuerpos de Barr). La inactivación no ocurre en la línea germinal. Por ejemplo, uno de los dos cromosomas X' es una rata hembra adulta es heterocromático en tejidos somáticos, mientras que ningún X es heterocromático en el óvulo. Ha sido demostrado, en óvulos humanos maduros, que ambos loci para la enzima G6PD son funcionales. No se sabe qué factor determina por qué ningún X es heterocromático en la línea germinal, o cuál X será heterocromático en tejidos somáticos. ( Tomado de 23)

#### EVIDENCIAS QUE APOYAN LA HIPOTESIS DE LYON.

Varios estudios apoyan la hipótesis de un solo X activo.

La mula ha proporcionado una línea interesante de evidencias citológicas, ya que el cromosoma X del caballo es fácilmente distinguible del cromosoma X del burro, en bases morfológicas. Y así el examen de cari demostró que el cromosoma X de replicación tardía ( inactivo) era originario ya fuera del caballo o del burro en diferentes células. (40)

Entre los estudios realizados en el hombre que confirman la hipótesis de Lyon están aquellos derivados de las investigaciones sobre la G6PD ( glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) y los de la translocación X/X. Las mujeres heterocigotas para el gen recesivo ligado a X que produce una deficiencia en la enzima G6PD, algunas veces muestran una anemia ligera como resultado de comer habas o de tomar medicinas antimaláricas. Cuando se extrajó sangre a esas mujeres a una de esas drogas, se encuentra que alrededor de la mitad de las células son

hemolizadas, mientras que la otra mitad no es afectada. Es posible que las células afectadas hayan procedido de células progenitoras que tenían un cromosoma X activo con el gene mutante para la deficiencia de G6PD. (23)

Si las células varían respecto a cual de los cromosomas X se convierte en el cuerpo de cromatina sexual, se esperaría que una hembra fuera un mosaico en el cual, en algunas células se expresara un grupo de genes ligados al cromosoma X del padre, y en otras se expresara el otro grupo de genes del cromosoma X de la madre. El efecto de esta acción de mosaico fué investigado por Mary Lyon en ratones. En los estudios con ratonas heterocigotas para los genes amarillo y negro, ligados en el cromosoma X, Lyon encontró que la capa resultaba de un aspecto moteado, con manchas tanto de color amarillo como negro distribuidas de manera irregular. Parecía evidente que un cromosoma X estaba funcionando para producir el color amarillo y el otro X, el color negro. (65) Pero las manchas eran demasiado grandes, debido a que cada una de ellas incluía un área que contenía muchas células. De aquí fué de donde la investigadora modificó su hipótesis postulando que: "la inactivación de uno de los dos cromosomas se efectúa, en ratones, unos 16 días después de la concepción y que una vez que un cromosoma X ha sido inactivo, permanece en ese estado, de tal manera que todas las células que desciendan de la portadora con ese cromosoma tendrán el mismo cromosoma X funcional". Esto explica las manchas irregulares de color en la capa de los ratones adultos. Cada una de ellas tiene origen en

una célula embrionaria diferente y cada mancha tiene una probabilidad de 1:1 de ser amarilla o negra. (65, 19,33)

En gatos, también se ha observado que los gatos de color estampado o carey, son siempre hembras; y son heterocigotas para los colores amarillo y negro. O sea que presentan un patrón de mosaico igual al descrito en los ratones. (65)

Se piensa que la inactivación de uno de los cromosomas X, en el embrión de los humanos, se efectúa en el decimosegundo día de la embriogénesis, aproximadamente en la etapa de 32 células. Algunas mujeres que son heterocigotas para la hemofilia muestran un marcado retardo en el tiempo de coagulación de la sangre. Posiblemente, en estas mujeres, muchas de las células que producen la sustancia VIII tienen un cromosoma X activo que contiene el gen para la hemofilia y otro inactivo con el alelo normal. Otras mujeres heterocigotas para la hemofilia pueden no mostrar retardo en el tiempo de la coagulación debido a que precisamente han recibido el arqueo opuesto: muchas células tienen un cromosoma X activo portador del gene normal y pocas células en las cuales se expresa el gen para la hemofilia. (65)

La percepción del color por las mujeres heterocigotas para uno de los genes que ocasiona ceguera para el color, da la misma indicación. Algunas tienen defectos en la percepción del color que están restringidos a ciertas áreas de la retina, mientras muestran una percepción normal para el color. (65 )

#### El Mosaicismo.

El mosaicismo fenotípico involucra heterocromatización.

La heterocromatización facultativa del cromosoma X que resulta en la compen-

sación de dosis, puede extenderse hacia otros loci eucromáticos, los cuales se vuelven adyacentes a él como resultado de la translocación.

En el caso de eucariotas, se especula que la organización ordenada de los cromosomas y sus partes en el núcleo, refleja un ordenamiento en la acción genética. Un cambio en esta organización podría tener consecuencias fenotípicas, es decir podría tener un efecto de posición.

Se han obtenido ratonas heterocigóticas para una translocación recíproca entre el cromosoma X y un autosoma.

Cuando el autosoma translocado lleva un alelo dominante particular normal, y su homólogo no translocado lleva un mutante alelo recesivo, las hembras son frecuentemente mosaicos fenotípicos para el gen en cuestión. Así, algunas partes del tejido afectado, muestran el carácter recesivo y otras partes muestran el carácter dominante para el gen autosomal. (25)

Aquellas porciones de las ratonas que fallan al expresar el alelo dominante, están mostrando un efecto de posición en este gen, en su posición translocada. Una explicación para este efecto de posición es la siguiente: Cuando el fragmento X que lleva el alelo dominante translocado, es heterocromatizado facultativamente, la heterocromatización se extiende al fragmento autosomal unido, al menos hasta el locus del alelo dominante, y previene su transcripción. Como resultado de esto, se expresa el fenotipo recesivo. En cédulas donde el X no trans

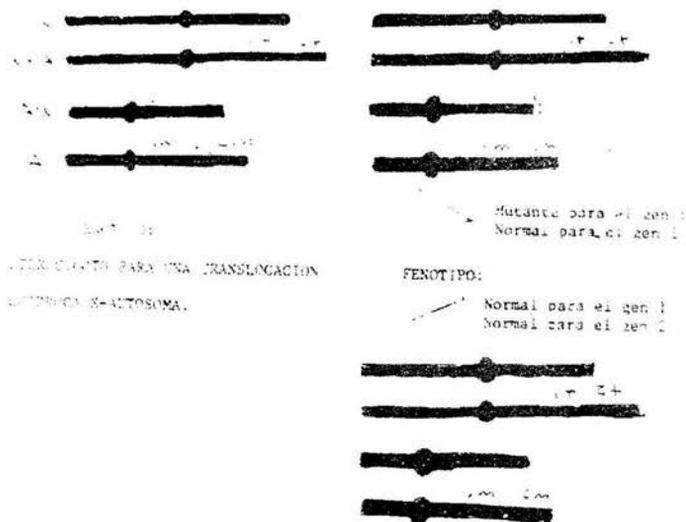


FIG. La hipótesis de la extensión de la heterocromatización facultativa para explicar el efecto de posición observado en los ratones hembras para algunos loci autosomales translocados a el cromosoma X. El cromosoma X encerrado en el área sombreada es heterocromatizado. Los fenotipos se refieren a marcas autosomales indicadas.

En estos heterocigotos con translocación recíproca, el gen normal es inactivado menos frecuentemente a medida que aumenta la distancia entre su locus y el punto de unión del autósoma al cromosoma X; por ello como se aprecia en la figura para los alelos 2+ y 2m, un locus autosomal translocado muy lejano del punto de unión de X podría no ser inactivado. (1+ gen normal dominante, 1m gen mutante recesivo, 2+ gen 2 normal dominante, 2m gen 2 mutante recesivo).

locado es heterocromatizado, el alelo dominante puede ser transcrito.

En tales heterocigotos con traslocación recíproca, el gen normal, es inactivado menos frecuentemente conforme aumenta la distancia entre su locus, y el punto de unión del autosoma al cromosoma X. Un locus autosomal traslocado muy lejos del punto de unión del X, podría no ser inactivado del todo. Entonces el efecto de extensión postulado, disminuye mientras más lejano se encuentre el locus autosomal de su conexión al X.

Otro caso conocido, es donde dos traslocaciones recíprocas X-autosoma, tenían puntos de ruptura casi idénticos en el autosoma. Una traslocación mostraba notas para un marcador autosómico cerca del punto de ruptura, pero la otra traslocación no las mostraba. Ya que los puntos de ruptura, probablemente diferían en ambos casos, la traslocación que falló para mostrar el efecto de posición, - podría haber unido el segmento autosomal a un segmento X, el cual fué incapaz - de inactivar un locus vecino. Si fué así, debería haber loci en el X que deberían estar normalmente sin supresión, y no mostrarían compensación de dosis. (Tomado de 23) De hecho hay evidencias que indican que existen áreas dentro del cromosoma X "inactivo" que no sufren inactivación; y que dieron lugar a la formulación de la hipótesis alternativa de Lyon.

#### HIPOTESIS ALTERNATIVA DE LA HIPOTESIS DE LYON

Aunque hay una gran cantidad de pruebas de que la compensación de dosis en los mamíferos se logra mediante la inactivación al azar de uno de los cromosomas

X, esto no puede representar toda la situación. De ser así, los individuos con números anormales de cromosomas X —tales como XXY, XO o XXX— serían por completo normales, puesto que todos los cromosomas X de una célula excepto uno, son inactivados formando cuerpos de cromatina. Pero debido a que las personas que tienen estas combinaciones de cromosomas no son enteramente normales, se ha sospechado lo siguiente:

1) Que el cromosoma X extra ( o faltante), provoca anomalías durante los primeros 12 días del desarrollo del embrión, antes de que ocurra la inactivación, o 2) De que parte, ( o partes) de un cromosoma X de los humanos no son inactivadas. Esta última posibilidad fué sugerida por el descubrimiento de que el brazo corto del cromosoma X de los humanos, no es heterocromático, por haberse encontrado que la pérdida de ese brazo corto, tiene consecuencias más severas que la pérdida del brazo largo. ( 23,37,40,65)

Así, pues, se debe considerar la posibilidad, de que no sea inactivado todo el cromosoma X.

De lo anterior se puede apreciar que el mecanismo verdadero para la compensación de dosis, en los mamíferos, todavía no se define por completo. Se han propuesto varias teorías para explicar la inactivación del cromosoma X, pero no hay evidencia experimental que las apoye. Estas hipótesis se pueden clasificar en dos grupos: aquellas que involucran unión al DNA de proteínas específicas, y aquellas que involucran modificación del DNA.(37)

A continuación, citaré algunas evidencias que apoyan la hipótesis alternativa de Lyon, o hipótesis de Russell.

#### EVIDENCIAS QUE APOYAN LA HIPOTESIS ALTERNATIVA DE LYON

Se ha reportado la existencia de varios loci-ligados a X que aparentemente no sufren compensación de dosis, Ciertamente los genes replicones deben ser funcionales en todos los cromosomas X presentes.

—En humanos los resultados obtenidos con insocromosomas X y Y han sugerido la hipótesis de que los genes son principalmente inactivados en un X de una mujer; son los del brazo largo de X ( $X^L$ ).

Los genes del brazo corto de X ( $X^S$ ) son aparentemente funcionales en doble dosis tanto en las hembras como en los machos ( $Y^L$ ; parece que porta alelos de genes en  $X^S$ ). Por ejemplo, el gen del grupo sanguíneo Xg, que mapea en  $X^S$ , no muestra compensación de dosis en cédulas de la sangre o de la piel. Cuando los genes en  $X^S$  son hemicigóticos (en una hembra que carece de un  $X^S$  o en un macho que carece de un  $Y^L$ ), se produce el síndrome de Turner. La inactivación de sólo parte del X podría ser uno de los varios factores responsables de las diferencias fenotípicas entre XX y XO, o entre XXY y XY. (23 65,40)

—La incorporación de uridina radioactiva al RNA en la región del cuerpo de Barr de fibroblastos femeninos, corresponde a un 18% de la cantidad incorporada por un volumen similar de una región de cromosoma X. Se ha pensado, por ese 18% de actividad encontrado en el cuerpo de Barr, que la compensación de —

dosis parece afectar un gran segmento de X, pero no el cromosoma completo. (23).

-El locus ligado a X de la sulfatasa esteroide microsomal (STS) escapa de la inactivación del cromosoma X en humanos. El locus STS, se encuentra en la mitad distal del brazo corto del cromosoma X; y se encuentra ligado al locus Xg a una distancia genética de 10 centigramos. (37)

-Como apoyo a la hipótesis de que la inactivación de X no afecta al cromosoma X completo, también tenemos evidencia de algunos loci en X que escapan de la inactivación; y que tienen funciones inmunoregulatorias. De esta manera, las hembras con dos copias de estos genes, poseen una inmunocompetencia superior a la de los machos.

ALGUNOS LOCI DEL CROMOSOMA -X " INACTIVO" QUE NO SUFREN INACTIVACION ACTUAN SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Como ya se mencionó anteriormente, existen evidencias que sugieren que algunas porciones del cromosoma X "inactivo", pueden no estar inactivadas. Algunas de estas regiones que no sufren inactivación, contienen genes que tienen funciones relacionadas con el sistema inmune; entre las cuales citaré las siguientes:

a) En un estudio, en el cual se analizó la función de las células B, de una paciente con niveles séricos de inmunoglobulinas bajas y con una delección

intersticial en el brazo corto de uno de sus cromosomas X; (del Xp), se encontró que la falta de activación normal de las células B, es debida a un defecto intrínseco de las células B; pues las células B de las pacientes con IgA, IgM, ni IgG del (Xp) no fueron capaces de secretar inmunoglobulinas en presencia de células T-cooperadoras normales. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la producción de anticuerpo está al menos parcialmente controlada por genes localizados en el brazo corto del cromosoma X. El locus genético que afecta la producción de Igs puede ser asignado a la región pter-p32: p11-qter del cromosoma X humano. (16)

b) El cromosoma X del ratón CBA/N contiene el gen *xid* (X-chromosome-linked immunodeficiency gen), el cual es responsable de varios defectos inmunes, incluyendo: bajos niveles séricos de IgM, ausencia de respuesta a los antígenos timo-independientes tipo 2, y ausencia de un subconjunto de células B de maduración tardía. Se ha demostrado que el gen *xid* aminara la enfermedad autoinmune de ratones congénicos NZB (NZBxNZW) F<sub>1</sub>. Se ha reportado también, que el gen *xid* tiene un profundo efecto protector sobre la enfermedad, anomalías inmunes y aberraciones celulares en las enfermedades autoinmunes asociadas al cromosoma X de ratones machos BXSB y (BXSB) F<sub>1</sub>. (2,52)

c) La ocurrencia de cinco inmunodeficiencias recesivas ligadas a X en humanos, demuestra que un número substancial de genes inmunoreguladores se encuentran en el cromosoma X (18,44) El ratón CBA/N padece de una inmunodefici-

ciencia recesiva ligada a X, (44).

c) La ocurrencia de cinco inmunodeficiencias recesivas ligadas a X en humanos, demuestra que un número substancial de genes inmunoreguladores se encuentran en el cromosoma X (18,44). El ratón CBA/N padece de una inmunodeficiencia recesiva ligada a X, (44).

d) Se ha demostrado, que en ratones, la respuesta de anticuerpos al DNA, está controlada por un gen ligado a X. (38)

e) Los niveles séricos totales de IgM, se encuentran relacionados con el número de cromosomas X presentes en humanos, por esto cree (8,22) que existe un gen ligado a X que regula la concentración de IgM.

f) Existe evidencia de que en ratones, un gen ligado a X regula la respuesta de IgM contra antígenos timo-independientes. (2,50,41,58)

g) Zeicher et. al. han identificado un nuevo sistema de aloantígenos polimórficos, controlado por loci en el cromosoma X, usando antisueros de ratones híbridos que difirieron en su cromosoma X. (27)

h) Se ha reportado, que en las placas de Peyer de ratones con inmunodeficiencia ligada a X (xid) existe una subpoblación de células B maduras. En un estudio reciente, se encontró que las células de placas de Peyer de ratones xid inmunizados por vía oral con el antígeno T-dependiente SRBC, tienen respuestas PFC de IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> y una alta respuesta de IgA anti SRBC. En ratones xid inmunizados con SRBC, por vía oral y por inyección, se han detectado anticuerpos IgA tanto en suero como en secreciones; sin embargo la magnitud de la respuesta anti-SRBC fue menor en los ratones xid que en los normales tratados similarmente. Estos estudios, indican también que el tejido linfo-reticular asociado al intestino tanto de ratones xid como de los normales, posee poblaciones únicas de células T que mantienen "in vitro" respuestas en cultivos de células B xid de bazo o de placas de Peyer, que dirigen a las poblaciones de células B maduras presentes a que produzcan respuestas de IgA isotipo-específico. De lo anterior, podemos apreciar que en los ratones con inmunodeficiencia ligada a X (xid), el sistema inmune secretor funciona normalmente. (30)

- OBJETIVO . 1- RESUMEN DE ANTECEDENTES:

De los antecedentes mencionados a lo largo de la introducción, podemos distinguir cinco aspectos principales para resumir la información referente al estudio del sistema inmune en relación al sexo:

1.- Se ha determinado que existen diferencias entre machos y hembras, en cuanto a la concentración total sérica de IgM. Por otro lado, aún existe controversia sobre si existe o no influencia del sexo en los niveles séricos de IgG. Respecto a los niveles séricos de IgA, no se han reportado variaciones significativas entre ambos sexos.

2.- Se ha reportado que la respuesta inmune contra antígenos timo-dependientes y la respuesta de IgM contra antígenos timo-independientes, es significativamente mayor en las hembras que en los machos.

3.- Los estudios celulares han revelado que la inmunidad celular es superior en las hembras que en los machos.

Se ha estudiado también la influencia de las hormonas sexuales esteroides sobre el sistema inmune; y se ha encontrado que las hormonas femeninas apoyan las respuestas inmunes específicas humorales (producción de anticuerpos) y celulares, mientras que las hormonas masculinas suprimen tales respuestas.

5.- Existen evidencias que indican que el cromosoma X de las hembras "inactivo" tiene regiones que escapan de la compensación de dosis. Algunas de éstas regiones de X, poseen genes con funciones inmunoreguladoras que confieren ventajas biológicas a las hembras.

---

## 2- JUSTIFICACION:

Analizando los antecedentes, encontramos que no existen reportes en los que se haya comparado la respuesta específica de IgA, IgM e IgG entre machos y hembras, utilizando como inmunógenos antígenos T-dependientes de limitada complejidad estructural conjugados a un grupo hapteno; y además cuantificandose la respuesta específica de cada clase de anticuerpo por medio de un método con alta sensibilidad. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue ampliar éste aspecto del sistema inmune en relación al sexo; es decir, se estudió en especial la variación de la respuesta inmune específica de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG entre ratas machos y hembras, inmunizadas con conjugados DNPacarreador simples y complejos, por medio de un ELISA.

## 3- HIPOTESIS:

Si en las ratas existe influencia del sexo en la respuesta inmune específica de IgA, IgM e IgG, entonces encontraremos diferencias significativas entre machos y hembras en la respuesta específica de la clase de Inmunoglobulina que reciba tal influencia.

Con el objeto de probar la hipótesis planteada, se siguió el siguiente plan de trabajo:

1) Primero se determinó por medio de un ELISA indirecto la respuesta de anticuerpos IgA, IgM e IgG anti DNP, en ratas machos y hembras de las cepas endogámicas Sprague-Dawley y Long-Evans, inmunizadas con el conjugado DNP-acarreador DNP-Lisozi<sup>ma</sup>. Como podrá verse más adelante, se encontró que: a) La respuesta de IgM variaba significativamente entre machos y hembras, en ambas cepas; b) La respuesta de IgA sólo mostró variación debida al sexo en las ratas Sprague-Dawley; y c) La respuesta de IgG no recibía influencia del sexo. Por otro lado, también se encontró que existían diferencias significativas entre las ratas Long-Evans y Sprague-Dawley en la <sup>la magnitud de</sup> respuesta específica de IgA e IgM, hacia DNP-LIS.

2) En base a éstas observaciones se decidió estudiar la variación de la respuesta

inmune debida al sexo en ratas Long-Evans, utilizando otros antigenos T-dependientes ( DNP-Cit-c y DNP-OVA) conjugados y otro grupo de ratas LE inmunizadas con DNP-LIS.

3) tambien se determinó la respuesta inmune especifica, de las clases de anticuerpos mencionadas, en ratas hibridas ( Sprague-DawleyxLong-Evans) F<sub>1</sub> - inmunizadas con DNP-LIS, para averiguar si la alta respuesta especifica hacia DNP-LIS de IgA e IgM encontrada en las ratas Long-Evans, se transmitia de manera dominante o recesiva, sobre la respuesta intermedia a DNP-LIS mostrada por la cepa Sprague-Dawley.

Y por ultimo se probaron otros antigenos T-dependientes conjugados a DNP, para comparar en los hibridos la respuesta especifica de IgA, IgM e IgG entre machos y hembras; estos antigenos fueron: DNP-OVA, DNP Cit-c y DNP-GAT. Tambien se utilizó DNP-TGAL como antígeno control de los hibridos, el cual no responde ninguna de las cepas paternas.

## M A T E R I A L

Y

## M E T O D O S

- I. PURIFICACION DE ANTISUEROS.
- II. INMUNOADSORBENTES.
- III. PURIFICACION DE ANTISUEROS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.
- IV. INMUNODIFUSION.
- V. ANIMALES.
- VI. ANTIGENOS.
- VII. INMUNIZACION.
- VIII. ELISA.
- IX. PREPARACION DE CONJUGADOS ENZIMA-ANTIGLOBULINA.

## Material y Métodos .

### I. Purificación de antisueros.

La IgG de conejo anti IgG de rata y la IgG de conejo anti IgM de rata menos específicas fueron obtenidas por el Dr. Campos mediante el siguiente procedimiento: ( Tomado de 9)

a) El suero de conejo anti IgG de rata, fue obtenido por inmunizaciones con una fracción de IgG de rata purificada por una columna de proteína A sefarosa 4B. El suero anti IgG de rata homogéneo monoespecífico, se obtuvo absorbiendo en una columna de Fab' Seфарosa. La IgG se obtuvo por filtración en una columna de proteína A sefarosa 4B.

b) El suero de conejo anti IgM, se obtuvo por inmunización con IgM de mieloma de rata; y doble absorción en una columna de Fab' Seфарosa, y con suero normal de rata, en una relación 1:100. Para obtener la IgG se absorbió el suero anti IgM homogéneo en una columna de proteína A Seфарosa.

c) El suero de conejo anti IgA de rata fue obtenido mediante inmunizaciones con IgA de mieloma de rata, por el Dr. Campos. Para obtener la IgG anti IgA de rata monoespecífica, se procedió de la siguiente manera: Primero se absorbió el suero anti IgA con suero normal de rata, en una relación de 1:10; después se obtuvo la IgG por filtración en una columna de proteína A Seфарosa; posteriormente, esta IgG se absorbió en una columna de IgG de rata sefarosa; después se absorbió en una columna de gamaglobulinas de rata glutaraldehído; y por último

PURIFICACION DE IgG DE CONEJO ANTI IgA DE RATA MONOESPECIFICA.

CLAVES:

- 1.- (a-IgA<sub>1</sub>) = Suero de conejo anti IgA de rata adsorbido en suero normal.
- 2.- (a-IgA<sub>2</sub>) = (a-IgA<sub>1</sub>) adsorbido en IgG de rata.
- 3.- (a-IgA<sub>3</sub>) = (a-IgA<sub>2</sub>) adsorbido por 2a vez en IgG de rata.
- 4.- (a-IgA<sub>4</sub>) = (a-IgA<sub>3</sub>) adsorbido en gammaglobulinas de rata.

Fig "A":

- 1 = Suero Normal de Rata (SNR)
- 2 = Suero de conejo anti IgA de Rata adsorbido en suero normal ( a-IgA<sub>1</sub>)
- 3 = (a-IgA<sub>2</sub>)
- 4 = IgG de conejo anti IgG de rata (a-IgG)
- 5 = (a-IgA<sub>3</sub>)

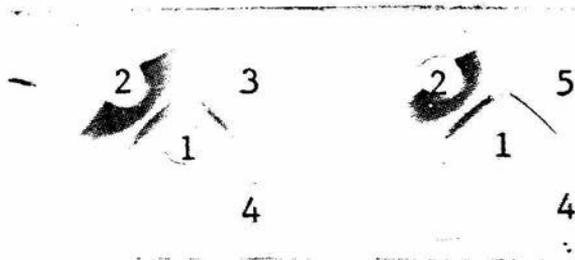


Fig "B" :

- 1 = SNR
- 2 = (a-IgA<sub>2</sub>)
- 3 = (a-IgA<sub>4</sub>)
- 4 = (a-IgG)
- 5 = (a-IgA<sub>3</sub>)
- 6 = (a-IgA<sub>3</sub>)

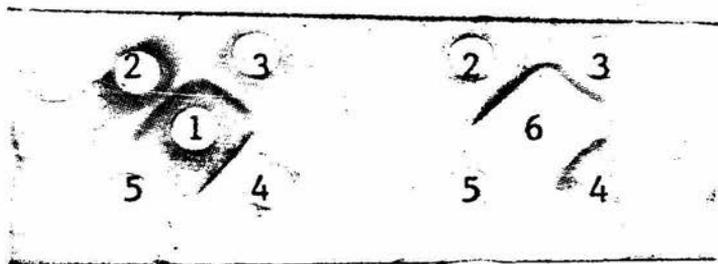


Fig "C" :

1 = SNR

2 = (a-IgA<sub>1</sub>)

3 = (a-IgA<sub>2</sub>)

4 = (a-IgA<sub>3</sub>)

5 = (a-IgA<sub>4</sub>)

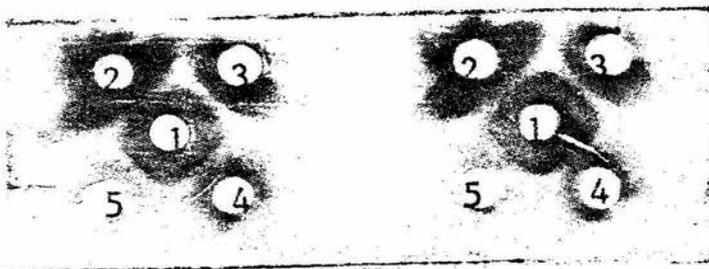


Fig "D" :

- En los 5 pozos circulares se colocó SNR

- En las ranuras horizontales se colocaron (de arriba hacia abajo) :

1.- anti IgA<sub>1</sub>

2.- anti IgA<sub>2</sub>

3.- anti IgA<sub>3</sub>

4.- anti IgA<sub>4</sub>

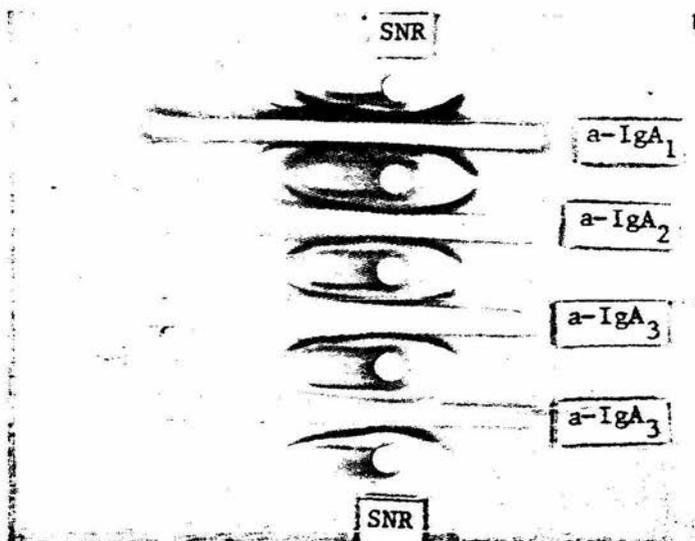


Fig "E" :

-En los pozos ciculares se colocó SNR.

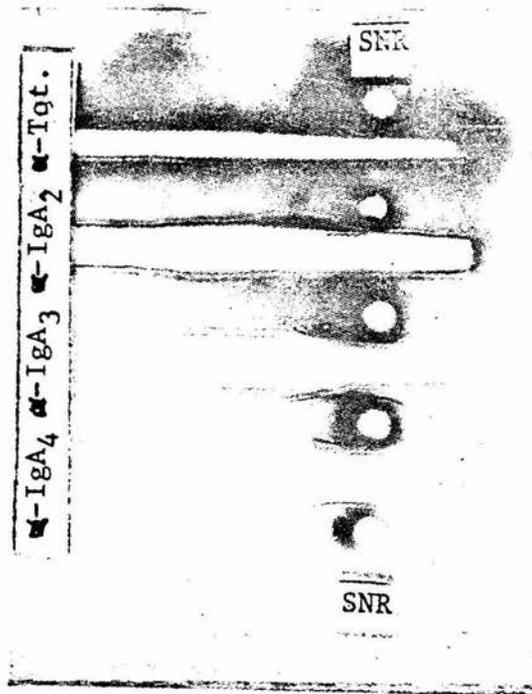
-En las ranuras horizontales se colocó (de arriba hacia abajo) :

1.- Suero de conejo anti suero total de rata (a-Tot) .

2.- anti IgA<sub>2</sub>

3.- anti IgA<sub>3</sub>

4.- anti IgA<sub>4</sub> = anti IgA de rata monoespecífica.



se absorbió en una columna de Fab'-Sefarosa.

Las fracciones de IgG menos específica obtenidas de los sueros de conejo anti IgA, IgM e IgG; se conjugaron a peroxidasa, (siguiendo el procedimiento que se describe más adelante). Posteriormente estos conjugados enzima-anti-globulina, se utilizan en el ELISA, para determinar concentraciones de anticuerpos IgG, IgM e IgA anti DNP de los sueros de las ratas problema, utilizadas en este proyecto.

d) La fracción de gamaglobulinas anti-DNP que se usó para formar la curva de anticuerpos anti DNP, utilizada en los ensayos de ELISA para determinar la concentración de anticuerpos anti-DNP, de los sueros problema; se obtuvo absorbiendo suero de rata anti DNP, en una columna de DNP-KLH-sefarosa.

La monoespecificidad de los anticuerpos purificados por los procedimientos descritos anteriormente, se confirmó mediante doble inmunodifusión radial e inmunoelectroforesis. (10,28)

## II. Inmunoabsorbentes.

Parath introdujo el uso de la sefarosa para preparar conjugados proteicos insolubles. Estas preparaciones son útiles para la purificación de anticuerpos que se unen específicamente al conjugado antígeno-sefarosa. Por otra parte los anticuerpos también pueden conjugarse a la sefarosa, y el absorbente obtenido puede utilizarse para la separación del antígeno respectivo.

-Preparación de columnas inmunoabsorbentes.

### A) Acoplamiento de proteínas a sefarosa.

La CH-Sepharosa 4B y la AH-Sepharosa 4B, son sefarosas con un brazo espaciador de 6 carbonos al cual se une el ligando, facilitando la unión con la

proteína por absorber. Los ligandos se unen mediante carbodimida, a través de enlace peptídico o amida.

La  $\text{CH}$ -Sefarosa 4B tiene grupos carboxilo libres y la  $\text{AH}$ -Sefarosa 4B, tiene grupos amino libres. El brazo espaciador es importante para ligandos pequeños - con múltiples subunidades, y para proteínas de muy alto peso molecular. (9)

- Preparación de Inmunoabsorbentes de proteína acoplada a Sefarosa 4B:

1. Un gramo de polvo de  $\text{AH}$ -Sefarosa 4B activada se hincha en  $\text{NaCl}$  0.5 M, formando 4ml de gel.
2. El gel hinchado se lava con 200ml/gr de  $\text{NaCl}$  0.5 M.
3. Después se lava el gel con agua destilada pH 4.5 (50ml/gr).
4. Para unir los ligandos se utiliza Carbodimida, (1 etil-3-dimetilaminopropil carbodimida) EDC; ó ciclo hexil-3-(2-morfilinoetil) carbodimida.

-El EDC se disuelve en solución de acoplamiento, agua destilada pH 4.5. La concentración debe ser 10-100 veces mas alta que la de los grupos espaciadores; 6-10  $\mu\text{moles/ml}$  de gel hinchado de  $\text{AH}$ -Sefarosa 4B, y 10-000  $\mu\text{moles/ml}$  de gel hinchado de  $\text{CH}$ -Sefarosa 4B.

En general se usan 10mg de EDC por mililitro de gel hinchado.

4. El acoplamiento se lleva a cabo pH ácido (agua pH 4.5); pero hay que ajustar el pH con  $\text{NaOH}$  .1M una hora después del acoplamiento, a pH de 4.5.6.
6. El ligando ( 4mg de proteína) se disuelve en agua pH 4.5 ( 1 ml).
7. Se deja asentar el gel de sefarosa lavada y se elimina el sobrenadante de agua pH 4.5.
8. Se mezcla en 1 ml de agua pH 4.5 la proteína, con los 10 mg. de carbodimi

da con una pipeta Pasteur, y se añade inmediatamente al gel de sefarosa.

9. Se deja la mezcla durante la noche en agitacion lenta.

10. Se bloquean los grupos libres de la sefarosa; se utiliza ácido acético .1M para la A+Sefarosa-4B, y glucosamina o etanolanimo, para la C+Sefarosa-4B.

11. Se lava el inmunoabsorbente con solución de acoplamiento, hasta que el sobrenadante de una lectura de absorbancia a 280nm de 0.0.

12. Se empaca el gel en una jeringa de 10ml, a la cual se le coloca previamente en la punta pelo de angel esterilizado, para evitar la salida del gel.

13. La columna inmunoabsorbente se lava con PBS y se almacena a 4°C con PBS con azida de sodio.

8) Insolubilizacion de proteinas con Glutaraldehido y su uso como inmunoabsorbentes.(9)

El uso de inmunoabsorbetes ha resuelto el problema que se presenta frecuentemente, cuando se requiere purificar antigenos o anticuerpos, que se encuentran mezclados con otros componentes. Una forma de prepararlos cuando el antigeno es de constitucion proteica, es insolubilizandolo con glutaraldehido.

La proteina mezclada con glutaraldehido, es un gel que es soluble en NaOH 1N, en agua, en urea, en Dodecilsulfato de sodio, y en HCl 2 N.

La proporcion de glutaraldehido-proteina que se utiliza para el gel es 10mg-100mg. Como puede apreciarse este tipo de inmunoabsorbente requiere de una

cantidad de proteína mucho mayor a la requerida para la preparación de inmunosorbentes de sefarosa.

-Procedimiento:

- 1.-Material.- Rojo de Fenol, Regulador Glicina-HCl, PBS, Regulador de fosfatos, Glutaraldehído al 2.5% en H<sub>2</sub>O ( 10 ml.)
- 2.-Disolver 800 mg. de proteína en 16 ml de regulador de Fosfatos pH7.
3. Agregar gota a gota 2.0 ml de solución de glutaraldehído agitando.
4. Refrigerar durante toda la noche para lograr la gelificación completa.
5. Agregar Regulador de fosfatos y fraccionar el gel con ayuda de un homogenizador Potter ( de ajuste suave)
6. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. y leer D.O. a 280 nm.
- 7.- Repetir los pasos 4 y 5.
8. Suspender la proteína insoluble en 80 ml de Regulador glicina HCl pH 2.8.
9. Centrifugar a 3000 rpm 15 min y determinar la D.O del sobrenadante a 280 nm. Repetir los pasos 7 y 8 hasta que la D.O del sobrenadante sea igual a cero.
10. Suspender la proteína insoluble en 80 ml de PBS. Dejar sedimentar 30 minutos. Eliminar el sobrenadante para quitar partículas pequeñas. Repetir este paso.
11. Preparar la columna. Empacar la proteína insolubilizada en una jeringa con pelo de angel.

12. Guardar la columna a 4°C con PBS con Azida de sodio.

III. Purificación de antisueros por  **cromatografía de afinidad**, utilizando columnas inmunoabsorbentes. (9)

A continuación se describe el  **manejo de las columnas inmunoabsorbentes**, utilizadas para purificar antisueros  **monoespecíficos**. En general, se sigue el mismo procedimiento para usar las columnas de  **geles inmunoabsorbentes de sefa rosa-proteína**, y de  **glutaraldehído-proteína**.

Procedimiento:

1. La columna del gel inmunoabsorbente se lava con PBS; se utiliza un volumen 5 veces mayor que el volumen del gel.

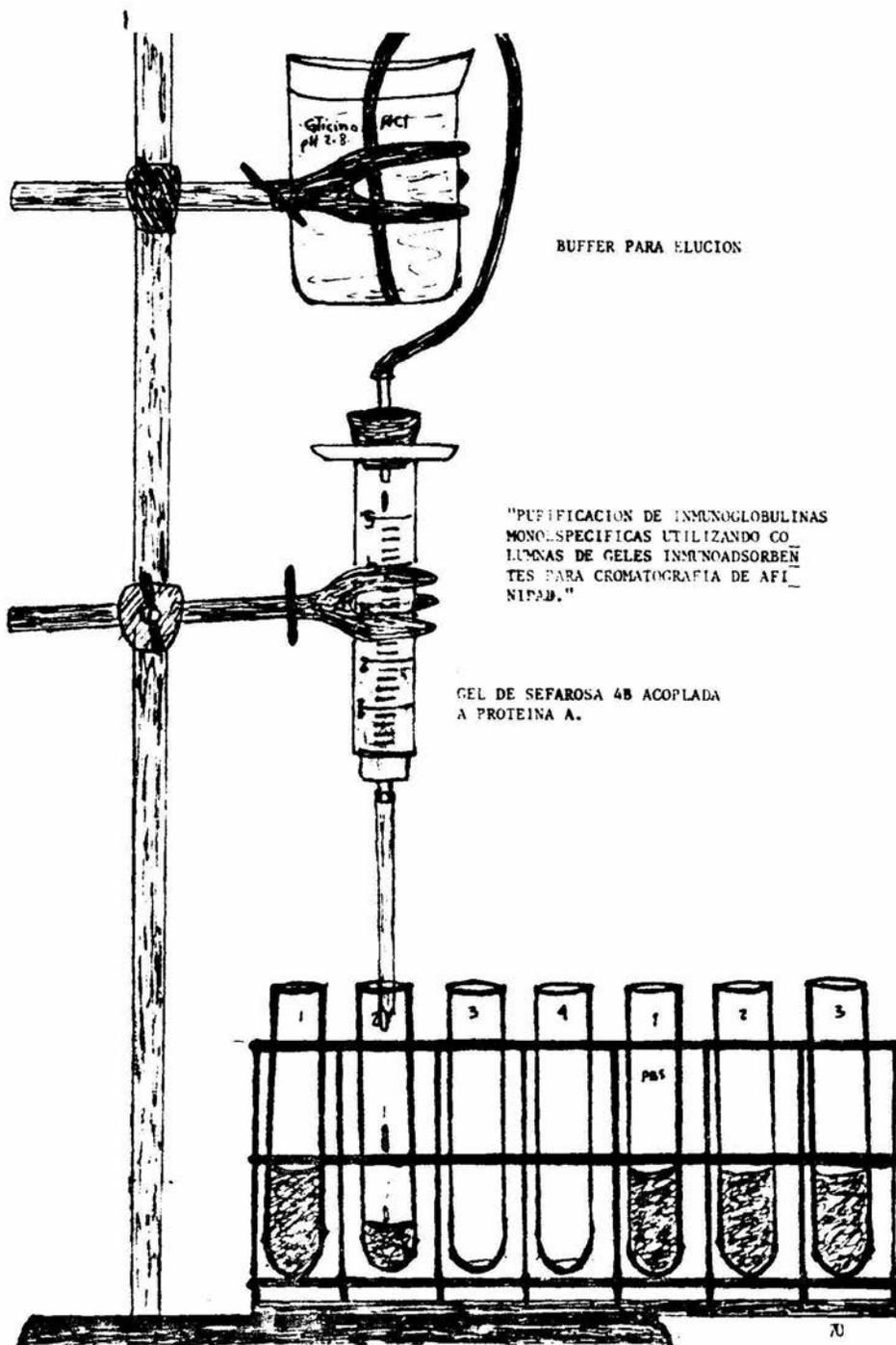
2.- Se pasa el suero que se desea purificar (  **aprox. 4 ml**) a través de la columna dos veces; se cierra la  **valvula de la columna**, y se deja el suero en contacto con el gel, por un espacio de  **30 min.**

3. Se colecta el suero absorbido, se lava  **la columna** con PBS hasta que la absorbancia a  **280 nm** de las fracciones  **colectadas** sea de  **U.O (cero)**.

4. Se pasa buffer Glicina-HCl pH  **2.8, (0.2M)** a través de la columna; para eluir las fracciones fijadas al  **inmunoabsorbente**.

Se colectan fracciones de  **1ml aproximadamente**, en tubos con trizma base (es conveniente checar el pH de las fracciones para evitar la precipitación de  **inmunoglobulinas**) para neutralizar el  **pH ácido del regulador glicina-HCl**,

Se continúa eluyendo hasta que la  **Abs 280 nm** de las fracciones sea igual a



BUFFER PARA ELUCION

"PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS MONOSPECIFICAS UTILIZANDO COLUMNAS DE GELES INMUNOADSORBENTES PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD."

GEL DE SEFAROSA 4B ACOPLADA A PROTEINA A.

cero.

5. Por ultimo se lava con PBS la columna, y se guarda a 4°C con PBS con azida de sodio.

6. Se seleccionan las fracciones mas concentradas; tanto las absorbidas — " no fijadas", como las eluidas con glicina-HCl " fijadas", y se prueba su inmunoespecificidad por medio de doble inmunodifusión radial, la especificidad de las fracciones se debe comparar con la del suero antes de absorberse. Las fracciones cuya concentracion de proteina fue muy baja, y no dieron banda de inmunoprecipitacion de las placas de Ouchterlony, se concentraron filtrandolas en un Amicon, utilizando una membrana XM100, a una presión de nitrógeno de 2 libras/cm<sup>2</sup>.

7. Las fracciones absorbidas se congelan para utilizarse posteriormente, pero las fracciones eluidas con Flicina-HCl se dializan contra PBS, y después se congelan.

#### IV. Inmunodifusión en geles de agarosa.

Durante el proceso de gelación del agar se forma una estructura micelar, las moléculas con un peso molecular por debajo de 200000 pueden pasar con relativa libertad a través de las micelas; pero las de mayor tamaño, como las de fibrinógeno,  $\alpha$ -2-macroglobulina, e IgM-globulina, son retardadas por la fricción entre la superficie de las moléculas proteínicas y los canales de las micelas.

Los inmunoprecipitados formados entre **antígenos** y anticuerpos durante la fase de inmunodifusión, son generalmente **de un tamaño** molecular mayor de 200 000 y no pueden difundir más allá o **ser lavados** del gel una vez que se han formado. Por otro lado, los **antígenos** y anticuerpos sin reaccionar, si tienen un peso molecular más abajo de **200 000**, pueden ser fácilmente lavados. Estas son las bases para la identificación de los inmunoprecipitados con tinciones para proteínas tanto en **inmunodifusión** como en inmunoelectroforesis. ( 10,28)

#### A. **Ouchterlony** Dobleinmunodifusión.

Este método involucra el uso de placas **de agar** con orificios para el **antígeno** y el anticuerpo. Los dos reaccionantes **difunden** en el gel, en donde se **forman** los inmunoprecipitados en los **puntos de equivalencia** para cada par de **antígeno-anticuerpo**. Cada precipitado **actúa** como una barrera inmune específica para el par respectivo de **reaccionantes** y **previene** su difusión de otros reaccionantes.

Se pueden emplear cajas de Petri o **portaobjetos** para hacer las placas de agar; los orificios de aplicación están **situados** ya sea alrededor de un orificio central, en triángulos o **cuadrángulos**, o a lo largo de un canal central. Este método es ampliamente usado **para el examen** de composición antigénica de muestras desconocidas, para la **evaluación** de la relación

antigénica entre diferentes antígenos, proteínicos, o como en el caso del presente trabajo; se aplicó para determinar la inmunoespecificidad de los anticuerpos purificados. El método también se usa en la evaluación semicuantitativa del título de uno de los reaccionantes comparado con concentraciones conocidas en los otros orificios.

Procedimiento:

Los geles se prepararon utilizando agarosa al 1.2% (p/v). El gel fué mezclado en NaCl al 0.85% (p/v), y disuelto por baño de agua en ebullición. El agar completamente fundido se vacía en porta objetos, desengrasados previamente con alcohol. Se colocan con ayuda de una pipeta, aproximadamente 2 ml de agar líquido para cubrir uniformemente cada laminilla. Después de que se ha endurecido el gel, se almacenan las placas a 4°C en una cámara húmeda hasta ser utilizadas.

El patrón de cortado para la inmunodifusión o inmunoelectroforésis se realizó con la ayuda de moldes y sacabocados.

Las soluciones de antígenos y de anticuerpos problema, se colocan en los orificios cortados utilizando capilares.

Después de colocadas las muestras se guardan las placas 24 hrs. a 4°C en una cámara húmeda para que se realice la inmunodifusión.

Después de transcurridas 24 horas, se observan las placas para ver si han aparecido bandas de precipitado. (10)

-Tinción de las placas:

1. Las placas son colocadas en NaCl 0.85% para lavar el exceso de proteínas que no formaron bandas de precipitado.
2. Repetir el paso 1 tres veces.
3. Se levantan las placas con agua destilada, y después se secan; colocándolas en papel filtro. Se pueden secar a temperatura ambiente o a 40°C.
4. Se despega el papel filtro de las placas de agar seco humedeciéndolas con agua destilada.
5. Para teñir las placas, se sumergen durante 10 minutos en colorante azul de Comassie-ácido acético.
6. Por último se enjuagan las placas teñidas, con decolorante alcohol-ácido acético.

#### B. Inmunolectroforésis.

Consiste de una combinación de electroforésis y de una inmunodifusión radial en geles. Está basada en el hecho de que en el gel de agar, los movimientos de las moléculas en un campo eléctrico son similares a los que ocurren en un medio líquido, con la ventaja de que la difusión libre durante y después de la electroforésis es disminuida. Los constituyentes de una mezcla, son pues definidos por su movilidad electroforética y por su especificidad antigénica en varias zonas. Se hace un canal longitudinal paralelo al eje mayor de la placa del gel; y éste se llena con antisuero, contra la mezcla antigénica.

Una doble difusión se lleva a cabo; el antisuero difunde en el gel, y los antígenos difunden radialmente en todas direcciones desde las zonas electroforéticas. Los antígenos encuentran finalmente a los anticuerpos, y se forman precipitados en los puntos de equivalencia; el número de precipitados formados, corresponde al número de antígenos independientes presentes.

La ventaja de la inmunoelectroforésis sobre la inmunodifusión, es que las mezclas complejas de antígenos pueden ser separadas por el poder adicional de resolución obtenido a través del paso electroforético. (10,28)

#### Procedimiento:

1. Para preparar los geles de agarosa para inmunoelectroforésis, se utilizó agarosa al 1.2% en amortiguador de Barbital (0.05 M) pH 8.4.

2. El patrón de corte se hace como se describe en la figura ( ).

Las láminas de vidrio, se marcan con ayuda de un lápiz diamante, se desengrasan y se cubren con 10 ml de agarosa fundida.

3. Las cámaras de ánodo y cátodo se llenan con amortiguador de Barbital.

4. Con papel filtro humedecido en amortiguador y colocado en ambos extremos de la lamina, se conecta la solución amortiguadora tanto en el ánodo como en el cátodo, con la superficie del agar.

5. La electroforésis se lleva a cabo por 30 min con una fuerza de 20 V/cm.

6. El secado y tinción de éstas placas se lleva a cabo del mismo modo que se describió para las placas de Ouchterlony.

## Y.- ANIMALES .

Se utilizaron grupos de 6 a 12 ratas, de 3 meses de edad, de cada sexo; para cada antígeno utilizado.

Se utilizaron ratas de las cepas endogámicas Long-Evans ( H-1<sup>M</sup>, Ag-B<sup>2</sup> ) y Sprague-Dawley ( H-1<sup>b</sup>, Ag-B<sup>6</sup> ); así como los híbridos ( Sprague-Dawley x Long-Evans ) : F<sub>1</sub> - resultado de la cruce de hembras Sprague-Dawley con un macho Long-Evans.

Primero se trabajó con ratas Long-Evans y Sprague-Dawley, machos y hembras, las cuales se inmunizaron con el conjugado DNP-LISOZIMA. Se comparó la respuesta específica de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG anti el grupo hapteno DNP; entre ambas cepas y entre machos y hembras de cada cepa.

Posteriormente, se utilizaron ratas híbridas (SDxLE)F<sub>1</sub> inmunizadas también con DNP-LIS. Comparándose la respuesta de éstos con la encontrada en las cepas paternas ; y comparando también la respuesta entre machos y hembras.

Simultáneamente, se inmunizaron también ratas híbridas (SDxLE)F<sub>1</sub> con los conjugados DNP-acarreador: DNP-TGAL, DNP-GAT, DNP-LISOZIMA, DNP-OVOALBUMINA y DNP-CITOCROMO-c.

Y por último se trabajó con ratas Long-Evans inmunizadas con los conjugados: DNP-OVA, DNP-Cit-c y nuevamente DNP-LIS.

---

Las proteínas y polipéptidos utilizados para la preparación de los conjugados DNP-acarreador fueron:

Ovoalbúmina	P.M. 43 500
Albúmina sérica bovina	67 000
Lisozima	17 000
Citocromo-c de corazón de paloma	13 000

Copolímero de L-Glutámico: L-Alanina:	
L-Tirosina, 60: 30 : 10 = (GAT)	107 000
Polímero ramificado de (L-tirosina:	
L-Glutámico) poli D,L- Alanina: poli-	
L-Lisina. = (T,G)- A--L .	240 000

---

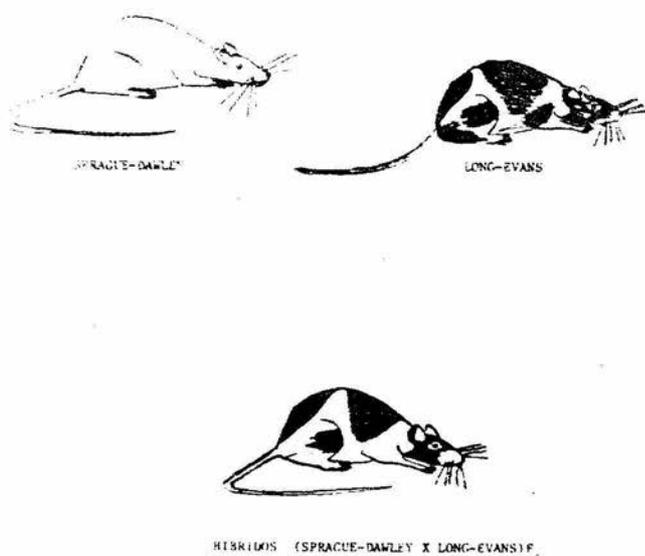


Fig.F. Diferentes tipos de ratas utilizados en este trabajo. Arriba a la derecha se observa una rata de la cepa Long-Evans ( $H-1^W$ ,  $Ag-B^Z$ ); a la izquierda vemos una rata de la cepa endogámica Sprague-Dawley ( $H-1^b$ ,  $Ag-B^b$ ); y abajo se aprecia una rata híbrida ( $SD \times LE$ )<sub>F1</sub> - resultado de la cruce entre un macho LE y varias hembras SD.

## VI. ANTIGENOS: CONJUGADOS HAPTENO-ACARREADOR.

Se ha observado que mientras más complejo es el antígeno, se encuentran involucrados más genes en la regulación de la respuesta inmune. La complejidad antigénica puede simplificarse por la administración de dosis limitadas de antígenos (en cuyo caso sólo los determinantes antigénicos más fuertes son reconocidos), o por la conjugación de la proteína con grupos hapténicos tales como el 2,4-dinitrofenil (DNP).

El uso de proteínas a las cuales se unen pequeños grupos químicos (haptenos), fue introducido por Landsteiner et.al. . Estos autores usaron un número de aminoácidos aromáticos acoplados a pH alcalino a cadenas laterales de tirosina, histidina o lisina, de moléculas de proteína inmunogénicas por medio de enlaces diazo. Las moléculas de proteína se denominaron acarreadores. (Tomado de 5).

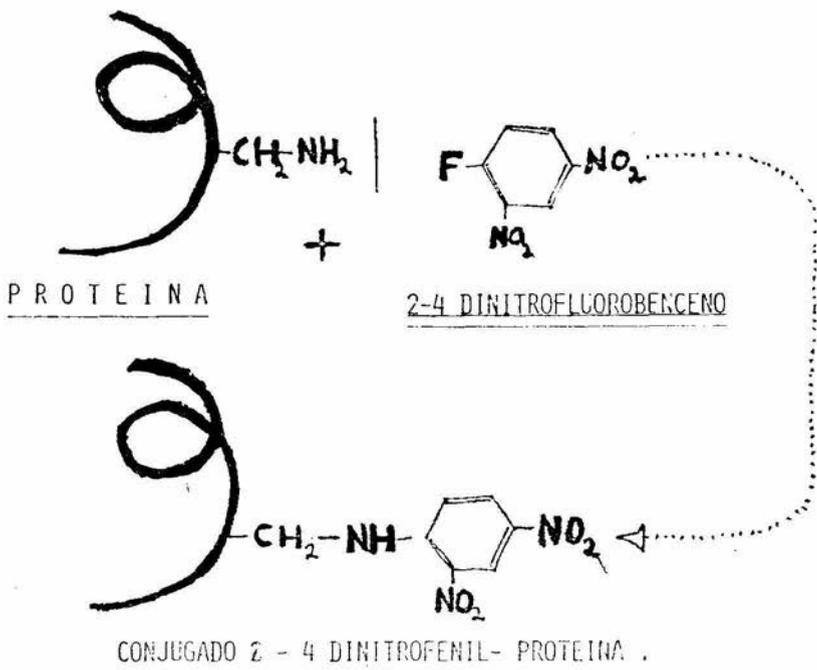
Por medio de la conjugación de grupos químicos conocidos a moléculas de proteína, fue posible el estudio de la respuesta inmune dirigida a grupos químicos bien definidos.

La inmunización con conjugados hapteno-proteína resulta en la producción de una población heterogénea de moléculas de anticuerpo ; se producen dos conjuntos mayores de anticuerpo: 1) Aquellos específicos para el hapteno y 2) Aquellos específicos para la proteína; y en algunas circunstancias se produce un conjunto menor de anticuerpos dirigido a la región de enlace entre la proteína acarreadora y el hapteno.

La reacción del conjugado hapteno acarreador en términos celulares, es un ejemplo de la colaboración de células B y T. En la mayoría de los casos, los haptenos son los determinantes reconocidos por las células B (bajo condiciones experimentales de ensayo); mientras que el acarreador posee determinantes adicionales reconocidos por las células T, y son en gran parte responsables de la inmunogenicidad selectiva de los antígenos Tímido-dependientes. 5.

Conjugados DNP-acarreador: Las proteínas dinitrofeniladas se han usado como antígenos para estudiar muchos aspectos de la respuesta inmune. Cuando el grado de conjugación del hapteno es bajo, los anticuerpos son dirigidos contra los determinantes antigénicos, tanto

del hapteno, como del acarreador. Por el contrario, las proteínas altamente dinitrofeniladas forman únicamente anticuerpos anti DNP. Las proteínas altamente dinitrofeniladas son procesadas por los macrófagos de diferente manera a las poco dinitrofeniladas.



PREPARACION DE CONJUGADOS HAPTENO-ACARREADOR.

## VI. ANTIGENOS

Se utilizaron como antígenos conjugados de DNP-acarreador:

DNP-ovoalbúmina, DNP-lisozima, DNP-GAT y DNP-(T,G)-A-L. También se preparó DNP-Albúmina sérica bovina, el cual se utilizó en el ELISA para recubrir las placas. Los conjugados fueron preparados utilizando 2,4-dinitrobenzeno sulfonato (Eastman Kodak) (L-glutámico<sup>60</sup>, L-alamina<sup>30</sup>, L-tirosina<sup>10</sup>) y ovoalbúmina, Citocromo-c de paloma, lisozima, GAT; (T,G)-A-L y Albúmina sérica bovina; (SIGMA). (poli Tir,Glu)-poli-Dl-Ala-poli-Lis)

Utilizando el procedimiento de Eisen, se prepararon los conjugados — DNP<sub>42</sub>-ASB, DNP<sub>4</sub>-LIS. DNP<sub>3</sub>-Cit-c y DNP<sub>10</sub>-TGAL. Y según el procedimiento de Mazié et. al. se obtuvo el DNP<sub>3</sub>-GAT. Más adelante se describirán ambos procedimientos, así como el cálculo del número de moléculas de DNP por molécula de acarreador. (15,34).

## PREPARACION DE CONJUGADOS DNP-ACARREADOR

### A. Difinitrofenilación I

Material. Bicarbonato de sodio 1 M pH8.2; 2,4- Dinitrofluorobenceno PM 186 l (Sigma); 100 mg de acarreador.

Método de alta sustitución.

1. Se disuelven 100 mg de proteína en  $\text{NaHCO}_3$  1M; (10mg/ml).
2. Se agrega en 0.5 ml. 100 mg de DNFB.
3. Se mezcla vigorosamente durante 45 minutos a 37°C.
4. Se separa el conjugado DNP-proteína, del DNFB libre, mediante dialisis exhaustiva contra agua destilada; o filtrando por Sphadex G-25 o G-50.
5. Determinar el número de grupos DNP por molécula de proteína, mediante la conversión: DNP a 36nm D.O.= 1.0; que equivale a 0.067 mM de DNP. mientras que KLH a 278nm, D.C.=1.0; equivale a 0.00018 mM de KLH.

La presencia de grupos dinitrofenilo en la proteína, explica aproximadamente el 40% de la absorbancia a 28 nm.

Para determinar la concentración de DNP en moles, se utiliza la fórmula:  $A_{360\text{nm}}/a_{360} = \text{No. de DNP}$ ; donde el Número de DNP por molécula de proteínas se calcula de la D.O a 360 nm del DNP, y de la concentración total de proteína calculada por Kjeldahl o por peso seco invacuo.

Para propósitos de cálculo, se asume que:

10. La  $\epsilon$ asm del residuo DNP-lisil a 360 nm, es semejante a la de  $\epsilon$ -DNP-lis. o sea 17 300 a pH 7.4.
20. El peso molecular del conjugado es el mismo, como el de la proteína sola.

#### B- Dinitrofenilación II.

Procedimiento.

1. Se pesa el mismo peso de  $K_2CO_3$  o de  $Na_2CO_3$  y de proteína. Se disuelven en agua a una concentración final de 20 mg/ml.
2. Se agrega un peso igual al de la proteína de DNBS ( sal sódica de dinitro bencensulfonato) ó de DNFB.
3. Se agita 24 hr s. a temperatura ambiente protegiéndose de la luz.
4. Se separa el 2,4- dinitrofenol y el DNBS no unido, por dialisis contra agua ó filtrando en Sephadex G-25 ó por Dowex LX8.
5. Se calcula el No. de grupos DNP por molécula de conjugado, de la siguiente manera: Ej. Conjugando DNP-globulina.

D.O. del conjugado 290 nm = 0.719

360 nm = 0.351

D.O. a 290nm debida a DNP = 0.064

debida a proteína = 0.655

Concentración de proteína calculada por D.O.:

D.O. 280nm/asm de globulina =  $0.655/9.7 \times 10^{-3} = 67.5 \text{ ugN/ml}$

Concentración de proteína en moles/litro  $\times 10^5$ :

$$3.65 \text{ ug/ml} = 3.65 \times 10^{-3} \text{ g/l}$$

$$\frac{3.65 \times 10^{-3} \text{ g/l}}{180} = \frac{2.02 \times 10^{-5} \text{ moles}}{}$$

Por último el No. de grupos DNP por molécula de proteína:

$$\text{Moles DNP/ Moles de proteína} = 2.02 / 0.27 = \underline{7.8} \quad \begin{array}{l} \text{No. de DNP} \\ \text{por molécula.} \end{array}$$

---

PREPARACION DEL CONJUGADO DNP<sub>3</sub>-GAT .

C- Dinitrofenilación III.

- 1.- Se disuelven 100 mg de GAT en 5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 %.
  - 2.- Se agrega lentamente con agitación vigorosa, 0.5 ml de 2,4-DNFB ( 100 µl de 2,4-dinitrofluorobenceno en 10 ml de 1,4-dioxano ).
  - 3.- La mezcla se deja reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación vigorosa; y en oscuridad.
  - 4.- Dializar el conjugado contra Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5 %, para eliminar el 2,4-DNFB libre.
  - 5.- Calcular el número de moléculas de DNP por molécula de GAT.
-

## VII INMUNIZACION:

Se inmunizaron con cada antígeno utilizado, grupos de 6 a 12 ratas de cada sexo, de 3 meses de edad; siguiendo el siguiente esquema de inmunización:

Se aplicaron dos inoculaciones por vía intraperitoneal, consistiendo cada una de 100 mg de antígeno. La primera inyección, se aplicó con adjuvante completo de Freund 1: 1 en un volumen de 200 ml. Dos semanas después se aplicó la segunda dosis de antígeno, en solución salina.

Las ratas fueron sangradas 7 días después de la segunda inmunización por punción intracardiaca, anestesiándolas con éter. (27)

---

Los sueros de las ratas inmunizadas y controles, se descomplementaron incubándolos a 56°C por 30 min; (27) y posteriormente se ensayaron por medio de un ELISA indirecto, para cuantificación de anticuerpos; con el cual se determinó la concentración de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG - específicos anti el grupo hapteno DNP.

---

INMUNIZACION DE LAS RATAS  
POR VIA INTRAPERITONEAL



Fig. G. Esquema de la inmunización intraperitoneal.

SANGRADO DE LAS RATAS POR  
PUNCIÓN INTRACARDIACA.

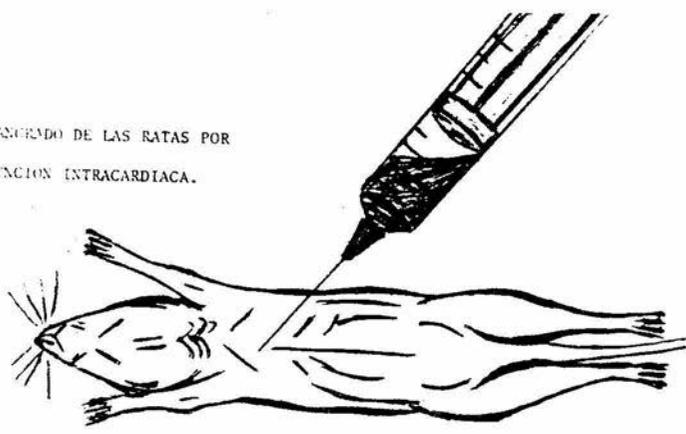


Fig. H. Esquema del sangrado de las ratas.

## VIII-ELISA

### Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

En el ensayo de ELISA, se combina el uso de anticuerpos ó antígenos inmobilizados en una fase sólida, con conjugados de anticuerpo o antígeno marcados con enzimas; para producir ensayos con la sensibilidad y especificidad de las técnicas isotópicas. Las ventajas del ELISA son que los reactivos son seguros, tienen vida larga, y puede usarse equipo simple; aunque también puede usarse automatización sofisticada. Como en cualquier inmunoensayo, la calidad del anticuerpo y antígeno, determina su ejecución, pero en el ELISA, la elección de la fase sólida y la calidad de los conjugados- enzima, asumen importancia comparable.

En la ELISA, se une a la fase sólida el antígeno o el anticuerpo. Es usual recubrir plásticos pre-formados, tales como el poliestileno, polyvinyl o polypropileno; en forma de camas, tubos, discos o microplacas, por absorción pasiva.

La absorción pasiva, es altamente reproducible; la variabilidad de muestra a muestra, o de pozo a pozo de plástico, es la mayor fuente de error en el ELISA. El material ideal, debería absorber el anticuerpo o antígeno requerido, de una manera eficiente, irreversible y reproducible; y no absorber —

componentes adicionales en etapas posteriores del ensayo.

La inmunoreactividad del antígeno o anticuerpo absorbido no debería alterarse significativamente.

Los conjugados enzima-anticuerpo deben retener alta actividad de ambos componentes, el inmunológico y el enzimático. Además, la actividad de la enzima no debe ser inhibida durante la fase de la reacción antígeno/anticuerpo en el ensayo. Las enzimas disponibles más utilizadas son la  $\beta$ -galactosidasa, la peroxidasa, la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa; todas estas tienen una buena variedad de sustratos cromogénicos. (60)

Las enzimas pueden conjugarse convenientemente con anticuerpos por agentes ligantes como el glutaraldehído o el peryodato de sodio. Para obtener óptimos resultados, se aconseja usar anticuerpos purificados por afinidad en los conjugados. Los sustratos cromogénicos son utilizados usualmente para ensayar la fase sólida de la enzima. Estos son inicialmente incoloros, pero producen un producto coloreado por la degradación enzimática.

Para conjugados de peroxidasa, se utiliza peróxido de hidrógeno con ortofenildiamino, aunque también se puede usar orto-tolidina, ácido 5 amino-salicílico y ABTS.

El ELISA ha sido usado para cuantificación de anticuerpos, utilizándose el método indirecto. El antígeno se pega a una fase sólida, y por este méto

do pueden cuantificarse la mayoría de las respuestas de anticuerpos. El ELISA -también se utiliza para cuantificación de antígenos de alto peso molecular,- empleando el método de sandwich de doble anticuerpo o enzimoimmunométrico. Para cuantificación de haptenos, también se utilizan sistemas de ensayos competitivos como los empleados en el radioinmunoensayo. (60,61)

Detalles técnicos del ELISA que fue utilizado en el presente trabajo:

Se empleó el método indirecto de ELISA, para cuantificar anticuerpos específicos anti el grupo hapteno DNP, en sueros de ratas machos y hembras inmunizadas con diversos conjugados DNP- acarreador.

## **MATERIAL**

### Fase sólida

Placas Immunol MicroELISA

Placas Nunk Micro ELISA

### Micropipetas

20ul, 100 ul ( Eppendorf Geratebau GmbH).

### Lavado

Pipeta volumétrica de 10 ó 25 mililitros.

### Espectrofotómetro

Multiskan -through-theplate type ( Flow Laboratories).

### Reactivos

Amortiguador de recubrimiento. Carbonato-bicarbonato ( pH 9.6): 1.59 gr de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93 gr de  $\text{NaHCO}_3$ , aforar a un litro con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Almacenar a temperatura ambiente por no más de dos semanas.

OBS-Tween. Amortiguador de salina-fosfato, más 0.05 % de Tween (pH 7.4): 8 gr de  $\text{NaCl}$ , 0.2 gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 gr de  $\text{KCl}$ , 1.5 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.5 ml de Tween 20, en un litro de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Conjugados. Se prepararon tres conjugados enzima-anticuerpo:

Peroxidasa de rábano conjugada a IgG de conejo anti IgA de rata, a IgG de conejo anti IgM y a IgG de conejo anti IgG de rata.

Los conjugados se almacenan a 4°C con 50% de glicerol. La cantidad requerida de conjugado se disuelve en PBS-Tween inmediatamente antes de usarse.

### Substrato.

Amortiguador fosfato-citrato ( pH 5.0) : 24.3 ml de ácido cítrico 0.1 M, 25.7 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M y 50ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

La solución substrato (  $\text{H}_2\text{O}_2$ / orto-fenildiamina) se prepara inmediatamente antes de usarse. 40 mg de ortho-phenylenediamine ( Sigma Cat. No. - 3888) se disuelven en 100 ml de amortiguador fosfato-citrato, y se añaden 40 ul de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%. El substrato debe usarse al momento debido a que es sensible a oxidación.

### PROCEDIMIENTO:

# E L I S A

( ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY )

## I.- Adsorción del antígeno a la placa.

Se recubrió cada placa con DNP-BSA 200ug/ml en buffer carbonato-bicarbonato (pH:9.6). Se añadieron 100ul de esta solución en cada pozo.

se dejó la placa 24 hrs. a 4°C.



3 lavados con PBS-TWEEN.

Se añadieron 100ul de suero fetal al 5% en PBS-TWEEN, dejando la placa en incubación a 37°C durante 1hr.

3 lavados con PBS-TWEEN

## II.- Se colocó en cada pozo 100ul de una dilución 1:150 de suero de rata problema. Cada suero se ensayo por triplicado.

En cada placa se colocó una curva de anticuerpos anti-DNP por duplicado; las concentraciones de la curva iban desde 0.039 hasta 5 ug/ml.

Se dejó la placa a 4°C durante 24 hrs.  
3 lavados con PBS.



## III.-Se añadió el conjugado enzima antiglobulina. Se usaron 3 conjugados diferentes: -IgG de conejo anti-IgA de rata peroxidasa. -IgG de conejo anti-IgM de rata peroxidasa. -IgG de conejo anti-IgG de rata peroxidasa.

Se dejó la placa 24hrs. a 4° C.  
3 lavados con PBS-TWEEN



## IV.- Se añadió el substrato. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /orto-fenildiamina en buffer fosfato-citrato (pH 5.0 ).

Después de 30 min., se añadieron a cada pozo 25ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5M.



La Absorbancia del contenido de cada pozo, se leyó por fotometría a 492nm, en un espectrofotómetro Titertek Multiskan

NOTA:Se utilizó la dilución de cada conjugado peroxidasa-antiglobulina, que dió una absorbancia de 1.0 a 492nm.

#### IX - Preparación de Conjugados Enzima-antiglobulina.

Los conjugados se prepararon utilizando peroxidasa de rábano; y tres fracciones de IgG de conejo monoespecífica: 1) anti IgA de rata; 2) anti IgM de rata; y 3) anti IgG de rata

#### Procedimiento:

Método de 2-pasos de glutaraldehído; para peroxidasa. ( Avrameas & Ternyck, 1971). (50)

- 1) Se disuelven 10 mg de peroxidasa de rábano ( RZ3.0) en PBS 0.1M pH 6.8, - conteniendo 1.25% de glutaraldehído. La mezcla es incubada durante la noche a temperatura ambiente.
- 2) La peroxidasa activada con glutaraldehído es dializada contra solución salina normal, o pasada por una columna de Sephadex G 25 para remover el glutaraldehído libre, y llevada a un volumen de 1.0 ml en salina normal.
- 3) Una fracción de IgG monoespecífica anti globulina de rata, es diluida a - 5 mg/ ml en salina normal.
- 4) 1.0 de solución globulina es mezclada con 1.0 ml de peroxidasa activada y 0.1 ml de buffer carbonato bicarbonato 1M pH 9.6. La mezcla se incuba 24 - hrs. a 4°C.
- 5) 0.1 ml de solución de lisina 0.2M es añadida y la mezcla es incubada a -

temperatura ambiente durante 2 hrs.

6) La mezcla es dializada contra PBS pH 7.2 durante la noche.

7) La globulina marcada con la enzima es precipitada añadiendo un volumen igual de solución de sulfato de amonio saturada.

El precipitado es lavado dos veces en sulfato de amonio medio saturado, y es resuspendido en 1.0 ml. de PBS.

8) El conjugado es dializado extensivamente contra PBS, ( o pasado por una - columna de Sephadex G 25).

9) El conjugado es centrifugado a 10 000 XG por 30 min, y el sedimento se desecha. Se añade BSA a una concentración final de 1.0%.

10) El conjugado es filtrado a través de un filtro milipore (0.22 um) y almacenado a -20°C, ( ó a 4°C si se añade una cantidad igual de glicerol) en alícuotas.

11) Para determinar la dilución óptima de trabajo del conjugado se utilizó el método de Voller, Bidwell and Barlett ( 1976).

#### Titulación de Conjugados:

Ejemplo: Titulación del conjugado IgG de conejo anti IgA de rata peroxidasa.

I- Se utilizó IgA de rata a una concentración de 200ug/ml; y se hicieron diluciones en amortiguador de recubrimiento pH 9.6, como se muestra en el dia-

grama siguiente:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A 20ug/ml \_\_\_\_\_

( La dilución colocada en cada pozo  
de un mismo renglón es la misma)

B 10

C 5

D 2.5

E 1.25

F .625

G

H

-----

Cada pozo se llenó con 100 ul de dilución de IgA.

II- Se incubó la placa 1 hr a 37°C; y después se guardó a 4° C durante la noche.

III- Se hicieron 3 lavados a la placa con PBS-Tween.

IV- Se añadió suero fetal al 5% en PBS-Tween, para bloquear; (100ul/pozo).

Se incubó la placa 1 hr a 37°C.

VI- Se hicieron diluciones del conjugado IgG anti IgA de rata peroxidasa, en PBS-Tween. ( Como se muestra en el diagrama, las diluciones se hicieron de -

izquierda a derecha; y la cantidad colocada en cada pozo de una misma línea vertical es constante.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1: 100,	1: 200,	1:300,									( La concentración del conjugado varía por renglón; y es constante en cada fila vertical)
C	1: 100											
D	"											
E	"											
F	"											
G	"											
H	"											

-----

- Se incubó la placa 1 hr a 37°C; y se guardó a 4°C durante la noche.

VII- Se dieron 3 lavados con PBS-Tween.

VIII- Se colocaron en cada pozo 100 ul de solución de sustrato.

-Después de 30 minutos se paró la reacción añadiendo 25 ul de  $H_2SO_4$  2.5M.

IX- El título del conjugado, es igual a la dilución mayor, que da una lectura de absorbancia de 1.0 a 492 nm.

-El título del conjugado IgG anti IgA de rata-peroxidasa; fué 1: 250.

-El título del conjugado IgG anti IgM de rata-peroxidasa, fué de 1: 1000

-El título del conjugado IgG anti IgM de rata-peroxidasa, fué de 1: 1000.

R E S U L T A D O S :

- A) Respuesta Específica de anticuerpos IgA, IgM e IgG en ratas LE y SD machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS.
- B) Respuesta específica de anticuerpos IgM e IgG en ratas Híbridas machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS.
- C) Respuesta específica de IgA, IgM e IgG en ratas híbridas machos y hembras inmunizadas con los conjugados:  
DNP-LIS, DNP-Cit-c, DNP-GAT, DNP-TGAL y DNP-OVA.
- D) Respuesta específica de IgA, IgM e IgG en ratas LE machos y hembras inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-LIS.

-----

A) Respuesta específica de IGA, IgM e IgG en ratas LE y SD machos y hembras inmunizadas con DNP-LIS.

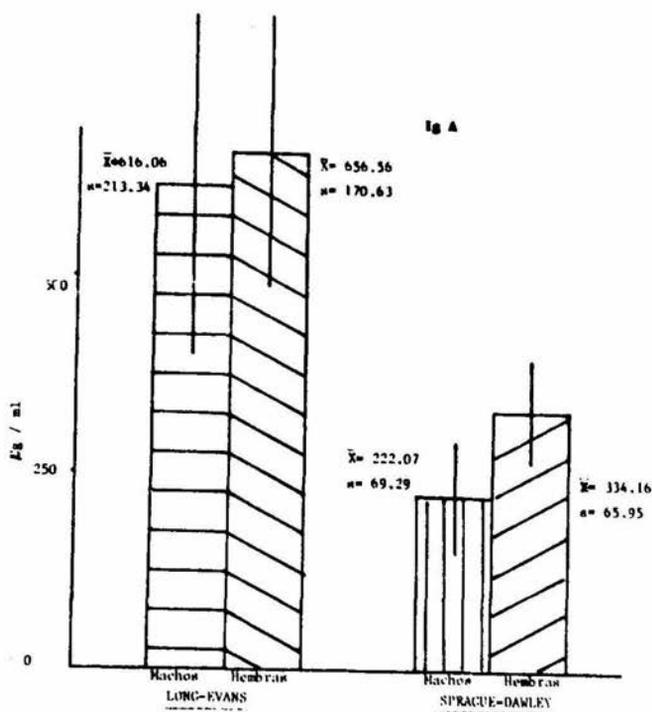
RESULTADOS:

I- CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS DE LA CLASE IgA

Los resultados presentados en la tabla 1 indican que existen diferencias entre las ratas Long-Evans y Sprague-Dawley inmunizadas con DNP-LIS, en la respuesta específica de IgA anti DNP. Las ratas Long-Evans generaron altas respuestas de IgA específicas hacia DNP-LIS; mientras que las ratas Sprague-Dawley produjeron respuestas intermedias. Al compararse por pruebas de t la respuesta de IgA de las hembras LE con la de las hembras SD; y la respuesta de IGA de los machos LE con los machos SD, se encontró que las diferencias, para cada sexo, entre las ratas Long-Evans y Sprague Dawley en la respuesta específica de IgA eran ambas significativas, en las ratas inmunizadas con DNP-LIS. ( Fig.1)

Como puede apreciarse en la tabla 2 y 6 al compararse de igual manera los grupos de ratas controles machos y hembras de las cepas Long-Evans y Sprague Dawley, se encontró no existen diferencias significativas entre una y otra cepa, en la respuesta de IgA anti DNP.

Variación entre machos y hembras. Para cada cepa, se comparó la respuesta de IgA anti DNP entre machos y hembras. Encontrándose que: a) En las ratas SD inmunizadas con DNP-LIS las hembras produjeron respuestas de IgA específicas significativamente mayores que los machos; b) En las ratas LE inmunizadas con



"Respuesta de IgA en ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-Lisozima".

Fig. 1 . Control genético de la respuesta específica de IgA, hacia DNP<sub>4</sub>-LIS; en ratas. Se puede apreciar que las ratas Long-Evans producen altas respuestas contra DNP<sub>4</sub>-LIS; mientras que las Sprague-Dawley generan respuestas intermedias. Se observa también que en las ratas SD las hembras producen respuestas de IgA significativamente mayores que los machos; mientras que en las ratas LE no existen diferencias entre ambos sexos. (Nota: Los números en la ordenada indican la concentración en Ug/ml de IgA anti DNP determinada por ELISA).

Tabla i .

CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS CLASE IgA; EN RATAS INMUNIZADAS CON DNP<sub>4</sub>- LIS.

CEPA =	LONG-EVANS	SPRAGUE- DAWLEY	HIBRIDOS (SDxLE) F <sub>1</sub>	(µg/ml)
MACHOS	$\bar{X}$ = 616.06 s= 213.36	$\bar{X}$ = 222.07 s= 69.29	$\bar{X}$ = 761.45 s= 172.65	
HEMBRAS	$\bar{X}$ = 656.56 s= 170.63	$\bar{X}$ = 334.66 s= 65.95	$\bar{X}$ = 1615.5 s= 594.26	

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA DE IgA HACIA DNP<sub>4</sub>-LIS ENTRE RATAS DE LAS CEPAS LONG-EVANS Y SPRAGUE-DAWLEY.

SEXO            MACHOS= p < .001                      HEMBRAS= p < .001

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA HACIA DNP<sub>4</sub>-LIS ; DEBIDAS AL SEXO, EN RATAS.

LONG-EVANS	SPRAGUE-DAWLEY	HIBRIDOS (SDxLE) F <sub>1</sub>
p > 0.1	p < 0.025	p < 0.01

Tabla 2 .

P R U E B A S D E t

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA; ENTRE RATAS LONG-EVANS y SPRAGUE-DAWLEY INMUNIZADAS  
CON DNP -LIS.

SEXO	RESPUESTA DE IgA	RESPUESTA DE IgM	RESPUESTA DE IgG
MACHOS	$p < .001$	$p < .001$	$p > 1.0$ (n.s.)
HEMRAS	$p < .001$	$p < .001$	$p > 1.0$ (n.s.)

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA ESPECIFICA ANTI DNP, ENTRE RATAS LONG-EVANS y SPRAGUE-DAWLEY CONTROLES.

SEXO	RESPUESTA DE IgA	RESPUESTA DE IgM	RESPUESTA DE IgG
MACHOS	$p > 1.0$ n.s.	$p < .05$	$p > 1.0$ n.s.
HEMRAS	$p > 1.0$ n.s.	$p < .05$	$p > 1.0$ n.s.

con DNP-LIS, no se observaron diferencias entre machos y hembras en la respuesta de IgA específica. c) En las ratas controles de ambas cepas, no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en sus respuestas de IgA anti DNP. ( Ver tabla 1 y 5).

II- RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS DE LAS CLASES IgM e IgG, EN RATAS LONG-EVANS Y SPRAGUE DAWLEY INMUNIZADAS CON DNP<sub>4</sub>-LIS.

En las figuras se observa la respuesta de IgM e IgG e IgC de las ratas LE y SD inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS.

Se puede apreciar, que las ratas machos y hembras de la cepa Long-Evans producen respuestas de IgM específicas mayores que las ratas machos y hembras de la cepa Sprague-Dawley, respectivamente. Al compararse estos resultados por pruebas de t, se encontró que tales diferencias eran significativas. Estos resultados, junto con los de la respuesta de IgA indican que: las respuestas específicas hacia DNP-Lisozima, de IgA y de IgM, de las ratas Long-Evans son altas; mientras que en las ratas Sprague-Dawley, tales respuestas son intermedias. (3)

Por el contrario, la respuesta de IgC específica no mostró variación significativa entre las ratas de las cepas Long-Evans y Sprague-Dawley, ambas inmunizadas con DNP-LIS. (Tabla 4). Los resultados de la respuesta específica anti DNP, en los grupos de ratas controles de las cepas Long-Evans y Sprague-Dawley, también fueron comparados por pruebas de t; y como puede apreciarse en la tabla 6 se encontró que no existían diferencias significativas entre ambos grupos, en la segunda respuesta de IgG, pero la respuesta de IgM sí mostró variación significativa entre ambas cepas. (Tabla 2).

EFFECTO DEL SEXO EN LAS RESPUESTAS DE IgM e IgG ESPECIFICAS DE LAS RATAS

LE Y SD INMUNIZADAS CON DNP-LIS, Y CONTROLES.

Tanto en las ratas Long-Evans como Sprague-Dawley inmunizadas con DNP-LIS se encontró que, la respuesta específica de anticuerpos IgM era significativamente mayor en las hembras que en los machos. ( ver tabla 3 y figura 2).

Respecto a la respuesta de IgC anti DNP, de las ratas inmunizadas con DNP-LIS de las cepas Long-Evans y Sprague-Dawley, podemos notar que no existe variación significativa debida al sexo en ninguna de las cepas de ratas probadas. (ver fig.3 y tabla 4).

En los grupos de ratas controles LE y SD, se observó que las respuestas de IgM y de IgG anti- DNP no se ven influenciadas por el sexo. Estos resultados al igual que los anteriores fueron comparados por pruebas de t. (ver tabla 5).

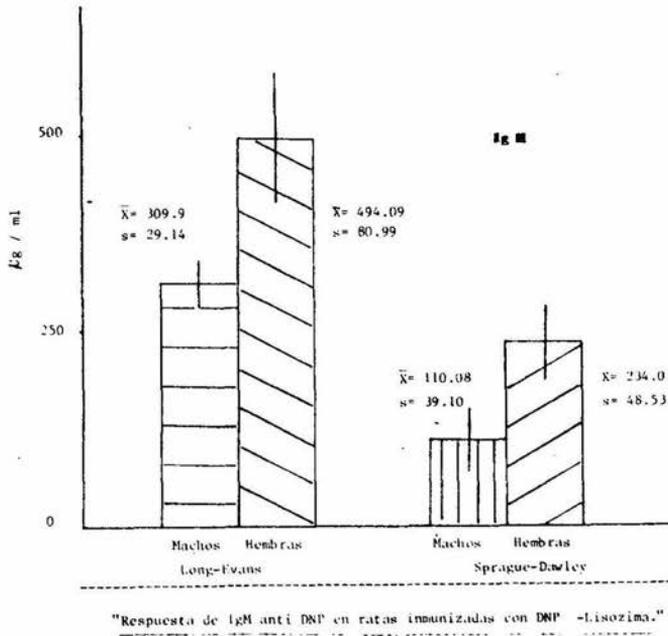


Fig.2 . Control genético de la respuesta específica de IgM en ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS. Se puede apreciar, que las ratas LE generarán altas respuestas hacia DNP<sub>4</sub>-LIS; mientras que las SD producen respuestas intermedias de IgM. También se observa que tanto en las ratas LE como en las SD, las hembras producen respuestas de IgM significativamente mayores que los machos.  
(Nota: En la ordenada se muestra la respuesta de IgM anti DNP en Ug/ml medida por ELISA).

Tabla 3 .

3.1 CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS DE LA CLASE IgM; EN RATAS INMUNIZADAS CON DNP<sub>4</sub>-LIS.

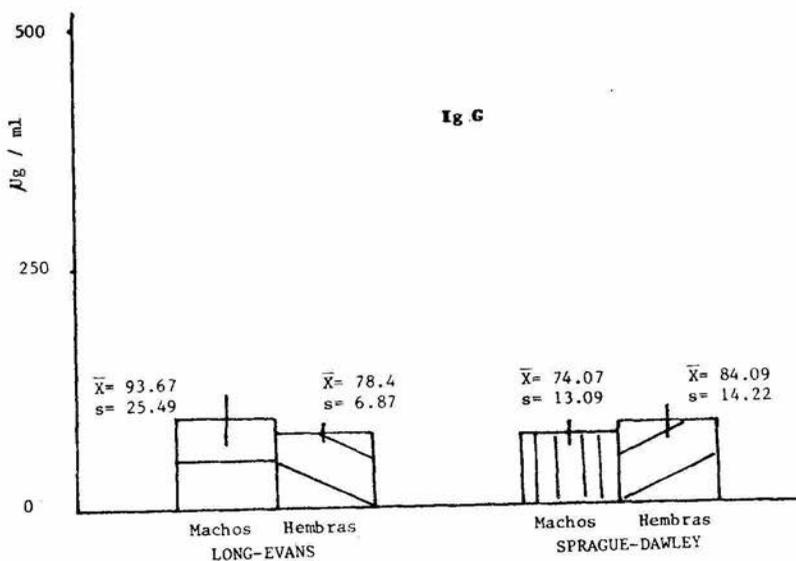
CEPA =		LONG-EVANS	SPRAGUE-DAWLEY	(SDxLE)F <sub>1</sub> HIBRIDOS
MACHOS	$\bar{X}$ =	309.9	110.084	187.66
	s=	29.14	39.10	43.13
HEMBRAS	$\bar{X}$ =	494.09	234.0	650.0
	s=	80.99	48.53	273.0

3.2 DIFERENCIAS ENTRE LAS CEPAS LONG-EVANS Y SPRAGUE-DAWLEY, en la respuesta especifica de IgM a DNP<sub>4</sub>-LIS .

MACHOS =  $p < .001$                       HEMBRAS =  $p < .001$

3.3 DIFERENCIAS DEBIDAS AL SEXO, EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgM HACIA DNP<sub>4</sub>-LIS; EN ratas LE, SD y (SDxLE)F<sub>1</sub>

	LONG-EVANS	SPRAGUE-DAWLEY	HIBRIDOS (SDxLE)F <sub>1</sub>
	$p < .001$	$p < .001$	$p < .01$



“ Respuesta de IgG anti DNP en ratas inmunizadas con DNP -Lisozima!”

**Fig.3** . Respuesta específica de IgG en ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS. La figura muestra que la respuesta de IgG anti DNP<sub>4</sub>-LIS es muy similar en ambas cepas. Por otro lado, ni en las ratas LE ni en las SD se observó variación debida al sexo en ésta respuesta.

(Nota: En la ordenada se indica la concentración de IgG anti DNP en Ug/ml, determinada a los sueros de las ratas por ELISA).

Tabla 4 .

4.1 RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG ANTI DNP, EN RATAS INMUNIZADAS CON DNP<sub>4</sub>-LIS . (Ug/ml) .

CEPA	LONG-EVANS	SPRAGUE-DAWLEY	HIBRIDOS (SDxLE)F <sub>1</sub>
MACHOS $\bar{X}$ =	93.67	74.073	148.46
s=	25.49	13.096	37.39
HEMBRAS $\bar{X}$ =	78.4	84.09	114.84
s=	6.87	14.22	45.39

4.2 <sup>b</sup> DIFERENCIAS ENTRE LAS CEPAS LONG-EVANS Y SPRAGUE-DAWLEY, EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG A DNP<sub>4</sub>-LIS .

MACHOS = p > 1.0 n.s.

HEMBRAS = p > 1.0 n.s.

4.3 VARIACION DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG HACIA DNP<sub>4</sub>-LIS; EN RATAS DE LAS CEPAS :

LONG-EVANS	SPRAGUE-DAWLEY	HIBRIDOS (SDxLE)F <sub>1</sub>
p > 0.1 n.s.	p > 0.1 n.s.	p > 0.1 n.s.

Tabla 5 .  
P R U E B A S D E t

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA ANTI DNP DEBIDAS AL SEXO, EN RATAS CONTROLES LONG-EVANS y SPRAGUE-DAWLEY .

CEPA	RESPUESTA IgA	RESPUESTA IgG	RESPUESTA IgM
LONG-EVANS <sub>1</sub> *	p > 0.1	p > 0.1	p > 0.1
LONG-EVANS <sub>2</sub> *	p > 0.1	p > 0.1	p > 0.1
SPRAGUE-DAWLEY	p > 0.1	p > 0.1	p > 0.1

\*Nota: los números 1 y 2 indican que se trata de dos grupos diferentes de ratas LONG-EVANS controles (el grupo L-E<sub>2</sub> se ensayó junto con S-D; mientras que L-E<sub>1</sub> fue el primer grupo de controles LE, y se ensayó con los grupos LE inmunizados con DNP-LIS, DNP-Cit-c y DNP-OVA).

Tabla 6 .

RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI DNP, EN RATAS CONTROLES LONG-EVANS y SPRAGUE-DAWLEY.

( $\mu\text{g/ml}$ )		RESPUESTA DE IgA		RESPUESTA DE IgG		RESPUESTA DE IgM	
		MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS
CEPA	$\bar{X}$ =	9.37	6.32	6.2	5.48	14.06	12.2
	s=	4.4	3.9	2.7	1.83	5.6	4.63
LONG-EVANS	$\bar{X}$ =	5.8	4.2	5.0	5.9	7.8	6.5
	s=	2.66	2.22	2.3	2.1	2.8	2.4
SPRAGUE-DAWLEY	$\bar{X}$ =	5.8	4.2	5.0	5.9	7.8	6.5
	s=	2.66	2.22	2.3	2.1	2.8	2.4

B) RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA, IgM e IgG EN HIBRIDOS INMUNIZADOS CON DNP-LIS.  
III-CARACTER DOMINANTE DE LA RESPUESTA ESPECIFICA ALTA DE ANTICUERPOS DE LA CLASE

IgA

Para averiguar si la alta respuesta específica hacia DNP<sub>4</sub>-LIS, de IgA, de las ratas Long-Evans se transmitía como un carácter dominante, sobre la respuesta intermedia mostrada por las ratas Sprague-Dawley, se realizaron cruces de hembras de la cepa Sprague-Dawley con un macho Long-Evans. Los híbridos obtenidos, machos y hembras, se inmunizaron con el conjugado DNP<sub>4</sub>-LIS y se determinaron por ELISA sus respuestas específicas de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG.

Los resultados se muestran en la figura y se analizan a continuación:

RESPUESTA DE IgA en los híbridos (SDxLE)F<sub>1</sub>

En la tabla podemos apreciar que los híbridos (SDxLE)F<sub>1</sub> producen altas respuestas específicas de IgA hacia DNP-LIS, por lo que éstos resultados sugieren, que la alta respuesta de IgA de la cepa Long-Evans, se transmite a los híbridos como un carácter dominante, sobre la respuesta intermedia mostrada por las ratas Sprague-Dawley. Cabe señalar, que los híbridos machos y hembras producen respuestas de IgA aún mayores que las presentadas por las ratas Long-Evans.

EFEECTO DEL SEXO EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA ANTI-DNP-LIS, EN LOS HIBRIDOS.

En la figura se puede observar, que en los híbridos (SDxLE)F<sub>1</sub> INMUNIZADOS CON DNP-LIS, las hembras produjeron respuestas específicas de IgA anti-DNP significativamente mayores a las de los machos. (Estas diferencias entre sexos se analizaron por pruebas de t ver tabla 1).

Consideramos importante recordar, que la respuesta de IgA hacia DNP-LIS en las ratas Long-Evans no mostró variación significativa debida al sexo; y que en las ratas Sprague-Dawley, encontramos resultados similares a los de los Híbridos, es decir, que las hembras produjeron respuestas de IgA significativamente mayores que los machos. No encontramos una explicación convincente a éstos resultados pues, asumiendo que:

- Los híbridos  $F_1$  machos, portan un cromosoma X de SD y un cromosoma Y de LE; y que las hembras  $F_1$  portan un cromosoma X de SD y un X de LE. (Ya que los híbridos  $(SD \times LE)F_1$  son el resultado de la cruce de ratas hembras SD, con machos LE.)
- Entonces, si suponemos que las ratas LE no reciben influencia del cromosoma X, en su respuesta específica de IgA a DNP-LIS, ya que no hay diferencias entre machos y hembras.
- Y que la respuesta de IgA hacia DNP-LIS de las ratas SD, si recibe influencia del cromosoma X; y por lo tanto las respuestas de las hembras son mayores a las de los machos.
- Esperaríamos entonces que en los híbridos  $F_1$ , no se observaran diferencias significativas entre machos y hembras en sus respuestas de IgA hacia DNP-LIS, lo cual no ocurre.

#### IV- RESPUESTA ESPECÍFICA DE IgM EN RATAS $(SD \times LE)F_1$ INMUNIZADAS CON DNP-LIS.

De manera similar a como se observó en la respuesta de IgA, se encontró que los híbridos  $F_1$  producían altas respuestas de IgM hacia DNP-LIS iguales y/o mayores a las encontradas en las ratas Long-Evans. Por lo que se concluye que, la respuesta de IgM alta se transmite a la progenie como un carácter dominante sobre la respuesta intermedia presentada por las ratas Sprague-Dawley. (Tabla 3).

#### VARIACION DE LA RESPUESTA DE IgM EN LOS HIBRIDOS, DEBIDA AL SEXO.

En las ratas híbridas inmunizadas con DNP-LIS, se encontró que las hembras producían respuestas de IgM anti DNP significativamente mayores a las encontradas en los machos. Cabe recordar que en los padres LE y SD también se encontraron estas diferencias entre sexos en la respuesta de IgM anti DNP-LIS.

#### V- RESPUESTA ESPECÍFICA DE IgG EN HIBRIDOS $(SD \times LE)F_1$ INMUNIZADOS CON DNP-LIS.

La respuesta de IgG de los híbridos  $F_1$  inmunizados con DNP-LIS, no se puede analizar de la misma manera que las respuestas de IgA e IgM, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre LE y SD en sus respuestas de IgG hacia DNP-LIS; y por consiguiente no podemos decir cual carácter se transmite de manera dominante con exactitud, y mucho menos a cual cepa pertenece tal carácter.

EFFECTO DEL SEXO EN LA RESPUESTA DE IgG EN LOS HIBRIDOS INMUNIZADOS CON

DNP-LIS.

El análisis por pruebas de t de la respuesta de IgG hacia DNP-LIS de los híbridos, reveló que esta respuesta no recibe influencia del sexo.

En la figura se puede apreciar, que no existen diferencias entre machos y hembras en sus respuestas específicas de IgG. (tabla 4).

En base a los resultados anteriores, que indicaban que: a) en los híbridos y en las ratas Sprague-Dawley, las hembras producían respuestas específicas hacia DNP-LIS de las clases IgA e IgM significativamente mayores que los machos; b) mientras que en las ratas Long-Evans, aunque respecto a la respuesta específica de IgM se encontró que las hembras también presentaban respuestas superiores a las de los machos, no se encontró variación significativa debido al sexo, en cuanto a la respuesta específica de anticuerpos IgA. (Tablas 2,7,8)

Se decidió entonces, probar otros antígenos conjugados a DNP en ratas Long Evans y en híbridos (SDxLE)  $F_1$ , con el objeto de averiguar si en las ratas LE la respuesta de IgA hacia otros antígenos sí mostraba variación debida al sexo; y por otro lado, en los híbridos  $F_1$  se utilizaron otros antígenos, para analizar la respuesta específica de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG entre machos y hembras, con mayor detalle. Es decir, para averiguar si la respuesta específica de IgA e IgM se comportaba de la misma manera que se observó hacia DNP-Lis, o si variaba dependiendo del antígeno utilizado.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las ratas Long Evans y en los híbridos (SDxLE)  $F_1$ , al determinar por ELISA sus respuestas específicas de IgA, IgM, e IgG anti DNP; y comparar sus respuestas entre machos y hembras.

Tabla 7 .

RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA ANTI DNP , DE RATAS LONG-EVANS y SPRAGUE-DAWLEY INMUNIZADAS CON DNP -LIS

( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )	RESPUESTA DE IgA		RESPUESTA DE IgM		RESPUESTA DE IgG		
	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	
LONG-EVANS	$\bar{X}$ =	616.06	656.56	309.9	494.09	93.67	78.4
	$\delta$ =	213.34	170.63	29.14	80.99	25.49	6.87
SPRAGUE-DAWLEY	$\bar{X}$ =	222.07	334.66	110.084	234.0	74.073	84.09
	$\delta$ =	69.29	65.95	39.10	48.53	13.096	14.22

Tabla 8.  
P R U E B A S D E t

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA ANTI DNP, DEBIDAS AL SEXO, EN RATAS LONG-EVANS y SPRAGUE-DAWLEY

ANTIGENO	RESPUESTA DE IgA	RESPUESTA DE IgM	RESPUESTA DE IgG
DNP <sub>4</sub> -LIS			
LONG-EVANS	$p > 0.1$	$p < 0.001$	$p > 0.1$
SPRAGUE-DAWLEY	$p < 0.025$	$p < 0.001$	$p > 0.1$

C) Respuesta específica de IgA, IgM e IgG en ratas híbridas (SDxLE) F<sub>1</sub>

machos y hembras inmunizadas con los conjugados:

DNP-LIS, DNP-Cit-c, DNP-GAT, DNP-TGAL y DNP-OVA.

#### RESULTADOS DEL ELISA REALIZADO EN LOS SUEROS DE LAS RATAS

##### HIBRIDAS ( SD x LE ) F<sub>1</sub>, MACHOS Y HEMBRAS

La respuesta inmune específica anti DNP de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG, determinada por ELISA en los sueros de las ratas híbridas machos y hembras, se muestra en las figuras 4, 5 y 6 respectivamente.

El análisis estadístico aplicado a estos resultados, fué un análisis factorial de Varianza y pruebas de t de Student, el primero se aplicó para determinar si la respuesta inmune específica de anticuerpos IgA, IgM e IgG mostraba una variación debida al sexo y/o una variación dependiente del tipo de antígeno utilizado en la inmunización. Cada clase de respuesta se analizó por separado. El segundo análisis, se aplicó para comparar la respuesta inmune entre los machos y las hembras de cada grupo de ratas inmunizadas con un mismo antígeno.

##### Respuesta de IgA

La respuesta de anticuerpos IgA anti DNP de los sueros de las ratas (SDxLE) F<sub>1</sub> se muestra en la tabla 9 y en la figura 4. Observando los resultados de la figura 4, podemos notar que las hembras producen mayores respues-

tas específicas de IgA que los machos; en los grupos de ratas inmunizadas con los conjugados DNP<sub>10</sub>-OVA, DNP<sub>4</sub>-DNP<sub>3</sub>-GAT. Los controles, ratas no inmunizadas y ratas inmunizadas con DNP<sub>10</sub>-TGAL, muestran bajas respuestas anti DNP, las cuales no varían significativamente entre machos y hembras.

Al comparar la respuesta específica de IgA anti DNP entre machos y hembras por pruebas de t, se encontró que la respuesta de IgA era significativamente mayor en las hembras inmunizadas con DNP<sub>10</sub>-PVA, DNP<sub>4</sub>-LIS, DNP<sub>3</sub>-Cit-c y DNP<sub>3</sub>-GAT que en los machos tratados similarmente. ( ver tabla 12).

El análisis factorial de varianza aplicado a estos datos, reveló que la respuesta inmune específica de IgA, recibe tanta influencia del sexo, como variación debida al antígeno utilizado en la inmunización. ( ver tabla 13)

#### Respuesta de IgM

Los resultados de la respuesta de anticuerpos IgM anti DNP, obtenidos por el ELISA aplicado a los sueros de las ratas Híbridas (SDxLE)<sub>F1</sub> machos y hembras, se pueden apreciar en la tabla 10 y en la figura 5. Como puede observarse, la respuesta de IgA; es decir, las hembras también muestran respuestas de IgM específicas anti DNP mayores a las encontradas en los machos, en los grupos de ratas inmunizadas con DNP<sub>10</sub>-OVA, DNP<sub>4</sub>-LIS, DNP<sub>3</sub>-Cit-c y DNP<sub>3</sub>-GAT. Los grupos controles antes mencionados, también mostraron muy bajas respuestas anti DNP de anticuerpos IgM, que tampoco varían debido al sexo.

La comparación por pruebas de t, de la respuesta de IgM entre machos y

hembras reveló que las diferencias encontradas entre machos y hembras son estadísticamente significativas. ( ver tabla 12).

El análisis de varianza factorial aplicado a éstos datos de la respuesta de IgM, indicó que ésta respuesta muestra una variación significativa, tanto en el efecto del sexo, como por el tipo de antígeno utilizado. (ver - tabla 13).

#### Respuesta de IgG

Los datos obtenidos en el ELISA para cuantificar anticuerpos IgG específicos anti DNP que se aplicó a los ya mencionados sueros de ratas híbridas - (SDxLE) F., se encuentran en la figura 3 y en la tabla (11) Puede apreciarse, que no se observan diferencias debidas al sexo en la respuesta de IgG de ninguno de los grupos de ratas inmunizadas con los ya citados conjugados DNP-aca reador.

En los grupos de ratas controles machos y hembras descritos anteriormente, la respuesta de IgG anti DNP fué también muy pobre y sin variación debida al sexo.

Como era de esperarse, el análisis de estos datos por pruebas de t indicó que no existen diferencias significativas entre machos y hembras, en sus respuestas específicas anti DNP, de anticuerpos IgG. (ver tabla 12).

Al aplicar a estos resultados el ya mencionado análisis de varianza fac-

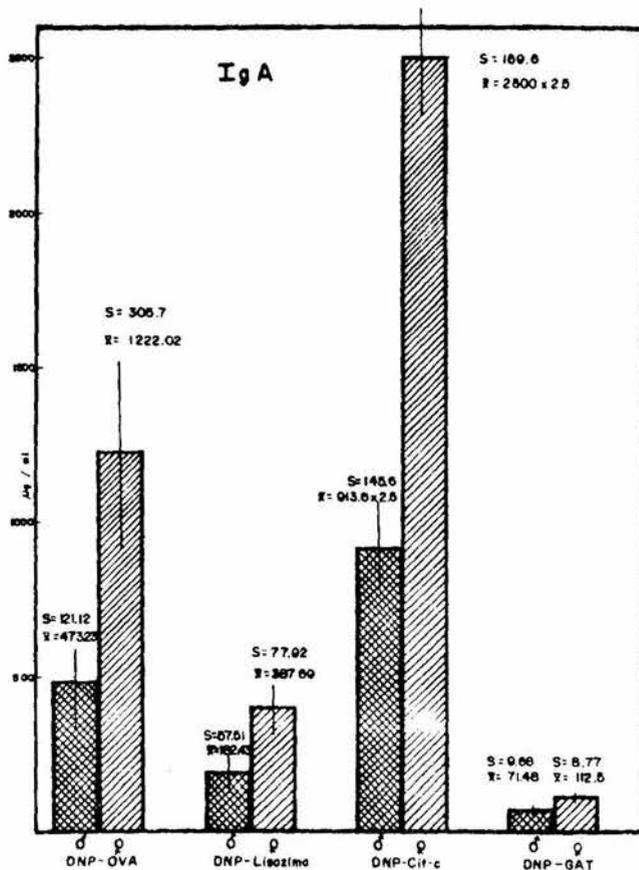


Fig.4 . Respuesta específica de IgA en ratas híbridas (SDxLE)<sub>1</sub> inmunizadas con conjugados DNP-acarreador. Se puede apreciar, que las hembras presentan respuestas de IgA contra DNP-OVA, DNP-LIS, DNP-Cit-c y DNP-GAT, significativamente mayores que los machos. (Nota: La respuesta de IgA anti DNP se indica en la ordenada en Ug/ml.  $\bar{X}$ = media de cada grupo de ratas; y s= desviación standar).

Tabla 9 .

RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS IgA ANTI DNP, EN RATAS HIBRIDAS ( SPRAGUE-DAWLEY x LONG-EVANS ) F<sub>1</sub> (μg / ml ).

ANTIGENO	DNP -OVA I	DNP -OVA II	DNP -Cit-c	DNP - LIS I	DNP -LIS II	DNP -GAT	DNP -TGAL	CONTROLES
MACHOS $\bar{X}$ = 547.63	473.23	720.0	761.45	182.43	109.32	5.97	3.61	
$\delta$ = 73.13	121.12	49.01	172.65	57.51	30.26	1.46	1.2	
HEMBRAS $\bar{X}$ = 2608.72	1222.02	1446	1615.5	387.69	160.7	5.85	3.58	
$\delta$ = 1075.98	305.7	95.0	594.26	77.92	38.19	2.02	1.43	

ANTIGENO	DNP -GAT II
MACHOS $\bar{X}$ = 71.48	
$\delta$ = 9.68	
HEMBRAS $\bar{X}$ = 112.5	
$\delta$ = 8.77	

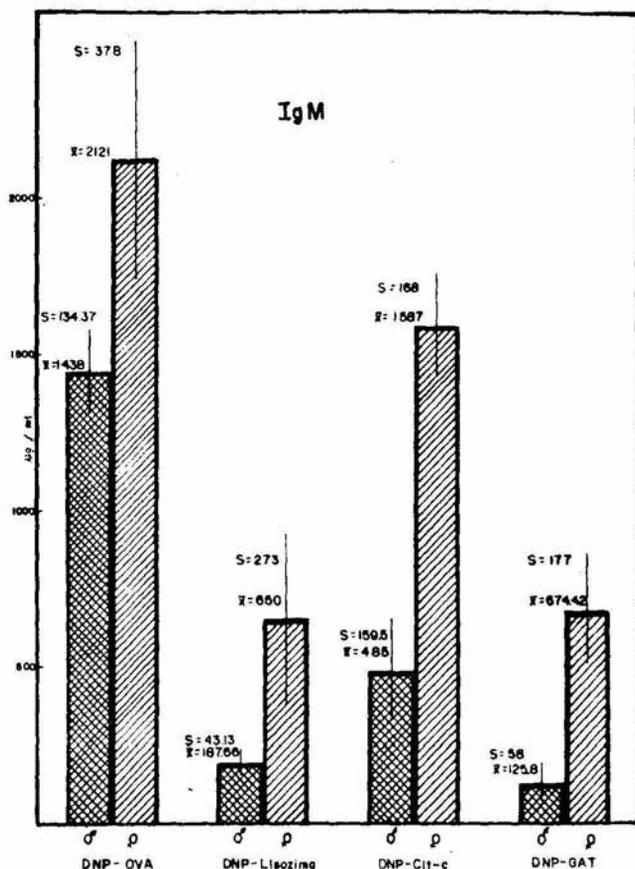


Fig.5 . Respuesta específica de IgM en ratas híbridas (SDxLE)<sub>1</sub> inmunizadas con conjugados DNP-aca-  
rreador. Se observa que la respuesta de IgM de las hembras es significativamente mayor a la de los ma-  
chos, en las ratas (SDxLE)<sub>1</sub> inmunizadas con DNP-  
LIS, DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-GAT. ( Nota: la res-  
puesta de IgM anti DNP se indica en Ug/ml).

Tabla 10 .

RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS IgM ANTI DNP, EN RATAS HIBRIDAS ( SPRAGUE-DAWLEY x LONG-EVANS )F<sub>1</sub> . (µg / ml).

ANTIGENO	DNP -OVA I	DNP -OVA II	DNP -C <sub>2</sub> c	DNP - LIS I	DNP- -LIS II	DNP -GAT	DNP -TGAL	CONTROLES
MACHOS	$\bar{X} = 1438$	536.1	485.24	43.20	187.66	125.83	5.24	4.57
	$s = 134.37$	105.0	159.5	13.7	43.13	58.0	.7125	.793
HEMRAS	$\bar{X} = 2121.0$	4956	1587.15	73.62	650.0	674.42	5.65	4.23
	$s = 378$	596.74	168	30.39	273	177	.7328	1.12

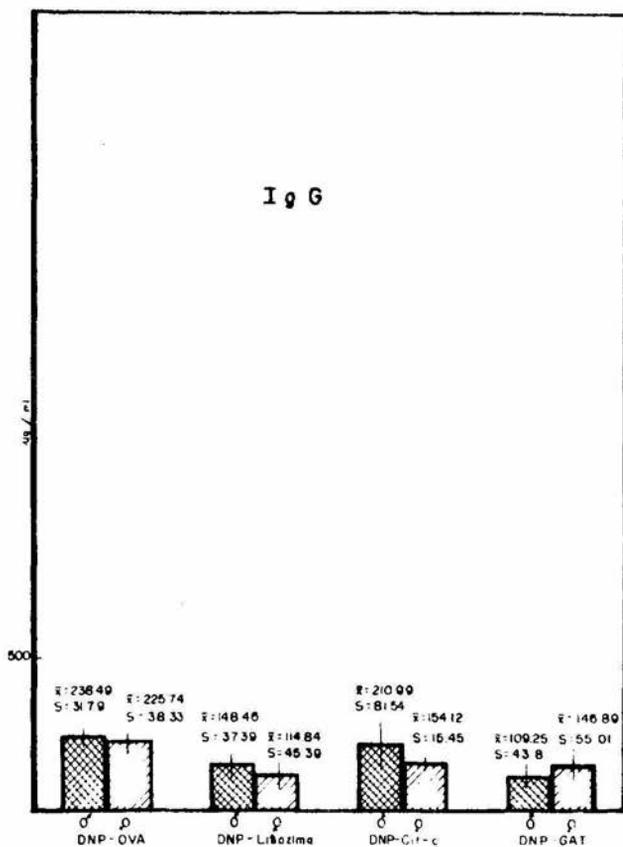


Fig.6 . Respuesta de IgG específica en ratas híbrid<sub>1</sub>as (SDxLE)<sub>1</sub>F<sub>1</sub> machos y hembras. Se observa que no existe variación significativa debida al sexo en la respuesta de IgG de las ratas inmunizadas con los conjugados: DNP-OVA, DNP-LIS, DNP-Cit-c y DNP-GAT. (La respuesta de IgG anti DNP se indica en Ug/ml).

Tabla 11.

RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS IgG ANTI DNP, EN RATAS HIBRIDAS ( SPRAGUE-DAWLEY x LONG-EVANS )F<sub>1</sub> (µg / mL) .

ANTIGENOS	DNP -OVA I	DNP -OVA II	DNP -Cit-c	DNP - LIS I	DNP -LIS II	DNP -GAT	DNP -TGAL	CONTROLES
MACHOS	$\bar{X}$ = 141.09	238.49	210.99	31.81	148.46	109.25	3.9	4.27
	$\delta$ = 32.41	31.79	81.54	16.15	37.39	43.8	0.86	0.87
HEMBRAS	$\bar{X}$ = 104.9	225.74	154.12	37.61	114.84	146.89	4.21	4.11
	$\delta$ = 30.51	32.33	15.45	16.33	45.39	55.0	0.304	0.94

Tabla 12 .  
P R U E B A S D E t

DIFERENCIAS DE RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA, ENTRE RATAS HIBRIDAS (SPRAGUE-DAWLEY x LONG-EVANS)F<sub>1</sub> MACHOS Y HEMBRAS.

ANTIGENO	RESPUESTA DE IgA	RESPUESTA DE IgM	RESPUESTA DE IgG
DNP <sub>10</sub> -OVA I	p < .01	p < .01	p > 0.1
DNP <sub>10</sub> -OVA II	p < .001	p < .001	p > 0.1
DNP <sub>4</sub> -LIS I	p < .01	p < .025	p > 0.1
DNP <sub>4</sub> -LIS II	p < .01	p < .01	p > 0.1
DNP <sub>3</sub> -Cit-c	p < .001	p < .001	p > 0.1
DNP <sub>3</sub> -GAT I	p < .05	p < .01	p > 0.1
DNP <sub>10</sub> -TGAL	p > 0.1	p > 0.1	p > 0.1
DNP <sub>3</sub> -GAT II	p < .001		
CONTROLES	p > 0.1	p > 0.1	p > 0.1

Tabla 13

ANALISIS DE VARIANZA DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA ANTI DNP, EN RATAS HIBRIDAS (SPRAGUE-DAWLEY X - LONG-EVANS) F<sub>1</sub> MACHOS Y HEMBRAS, INMUNIZADAS CON 4 DIFERENTES CONJUGADOS DNP-ACARREADOR\* .

		RESPUESTA DE IgA	RESPUESTA DE IgM	RESPUESTA DE IgG	
	F <sup>.05</sup> VALOR DE TABLAS	VALOR F <sup>.05</sup> CALCULADA	VALOR F <sup>.05</sup> CALCULADA	VALOR F <sup>.05</sup> CALCULADA	
EFFECTO DEL SEXO	F <sub>1,48</sub> <sup>.05</sup> = 4.08	< 6.67	< 9.49	> 0.428	
EFFECTO DEL TIPO DE ANTIGENO	F <sub>5,48</sub> <sup>.05</sup> = 2.45	< 6.05	< 34.7	< 4.94	

torial se encontró que no rechazaban la primera hipótesis nula, de aquí que se concluya que no existe influencia del sexo en la respuesta específica de anticuerpos IgG. Sin embargo, debido a que la segunda hipótesis nula probada sí fué rechazada, se concluye que la respuesta de anticuerpos IgG anti DNP - varía por efecto del antígeno utilizado en la inmunización, (ver tabla 13).

D) Respuesta específica de IgA, IgM e IgG en ratas Long-Evans machos y hembras inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit<sub>3</sub>c y DNP-LIS.

#### RESULTADOS DEL ELISA APLICADO A LOS SUEROS DE LAS RATAS LONG-EVANS

Los resultados del ELISA indirecto para cuantificación de anticuerpos de las clases IgA, IgM e IgG anti DNP aplicado a los sueros de las ratas de ambos sexos, de la cepa LONG-EVANS inmunizadas con los conjugados DNP<sub>10</sub>-OVA, DNP<sub>4</sub>-LIS y DNP<sub>3</sub>-Cit<sub>3</sub>c, se muestran en las figuras 7,8 y 9 respectivamente.

#### Respuesta de IgA

Los resultados de la respuesta específica de IgA anti DNP se muestran en la tabla 14 y en la figura 7. Se puede apreciar que las ratas inmunizadas con DNP<sub>10</sub>-OVA y DNP<sub>3</sub>-Cit<sub>3</sub>c, muestran una respuesta de IgA específica mayor a la encontrada en los correspondientes grupos de machos similarmente tratados. Pero por otro lado, en el grupo de ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS no se observan

diferencias entre ambos sexos en sus respuestas de IgA anti DNP.

Al comparar estos datos por pruebas de t, se halló lo esperado; no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras, en la respuesta de IgA del grupo de ratas inmunizado con DNP<sub>4</sub>-LIS. Mientras que, para los grupos de ratas inmunizadas con DNP<sub>10</sub>-OVA y DNP<sub>3</sub>-Cit-c, si se observaron variaciones significativas debidas al sexo, mostrando las hembras respuestas de IgA anti DNP superiores a las de los machos. (ver tabla 15).

#### Respuesta de IgM

Los resultados de la respuesta de IgM anti DNP obtenidos por ELISA en los sueros de las ratas LONG-EVANS se encuentran en la tabla 14 y en la figura 8.

Podemos notar, que a diferencia de lo observado para la respuesta de IgA, la respuesta de IgM anti DNP, fué mayor en los sueros de las hembras de todos los grupos de ratas inmunizadas con conjugados DNP-acarreador, que en los respectivos sueros de machos.

Al finalizar estos datos, comparando por pruebas de t la respuesta de IgM entre machos y hembras, se encontró que las mayores respuestas mostradas por las hembras inmunizadas con DNP<sub>10</sub>-OVA, DNP<sub>3</sub>-Cit-c y DNP<sub>4</sub>-LIS, son significativamente diferentes a las encontradas en los machos tratados similarmente. ( ver tabla 15).

## RESPUESTA DE IgG

La respuesta específica de IgG de los sueros de las ratas LONG-EVANS ya mencionados, se muestran en la figura 9 y en la tabla 14. Se puede apreciar que la respuesta de IgG anti DNP en la cepa LONG-EVANS, muestra mayor variación debida al sexo que en los híbridos (SDxLE)  $F_1$ , ( ver tabla ). El análisis de estos datos por pruebas de t, reveló que los grupos de ratas inmunizados con DNP<sub>10</sub>-OVA y DNP<sub>3</sub>-Cit-c no mostraron variación significativa debida al sexo en sus respuestas de IgG anti DNP. Por el contrario en el grupo de ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS, se observó que los machos tuvieron una respuesta de IgG anti DNP significativamente mayor la encontrada en las hembras. Tabla 15.

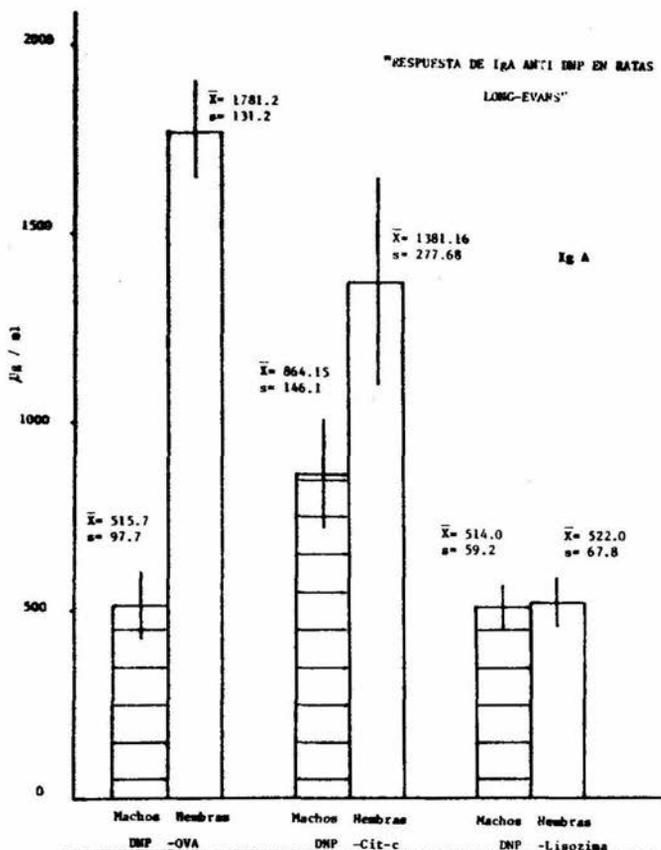


Fig.7 . Respuesta específica de IgA en ratas Long-Evans machos y hembras. Se puede apreciar, que las hembras LE generan respuestas de IgA significativamente mayores que los machos, hacia los conjugados DNP-OVA y DNP-Cit-c; pero no DNP-LIS, (pues esta última respuesta no mostró variación debida al sexo). (Nota: la respuesta de IgA anti DNP se presenta en la gráfica en Ug/ml).

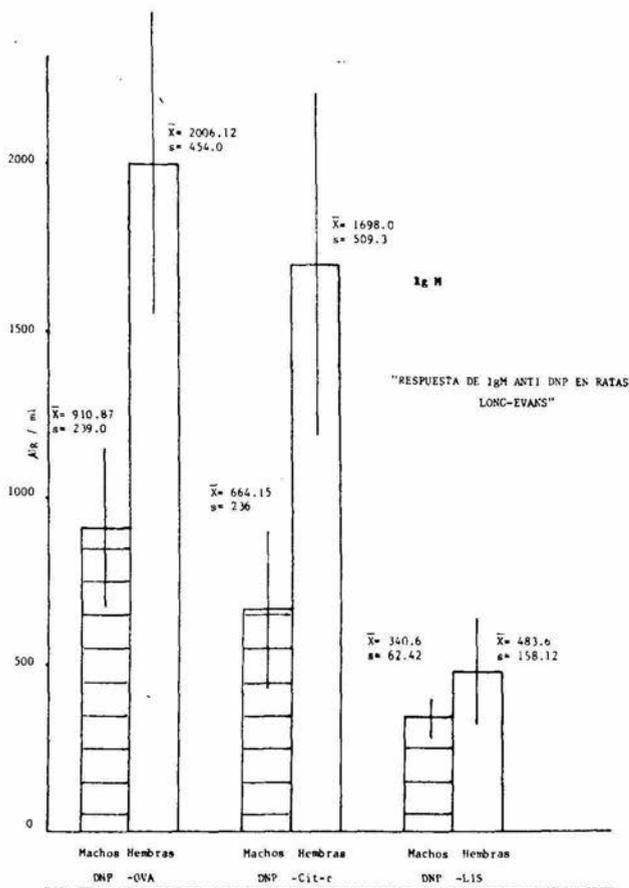


Fig. 8 . Respuesta específica de IgM en ratas Long-Evans de ambos sexos. La figura muestra, que las hembras generan respuestas de IgM significativamente mayores que los machos, en las ratas LE inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-LIS. (Nota: La respuesta de IgM anti DNP se indica en Ug/ml).

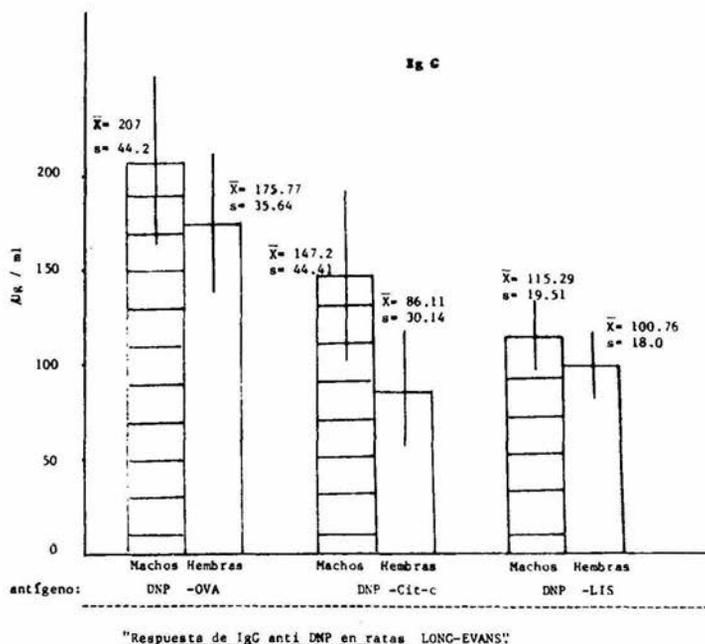


Fig.9 . Respuesta específica de IgG en ratas machos y hembras de la cepa Long-Evans. Se observa que en las ratas inmunizadas con DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-LIS, los machos presentan respuestas de IgG mayores a las de las hembras; pero tales diferencias no son significativas. (Nota: La respuesta de IgG anti DNP se indica en  $\mu\text{g/ml}$ ).

Tabla 14 .

RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS ANTI DNP; EN RATAS DE LA CEPA LONG-EVANS. (  $\mu\text{g} / \text{ml}$  )

$\mu\text{g}/\text{ml}$	RESPUESTA DE IgA		RESPUESTA DE IgG		RESPUESTA DE IgM		
	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	
DNP - OVA	$\bar{X} =$	515.78	1781.25	207	175.77	910.87	2006.125
	$s =$	97.76	131.25	44.21	35.64	239	45.1
DNP - Cyt-c	$\bar{X} =$	864.15	1381.16	147.22	86.11	664.15	1698
	$s =$	146.1	277.68	44.41	30.14	236	509.302
DNP - LIS	$\bar{X} =$	514	522	115.29	100.76	340.62	483.6
	$s =$	59.2	67.8	19.51	18.0	62.42	58.12
CONTROLES	$\bar{X} =$	8.9	5.3	6.3	4.9	18.9	16.4
	$s =$	4.22	3.3	2.8	1.7	5.34	4.27

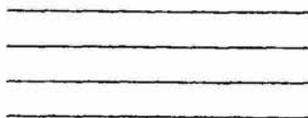
Tabla 15 .

P R U E B A S   D E   t

DIFERENCIAS ENTRE RATAS DE LA CEPA LONG-EVANS, MACHOS Y HEMBRAS, EN SUS RESPUESTAS INMUNES ESPECIFICAS ANTI DNP .

ANTIGENO	RESPUESTA DE IgA	RESPUESTA DE IgM	RESPUESTA DE IgG
DNP <sub>10</sub> -OVA	$p < 0.0001$	$p < 0.001$	$p > 0.1$
DNP <sub>4</sub> -LIS	$p > 0.1$	$p < 0.001$	$p < .05$
DNP <sub>3</sub> - Cit-c	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.1$

## D I S C U S I O N



- I. CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA EN RATAS.
- II. CARACTER DOMINANTE DE LA ALTA RESPUESTA DE IgA ESPECIFICA.
- III. CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgM, EN RATAS.
- IV. CARACTER DOMINANTE DE LA ALTA RESPUESTA DE IgM ESPECIFICA.
- V. RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG EN RATAS LONG\_EVANS Y SPRAGUE DAWLEY INMUNIZADAS CON DNP<sub>4</sub>- LIS.
- VI. RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG EN HIBRIDOS (SDxLE)F<sub>1</sub> INMUNIZADOS CON DNP<sub>4</sub>- LIS.
- VII. RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA EN RATAS LE Y (SDxLE) F<sub>1</sub>; MACHOS Y HEMBRAS.
- VIII. RESPUESTA ESPECIFICA EN RATAS LE Y (SDxLE)F<sub>1</sub>; MACHOS Y HEMBRAS.
- IX. RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG EN RATAS LE Y (SDxLE)F<sub>1</sub>; MACHOS Y HEMBRAS.
- X. MECANISMOS PROPUESTOS PARA EXPLICAR LAS DIFERENCIAS ENTREMACHOS Y HEMBRAS, EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA e IgM; EN RATAS.

## DISCUSION .

### I.- CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE ANTICUERPOS DE LA CLASE IgA, EN RATAS.

Al comparar la respuesta anti DNP de anticuerpos IgA, entre ratas machos y hembras de las cepas Long-Evans y Sprague-Dawley, inmunizadas con el conjugado DNP<sub>4</sub>-LIS, se encontró lo siguiente: Los machos y las hembras Long-Evans produjeron respuestas de IgA específicas, significativamente mayores que los machos y las hembras Sprague-Dawley respectivamente. En base a esta diferencia encontrada, en la respuesta específica de IgA entre las dos cepas endogámicas de ratas utilizadas, se consideró que ésta clase de respuesta se encuentra genéticamente controlada.

Nuestros resultados indicaron, que las ratas Long-Evans son altas respondedoras para el antígeno DNP-LIS; mientras que las ratas Sprague-Dawley son respondedoras intermedias. Por otro lado, cabe recordar que al comparar la respuesta de IgA anti DNP entre las ratas controles de las cepas Long-Evans y Sprague-Dawley, no se encontraron diferencias significativas.

También se estudió el efecto del sexo, en cada cepa, en la respuesta específica de anticuerpos IgA hacia DNP-LIS; y se encontró que: i) En las ratas Sprague-Dawley, la respuesta específica de IgA fue significativamente mayor en las hembras que en los machos, pero ii) En las ratas Long-Evans, no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en su respuesta de IgA específica.

En los grupos de ratas controles, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta de IgA anti DNP, entre las ratas Long-Evans y las ratas Sprague-Dawley. Tampoco se encontró variación significativa debida al sexo en la respuesta de IgA anti DNP, de los controles Long-Evans y Sprague-Dawley.

---

Existen reportes que indican que existe un control genético de los niveles de IgA en ratones. Nuestros resultados indican, que la respuesta específica de anticuer

pos IgA, en ratas, se encuentra genéticamente controlada; ya que al comparar la respuesta anti DNP de anticuerpos clase IgA entre dos cepas de ratas endogámicas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS, encontramos diferencias significativas.

Por otro lado, se observó que existe influencia del sexo en la respuesta de IgA específica, en las ratas SD inmunizadas con DNP-LIS, pero no en las LE. Es posible que las hembras SD produzcan respuestas de IgA hacia DNP-LIS significativamente mayores que los machos, debido a la acción de genes de respuesta específica de IgA ligados al cromosoma X, los cuales no sufren compensación de dosis. Aunque, no se puede descartar la acción de las hormonas sexuales en la respuesta de IgA. Más adelante discutiremos con mayor detalle este aspecto, del efecto del sexo en la respuesta específica de IgA.

Para averiguar si las ratas LE carecían de genes de respuesta específica de IgA ligados al cromosoma X, hacia todos los antígenos, se decidió probar otros antígenos (DNP-OVA y DNP-Cit-c) en otros grupos de ratas Long-Evans. La discusión de tales resultados se presenta más adelante.

---

## II.- CARACTER DOMINANTE DE LA ALTA RESPUESTA DE IgA ESPECIFICA, EN RATAS.

En base a los resultados anteriores, los cuales mostraban que la respuesta de IgA específica está genéticamente controlada, se decidió estudiar si la alta respuesta de IgA hacia DNP-LIS, encontrada en las ratas LE, se transmitía a la progenie como un carácter dominante sobre la respuesta intermedia presentada por las ratas SD, o al contrario. Para lo cual se obtuvieron híbridos, de la cruce de hembras SD y machos LE. Los híbridos formados (SDxLE)<sub>F1</sub> se inmunizaron con DNP<sub>4</sub>-LIS. En los resultados se pueden apreciar dos aspectos principalmente : a) Se observó que los híbridos producían altas respuesta de IgA específicas contra DNP-LIS, como las encontradas en la cepa paterna LE ( y en algunos casos aún mayores, sobre todo en las hembras). Por lo anterior, nuestros resultados indican que: " La habilidad para generar altas respuestas específicas de anticuerpos IgA, se transmite a la progenie como un carácter dominante, en las ratas" . Fig 10

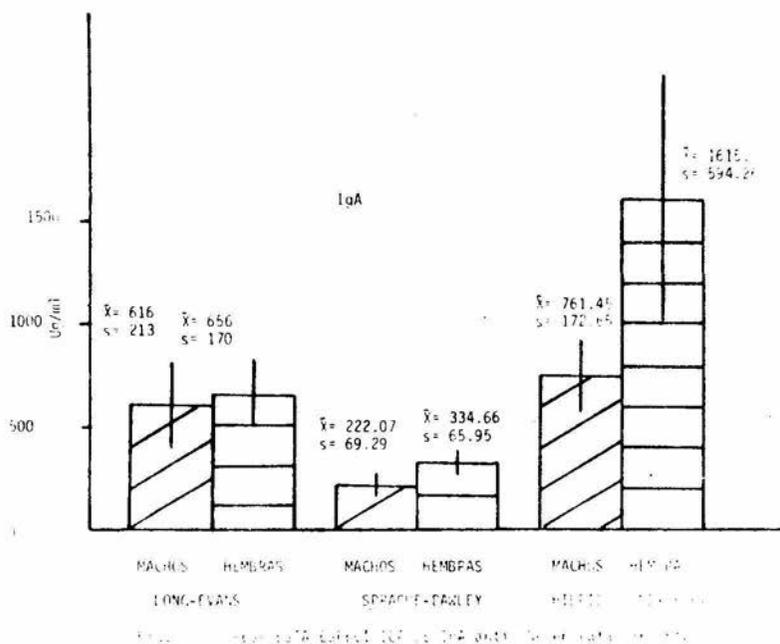


Fig 10. Respuesta específica de IgA anti DNP en ratas LE, SD y (SDxLE) $F_1$  inmunizadas con DNP-LIS. Se observa que la respuesta de las ratas LE es alta, que las ratas SD tienen respuestas intermedias y que en los híbridos la respuesta de IgA es alta en los machos y en las hembras es significativamente mayor. Estos resultados indican que el carácter de alta respuesta específica de IgA en las ratas, se transmite de manera dominante sobre el de respuesta intermedia. Por otra parte se observa que las hembras SD y (SDxLE) $F_1$  producen respuestas de IgA anti DNP-LIS significativamente mayores a las de los machos; pero en las ratas LE no se observan tales diferencias entre sexos.

b) Al comparar la respuesta de IgA específica, entre machos y hembras, en las ratas híbridas (SDxLE)F<sub>1</sub> inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS, se encontraron resultados similares a los obtenidos en las ratas SD inmunizadas con el mismo antígeno; aunque las diferencias entre sexos, fueron aún más marcadas en los híbridos. Estos resultados que indican, que las hembras producen respuestas de IgA específicas significativamente mayores a los machos, en las ratas híbridas F<sub>1</sub> inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS, sugieren que en los híbridos también actúan genes de respuesta específica de IgA ligados a X, como en las ratas SD. Aunque resta explicar, cómo es que esto ocurre, teniendo en cuenta que en la cepa paterna LE, no existen diferencias en la respuesta específica de IgA hacia DNP-LIS.

### III.- CONTROL GENETICO DE LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgM, EN RATAS.

De manera similar, a los resultados de la respuesta específica de IgA, los resultados de la respuesta específica de IgM en las ratas inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS indicaron que: Los machos y las hembras Long-Evans produjeron respuestas de IgM anti DNP significativamente mayores que los machos y las hembras Sprague-Dawley, respectivamente. Entonces, la respuesta específica de IgM se encuentra controlada genéticamente en las ratas. Se ha reportado, que la respuesta T-dependiente de IgM se encuentra bajo control de genes-Ir ligados al MHC, situados en la región IA; por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo con la literatura, y es probable que el loci genético que controla en la rata, la respuesta específica de IgM hacia DNP<sup>LIS</sup>, también se localice en la región IA del MCH de la rata. (9,13)

Se observó, que la respuesta de IgM anti DNP en las ratas controles, difería significativamente entre las ratas Long-Evans y Sprague Dawley - ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la respuesta específica de IgM, entre machos y hembras, en cada cepa; se encontró lo siguiente: a) Tanto en las ratas LE como en las SD, las hembras presentaron respuestas de IgM hacia DNP-LIS significativamente mayores a las de los machos. Tales diferencias serán -

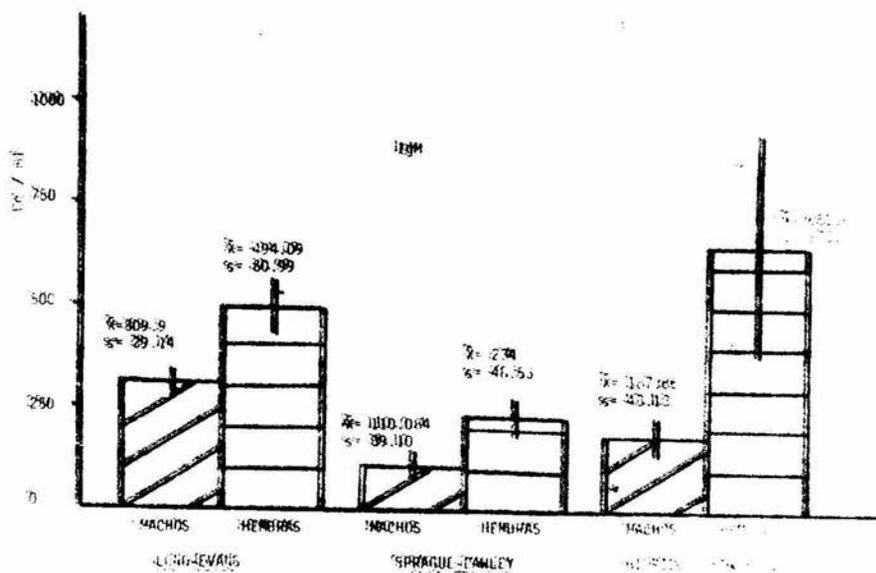


Fig. 10. Respuesta específica de IgM anti DNP en ratas inmunizadas con DNP-LIS.

Fig. 11. Respuesta específica de IgM anti DNP en ratas LE, SD y  $(SD \times LE)F_1$  inmunizadas con DNP-LIS. Se puede apreciar que tanto las ratas LE como los híbridos hembras generan altas respuestas, mientras que las ratas SD y los machos híbridos tienen respuestas intermedias. Esto indica que el carácter de alta respuesta específica de IgM en ratas se transmite de manera dominante sobre el de respuesta intermedia en las hembras; y al contrario en los machos. Por otro lado se observa que las hembras de los tres tipos de ratas probadas presentan respuestas de IgM hacia DNP-LIS significativamente mayores que los machos.

discutidas más adelante.

b) Ni en las ratas LE, ni en las SD controles, se encontraron diferencias significativas debidas al sexo, en la respuesta específica de IgM anti DNP.

#### IV.- CARACTER DOMINANTE DE LA ALTA RESPUESTA DE IgM ESPECIFICA, EN RATAS.

Al determinar en los híbridos (SDxLE)  $F_1$  inmunizados con DNP<sub>4</sub>-LIS, la respuesta específica de IgM, observamos que tales respuestas eran similares a las encontradas en las ratas LE; es decir eran altas respuestas comparadas con la respuesta intermedia presentada por las ratas SD. Tales resultados - indicaron por lo tanto, que el carácter de alta respuesta específica de IgM en las ratas, se transmitía de manera dominante sobre el de respuesta intermedia. ( Fig. 11).

Los estudios de inmunogenética de la respuesta inmune, han revelado que las respuestas de una variedad de animales experimentales se encuentran bajo el control de

genes Ir dominantes o codominantes; por lo tanto, en las ratas estudiadas en el presente, muestran otro ejemplo de genes Ir dominantes que regulan la respuesta específica de IgM, hacia un antígeno T-dependiente de limitada complejidad estructural (DNP-Lisozima) <sup>(5,6,13)</sup>.

También se compararon las respuestas específicas de IgM entre machos y hembras, encontrándose lo siguiente: En las ratas híbridas inmunizadas con DNP-LIS, las hembras presentaron respuestas de IgM anti DNP, significativamente mayores a los machos. Pero tales respuestas no mostraron variación debida al sexo en las ratas control.

#### V.- RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG EN RATAS LONG-EVANS Y SPRAGUE DAWLEY INMUNIZADAS CON DNP<sub>1</sub>-LIS.

NO se encontraron diferencias significativas entre las ratas LE y SD en sus respuestas específicas de IgG hacia DNP-LIS, lo cual no implica que ésta respuesta no se encuentra bajo control genético; pues existen amplias evidencias que indican que hay varios genes dentro del complejo H-2, que controlan la habilidad para producir anticuerpos IgG. <sup>(13)</sup> Nuestros resultados simplemente indican, que la respuesta de la clase IgG hacia DNP-LIS no difiere entre las dos cepas de ratas analizadas,; posiblemente ambas cepas posean el mismo gene Ir de IgG de baja respuesta para DNP-LIS.

En la respuesta de IgG hacia DNP-LIS, no se encontraron diferencias significativas debidas al sexo, en ninguna de las dos cepas probadas. La no influencia del sexo en esta clase de respuesta, podría implicar que no existen genes Ir ligados a X que regulen la respuesta específica de IgG; y cabe señalar, que en los machos se encontró una tendencia no significativa (en la mayoría de los grupos de ratas inmunizadas utilizadas) a producir mayores respuestas específicas de IgG.

#### VI.- RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG EN HIBRIDOS (SDxLE)<sub>F1</sub> INMUNIZADOS CON DNP-LIS.

Dado que entre las cepas paternas, LE y SD, no se encontraron diferencias en la respuesta de IgG hacia DNP-LIS, no podemos saber cual caracter se transmite a los híbridos de manera dominante; solo podemos decir, que la respuesta de los híbridos es muy similar a la presentada por los padres. Fig 12

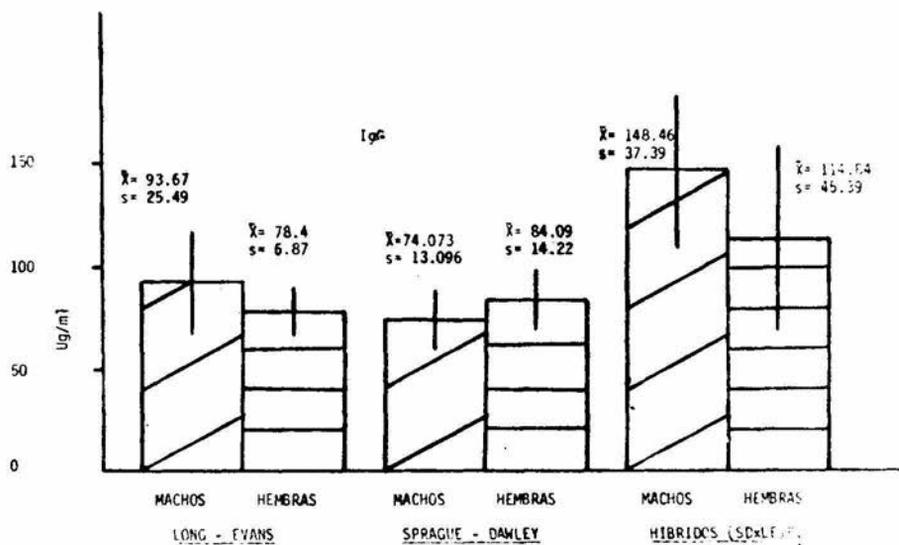


Fig. Respuesta específica de IgG anti DNP en ratas inmunizadas con DNP-LIS (1974).

Fig. 12 Respuesta específica de IgG anti DNP en ratas LE, SD y (SDxLE)<sub>F1</sub> inmunizadas con DNP-LIS. Se observa que la respuesta de las ratas LE y SD es **baja**; mientras que los híbridos tienen respuestas **intermedias** de IgG. Por otra parte, se aprecia que no existe variación significativa debida al sexo en esta respuesta en ninguno de los grupos de ratas probados.

Al estudiar el efecto del sexo en la respuesta específica de IgG, en las ratas híbridas (SDxLE)  $F_1$  inmunizadas con DNP-LIS, se encontró que no existe influencia del sexo en esta clase de respuesta. Estos datos concuerdan con los de las ratas LE y SD inmunizadas también con DNP-LIS, que fueron descritos anteriormente en el presente trabajo.

---

VII. RESPUESTA ESPECÍFICA DE IgA EN RATAS LONG-EVANS Y (SDxLE)  $F_1$ ; MACHOS Y HEMBRAS.

Se estudió la respuesta específica de IgA en relación al sexo, en: a) Ratas Long-Evans inmunizadas con DNP-LIS, DNP-Cit<sup>c</sup> y DNP-OVA; y b) Ratas híbridas (SDxLE)  $F_1$  inmunizadas con DNP-LIS, DNP-OVA, DNP-Cit<sup>c</sup> y DNP-CAT. Y en todos los casos se encontró que las hembras producían respuestas específicas de IgA significativamente mayores a las encontradas en los machos, exceptuando por supuesto las ratas Long-Evans inmunizadas con DNP-LIS.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la respuesta específica de IgA hacia algunos antígenos T-dependientes, simples y complejos, y algunos bajo control de genes Ir, recibe influencia del sexo en las ratas LE, SD, y (SDxLE)  $F_1$ .

La literatura sobre la respuesta de IgA en relación al sexo, es muy escasa\* Únicamente se ha descrito lo siguiente:

i) Se ha reportado, que la concentración total sérica de anticuerpos IgA no presenta variación significativa entre hombres y mujeres. (8) Además, Nurmi T, en 1982, no encontró correlación positiva entre el número de cromosomas X presentes y la concentración sérica de IgA (41). Aunque, en los estudios de Butterworth ( 1967), se encontró que las mujeres tenían niveles séricos de IgA ligeramente superiores a los hombres; pero tales diferencias entre sexos no fueron significativas. (8)

ii) Sobre la respuesta específica de IgA en relación al sexo, Únicamente existe el reporte de Aibender (1) 1968, el cual indica que la población femenina tiende a formar anticuerpos anti poliovirus tipo I de la clase IgA e IgG; mientras que, la masculina forma preferentemente IgG. Tal diferencia cualitativa encontrada no fué sin embargo, significativa. (1).

iii) Los ratones con el gen xid, presentan respuestas de anticuerpos IgA anti eritrocitos de carnero, tanto en secreciones como en suero; pero la magnitud de dichas respuestas es menor a la encontrada en ratones normales. (30).

iv) Eskola 1983 ha reportado, que las mujeres con delección del brazo

corto del cromosoma X, tienen defectos en la función de linfocitos B; pues secretan muy pocas cantidades de IgA, IgG e IgM. Además, una de tales pacientes del (Xp) presentaba un estado de inmunodeficiencia, con bajos niveles séricos de inmunoglobulinas; y con respuestas proliferativas de linfocitos deprimidas a: PWM, PHA y Con A. (16).

---

Más adelante se describen dos posibles mecanismos, para explicar las mayores respuestas específicas de IgA hacia antígenos T-dependientes, presentadas en las hembras con respecto a los machos.

---

#### VIII.- RESPUESTA ESPECIFICA DE IgM EN RATAS LONG-EVANS Y (SDxLE) F<sub>1</sub>; - MACHOS Y HEMBRAS.

Al determinar la respuesta específica de IgM, en las ratas:

- a) Long-Evans inmunizadas con DNP-LIS, DNP-OVA y DNP-Cit-c;
- b) Híbridas (SDxLE)F<sub>1</sub> inmunizadas con DNP-LIS; DNP-OVA, DNP-Cit-c y DNP-GAT; y
- c) Sprague-Dawley inmunizadas con DNP-LIS...

se encontró que las hembras, en todos los casos, producían respuestas

de IgM anti DNP significativamente mayores a los machos. O sea que, esta respuesta hacia antígenos T-Dependientes simples (ÑIS, Cit-c y GAT) y complejos (OVA), conjugados a DNP, recibe influencia del sexo, Probablemente, la acción de genes de respuesta de anticuerpos IgM ligados al cromosoma X, determine las diferencias en la respuesta de IgM hacia antígenos T dependientes entre machos y hembras; en las ratas. Pues, varios autores han reportado la existencia de genes inmunoreguladores de la respuesta de IgM ligados al cromosoma X; por ejemplo podemos citar:

i) Los estudios en humanos, indican que los niveles séricos totales de IgM son significativamente mayores en las mujeres que en los hombres; también se ha observado, que existe una correlación positiva entre el número de cromosomas X presentes y la concentración total de IgM. Por lo anterior, se ha propuesto que existen genes ligados al cromosoma X que regulan la concentración de IgM sérica. (22,41,46)

ii) En ratones, se ha encontrado que la respuesta de IgM hacia varios antígenos T-independientes, como son: el polisacárido del neumococo (2) III, el DNA (38) desnaturalizado, el ácido poli-I: poli-C (50) y la polivinyl pyrrolidona (PVP) (14); es significativamente mayor en las hembras que en los machos. Se piensa que la respuesta de IgM contra los antígenos T-independientes se encuentra controlada por genes ligados al cromosoma X, por

lo anterior; y además existen otras evidencias que apoyan esta suposición, v.g. podemos mencionar que:

a) El ratón CBA/N tiene una inmunodeficiencia recesiva ligada a X; tal defecto, ya ha sido mapeado (xid). El gen xid es el responsable de los defectos inmunes encontrados en estos ratones, los cuales incluyen: bajos niveles séricos de IgM, ausencia de respuesta inmune hacia los antígenos T independientes tipo 2 y falta de un subconjunto de células B de maduración tardía. El gen xid podría ser un gen críptico en el ratón CBA/N; y el alelo funcional de este gen, seguramente además de regular la expresión de los antígenos de diferenciación de aparición tardía, en las células B: Byb-3, Lyb-5, Lyb-7 e IaW39, sea el responsable de los mayores niveles séricos totales de IgM y de las mayores respuestas de IgM hacia antígenos T independientes que presentan las hembras, con respecto a los machos. Pues las hembras, por la presencia de un cromosoma X más que los machos, tendrían dos alelos funcionales del gen xid y los machos solo uno; claro, que esto solo puede ocurrir en ausencia de la compensación de dosis propuesta por M. Lyon. (25,26,47)

b) La naturaleza del control genético de la respuesta inmune ligado al cromosoma X, es consistente con la regulación específica del antígeno, v.g., la cepa DBA/2, tiene una respuesta inmune alta para poli (I): poli (C) y una respuesta inmune baja para DNA desnaturalizado y SIII; mientras que la cepa S.J./J tiene una respuesta alta para DNA desnaturalizado y una res —

puesta inmune baja para DNA desnaturalizado y SIII; mientras que la cepa SJL/J tiene una respuesta alta para DNA desnaturalizado y una respuesta - baja para poli (I): poli (C) y SIII. Se ha descrito un sistema de aloan - tígenos polimórficos controlado por loci genéticos en el cromosoma X, que se asocian a los genes de respuesta inmune ligados a X que controlan la - respuesta inmune hacia los antígenos T-independientes. (67)

c) En los ratones, se ha reportado que las hembras tienen una respues - ta primaria ( IgM) y secundaria (IgG) de mayor intensidad y duración que - los machos, hacia varios antígenos T-dependientes como: la albúmina séri - ca bovina (59), los glóbulos rojos (14) y la gamaglobulina humana altamen - te dinitrofenilada. (39) La respuesta de anticuerpos hemoaglutinantes com - tra antígenos virales y bacterianos, también es mayor en las hembras que - en los machos (48, 36) ( esto podría explicar el por qué las hembras pre - sentan una menor frecuencia de enfermedades infecciosas). (44)

En base a las observaciones anteriores, se ha postulado la existencia - de genes ligados al cromosoma X, que controlan la respuesta inmune de anti - cuergos IgM a los antígenos T-dependientes; tales genes, podrían regular - también la respuesta hacia otros antígenos T-dependientes como el GAT (12) y la nucleasa del estafilococo, (43), ya que se ha reportado que dichas - respuestas muestran diferencias cuantitativas y cualitativas no asociadas - al complejo mayor de histocompatibilidad.

Es probable, que los mismos loci ligados a X que regulan la concentración de IgM influyan sobre la respuesta específica de IgM, hacia los antígenos T-dependientes y T-independientes; aunque por lo pronto aún falta investigación al respecto.

---

Más adelante, se discuten los mecanismos propuestos para explicar por qué las hembras en el presente trabajo presentaron respuestas de IgM específicas significativamente mayores que los machos, contra la serie de antígenos T-dependientes conjugados a DNP utilizados.

---

IX- RESPUESTA ESPECIFICA DE IgG EN RATAS LONG-EVANS Y (SDxLE) F<sub>1</sub>; MACHOS Y HEMBRAS.

En las ratas: a) Long-Evans inmunizadas con DNP-LIS, DNP-OVA y DNP-Cit-c; b) Híbridas (SDxLE) F<sub>1</sub> inmunizadas con DNP-LIS, DNP-OVA, DNP-GAT; y c) Sprague-Dawley inmunizadas con DNP-LIS, se encontró que la respuesta específica de anticuerpos IgG no recibía influencia del sexo, ya que no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en dichas respuestas.

Por lo anterior nuestros resultados indican, que en las ratas, la respues-

ta específica de IgG hacia los antígenos T dependientes simples y complejos probados, no muestra variaciones significativas entre machos y hembras; aunque en varios grupos de ratas, se observó que los machos tendían a producir respuestas de IgG mayores que las hembras, pero tal variación sólo fue significativa en uno de los dos grupos de ratas Long-Evans inmunizadas con DNP-LIS.

Las evidencias experimentales referentes a la respuesta de IgG en relación al sexo, indican lo siguiente:

a) Existe controversia sobre la influencia del sexo en los niveles séricos totales de anticuerpos IgG, pues hay reportes que indican que no hay diferencias significativas entre hombres y mujeres, en cuanto a la concentración total de IgG; (8,22,46) y por el contrario, Nurmi encontró una correlación positiva de éstos niveles con el número de cromosomas X presentes. (41)

b) Hay datos que indican que la respuesta secundaria (75) y terciaria de las hembras hacia antígenos T dependientes complejos como BSA y eritrocitos, determinada por Farr y hemoaglutinación respectivamente, es mayor a la de los machos. (59,14)

De lo anterior, se puede apreciar que no se puede concluir con certeza si existe o no, efecto del sexo en la respuesta específica de IgG, ni si tal comportamiento de la respuesta es igual en todas las especies con

sistema inmune desarrollado y para todo antígeno. Nuestros resultados sin embargo indican, que en las ratas utilizadas no hay efecto del sexo en la respuesta específica de IgG hacia los antígenos T dependientes; y son contrarios a los resultados obtenidos en trabajos realizados en ratones. Aunque cabe mencionar, que el método de ELISA usado en el presente trabajo, es más sensible y específico que los métodos utilizados en ratones para cuantificar IgG.

X.-MECANISMOS PROPUESTOS PARA EXPLICAR LAS DIFERENCIAS ENTRE MACHOS Y HEMBRAS, EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA e IgM; EN RATAS.

Para explicar porqué las respuestas específicas de anticuerpos IgA e IgM fueron significativamente mayores en las hembras que en los machos; en los grupos de ratas Long-Evans, Sprague-Dawley y (SDxLE) F<sub>1</sub>, inmunizados con los ya citados antígenos T-dependientes conjugados a DNP, se proponen los siguientes mecanismos:

a) Las diferencias entre machos y hembras en sus respuestas inmunes específicas de IgA e IgM, pueden deberse a la acción de genes de respuesta de IgA e IgM respectivamente, ligados al cromosoma X. Pues, las hembras por la presencia de dos cromosomas X tendrían una doble dosis de éstos genes inmunoreguladores, en relación a los machos, y por lo tanto formarían respuestas de IgA e IgM específicas mayores que los machos.

Para que la suposición anterior sea válida, debemos asumir que la hipótesis alternativa de LYON es correcta; es decir, que existen loci en el cromosoma X inactivo de las hembras que no sufren compensación de dosis y que los genes que regulan la respuesta de IgA e IgM hacia los antígenos T-dependientes, en la rata, se localizan en alguna de éstas áreas sin inactivación. (33,37,40)

b) El siguiente modelo, se apoya en las evidencias obtenidas de los trabajos realizados con ratones CBA/N, que presentan el gen *xid* ( X chro -

mosome linked immunodeficiency gene)). Como ya se mencionó, los ratones con el gen *xid* carecen de un subconjunto de células B de maduración tardía en el cual se expresa el antígeno IaW39. El aloantígeno IaW39 es codificado por la subregión I-A del complejo genético H-2; y su expresión es controlada por un gene localizado en el cromosoma X. Por otro lado, la respuesta contra insulina en ratón H-2 depende de la expresión de IaW39 en los macrófagos (Mφ). Se ha propuesto que la maduración funcional y la adquisición de los antígenos Ia por los macrófagos presentadores de antígeno, se encuentra bajo la influencia de genes ligados a X. Si ésta última suposición es correcta, y la hipótesis alternativa de Lyon también; entonces podemos explicarnos por qué la respuesta específica de IgA e IgM hacia los antígenos T dependientes, de las ratas hembras de este trabajo, fué mayor a la de los machos. Pues, por la acción de genes como el alelo funcional del gen *xid*, localizados en el cromosoma X de las hembras, éstas tendrían una mayor expresión de antígenos Ia en la superficie de sus macrófagos; y por lo tanto sus respuestas específicas de IgA e IgM serían mayores que en los machos.

Otras evidencias que apoyan este modelo, son los reportes que indican que los macrófagos de las hembras tienen mayor actividad fagocítica y mayor eficiencia en la presentación del antígeno que los macrófagos de los machos. (54, 55, 63).

Este modelo que propone la existencia de genes que regulan la expresión de antígenos Ia en la membrana del macrófago localizados en el cromosoma X, no explica por qué no se encontraron diferencias significativas también, en la respuesta de IgG específica entre machos y hembras. Aunque podríamos apoyar nuestros resultados, en la observación de Diana Popp que dice que los niveles de IgG en el ratón son controlados independientemente de la regulación de IgA e IgM; y que éstas dos últimas inmunoglobulinas son regladas por un mismo loci genético. Claro, que no hay que olvidar que en el presente trabajo determinamos respuestas específicas de inmunoglobulinas; y no niveles totales de Igs. ( Tomado de 9)

---

Los dos modelos anteriores son genéticos, pero también las hormonas sexuales esteroides podrían influir en la respuesta específica de IgA e IgM; pues existe gran número de evidencias que indican que las diferencias existentes entre machos y hembras en su sistema inmune, están determinadas por sus diferencias hormonales.

Claro que tampoco se puede descartar la posibilidad de que ambos mecanismos; hormonales y genéticos ligados al cromosoma X, actúan sobre el sistema inmune y son los responsables de las diferencias encontradas en el presente trabajo en la respuesta específica de IgA e IgM entre ratas machos

y hembras.

A continuación se citan las evidencias que apoyan la acción de las hormonas en sistema inmune:

c) Se ha reportado, que las hormonas femeninas al contrario de las masculinas incrementan las respuestas inmunes específicas: humoral, actividad de células T cooperadoras y citotóxicas y la actividad presentadora del antígeno de los macrófagos.

Las hormonas masculinas suprimen la producción de anticuerpos; además los machos castrados presentan respuestas inmunes específicas comparables a las de las hembras hacia antígenos T independientes y T dependientes. Las hormonas masculinas, también inhiben la producción de autoanticuerpos. (14,21,53)

En base a estas evidencias, podemos explicarnos por qué las hembras produjeron respuestas IgA e IgM específicas significativamente mayores que los machos, hacia una serie de antígenos T dependientes.

d) Por otro lado, se ha reportado que la testosterona inhibe la producción de IL 2 en células de bazo. La IL2 es un factor que podría contribuir a la respuesta inmune aumentada presentada por las hembras ( con respecto a los machos).

Para producir IL2 los linfocitos T  $\text{Lyt-1}^+\text{Z}^-$ , deben interactuar con macrófagos que expresen el antígeno Ia o con el medidor IL 1.

Entonces, si los genes ligados a X aumentan la expresión de los antígenos Ia en la superficie de los macrófagos; podemos suponer que como resultado de un aumento en la producción de IL-2 las hembras generen mayores respuestas inmunes específicas. (63)

Otro mecanismo para explicar las mayores respuestas de IgA específicas encontradas en las hembras respecto a los machos, es el siguiente:

e) Las hormonas femeninas como estrógenos y progesterona, producen un aumento en la expresión de antígenos Ia en las células epiteliales(31). Los antígenos Ia en estas células pueden influir en la maduración preferencial de linfocitos B productores de anticuerpos IgA. por lo que las hembras como resultado de una mayor expresión de antígenos Ia sobre las células epiteliales, tendrán un mayor número de células productoras de anticuerpos IgA y consecuentemente mayores títulos de anticuerpos de esta clase. este mecanismo, permite explicar por qué no hay diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos IgG entre machos y hembras, ya que esta respuesta no se encuentra relacionada con la presencia de células epiteliales que expresan antígenos Ia.

---

## CONCLUSIONES .

Los resultados presentados en éste estudio, aportan mayores bases a favor de la hipótesis que sugiere que las diferencias en cuanto a longevidad y susceptibilidad a enfermedades infecciosas, existentes entre machos y hembras, se deben principalmente a que el sistema inmune de las hembras es superior al de los machos; a causa de una doble dosis de genes inmunoreguladores ligados a X, en relación a los machos y por las diferencias hormonales existentes entre machos y hembras.

En resumen nuestros resultados indicaron lo siguiente:

1) La respuesta específica de anticuerpos IgA en las ratas se encuentra genéticamente controlada; y el caracter de alta respuesta se transmite a la progenie de manera dominante, sobre el caracter de respuesta intermedia.

2) La respuesta específica de IgM mostró diferencias entre las dos cepas de ratas endogámicas utilizadas y por lo tanto nuestros datos dan mayor apoyo a los reportes que indican que ésta respuesta se encuentra genéticamente controlada. Se corroboró también que el caracter de alta respuesta se transmite dominantemente sobre el de respuesta intermedia.

3) La respuesta específica de IgG hacia DNP-LIS, no mostró diferencias significativas entre las ratas Long-Evans y Sprague-Dawley.

RESPECTO AL EFECTO DEL SEXO EN LA RESPUESTA ESPECIFICA DE IgA, IgM e IgG se encontró que:

4) La respuesta específica de IgA hacia varios antígenos T dependientes fue significativamente mayor en las ratas hembras que en los machos, (Exceptuando la respuesta a DNP-LIS de las ratas Long-Evans).

5) En todos los grupos de ratas utilizados, la respuesta específica de IgM hacia los antígenos T dependientes conjugados a DNP fue significativamente mayor en las hembras que en los machos.

6) La respuesta específica de IgG no mostró influencia del sexo en las ratas inmunizadas con los antígenos T dependientes conjugados a DNP utilizados: OVA, LIS, Cit-c y GAT ; aunque en un grupo de ratas LE inmunizadas con DNP<sub>4</sub>-LIS tal respuesta fue significativamente mayor en los machos.

Se proponen mecanismos genéticos y/o hormonales para explicar la variación debida al sexo de las respuestas específicas de anticuerpos IgA e IgM. Pero cabe mencionar, que las bases para explicar este fenómeno, son aún inciertas; debido a que el estudio del sistema inmune en relación al sexo, ha sido poco abordado. Por lo cual, para ampliar el presente proyecto, se sugiere :

A) Determinar los niveles totales de anticuerpos IgA, IgG e IgM en ratas normales; para corroborar si en las ratas, éstas respuestas se comportan de manera similar a lo observado en humanos. Es decir, que solo los niveles séricos de IgM son influenciados por el cromosoma X; y que no existe diferencia significativa entre sexos, en cuanto a los niveles de IgA e IgG. De ser así, entonces podríamos pensar que existen genes ligados a X que regulan las respuestas específicas de IgA, pero no influyen en los niveles séricos totales de IgA.

B) Sería interesante también determinar la respuesta de IgA, IgM e IgG hacia antígenos T-dependientes, en ratas tratadas con hormonas sexuales y castradas, de ambos sexos. De esta manera ampliaríamos el estudio de la influencia de las hormonas sobre el sistema inmune, observando de que modo influyen los diferentes tipos de hormonas sexuales esteroides en la respuesta inmune específica de cada clase de inmunoglobulina.

C) Son muchos los estudios posteriores al presente que se pueden proponer, aunque yo dé únicamente tres sugerencias. El tercer proyecto que propongo, es el de estudiar la respuesta específica de las diferentes clases de inmunoglobulinas en otras especies animales; incluyendo aves y reptiles.

---

FIN

#### BIBLIOGRAFIA .

- 1.- Aibender, E., Weisinger, R. & Hevivy, M. "Diferences in the immunoglobulin class of polioantibody in the serum of men and women". J. Immunol. 101: 92, 1968.
- 2.- Amsbaugh, D.F., Hansen, C.T., Prescott, B., Stashak, P.W., Bathold, D.R. & Baker, P.J. "Genetic control of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice". J. Exp. Med. 136: 931, 1972.
- 3.- Asmar, B., Sluis, T., Reed, J., et al. "Hemophilus influenza type B pneumonia in 43 children". J. Pediatr. 93: 389, 1978.
- 4.- Batchelor, J.R. & Chapman, B.A. "The influence of sex upon the antibody response to an incompatible tumor". Immunology. 9: 553, 1965.
- 5.- Benacerraf, B. & Unanue, E.R. "Textbook of Immunology" Ed. Williams & Wilkins. Baltimore/London. 1981. p.p. 3, 4, 6, 7, 13-18, 24, 61, 64, 68, 189-194, 183, 184, 151.
- 6.- Benacerraf, B. & Katz, B.H. "The Histocompatibility linked immune response genes" Adv. Cancer. Res. 21: 121, 1975.
- 7.- Berning, A.K., Eicher, E.M., Paul, W.E. & Scher, I. "Mapping of the X-linked immune deficiency mutation (xid) of CBA/N mice". J. Immunol. 124: 1875, 1980.
- 8.- Butterworth, M., McClellan, B. & Allansmith, M. "Influence of sex on Immunoglobulin Levels". Nature. 214: 1224, 1967.
- 9.- Campos, R.R., "Control genético de la respuesta de anticuerpos clase IgA". Tesis Doctoral ENCB- IPN 1984.
- 10.- Clausen, J. "Técnicas Inmunoquímicas para la identificación y estimación de Macromoléculas". Ed. El Manual Moderno S.A. México, D.F. 1975. pp 18, 22, 36, 42.
- 11.- Delage, G., McLaughlin, B., & Berthiaume, L. "A clinical study of rotavirus gastroenteritis". J. Pediatr. 93: 455, 1978.
- 12.- Dorf, M.E., Donham, E.K., Johnson, J.P. & Benacerraf, B. "Genetic Control of the immune response: The effect of Non-H-2 linked genes on antibody production". J. Immunol. 112: 1329, 1974.
- 13.- Dorf, M.E. "The role of the MCH in immunobiology". Garland STPM Press. New York & London 1981. Cap. 6 pp 221.
- 14.- Eidinger, D. & Garret, T.J. "Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stemcell differentiation". J. Exp. Med. 136: 1098, 1972.
- 15.- Eisen, H.N., Carstein, M.E. & Belman, S. "Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. III. The 2,4-dinitrophenyl group as a determinant in the precipitin reaction. J. Immunol. 73: 296, 1954.

- 16.- Eskola, J., Nurmi, T. & Ruuskaen, O. "Defective B cell function associated with inherited interstitial deletion of the short arm of the X chromosome". *J. Immunol.* 131: 1218, 1983.
- 17.- Festenstein, H & Démant, P. "Inmunogenética Fundamental, Biología y aplicaciones clínicas de HLA y H-2". Ed. El Manual Moderno. México. D.F. 1981. pp. 83, 127, 187, 226, 244.
- 18.- Fudenberg, H.H., Caldwell, J.L., Stites, D.P. & Wells, J.V. "Inmunología clínica" 3a. Ed. El Manual Moderno S.A. México D.F. 1982. pp 98 117, 176, 226, 351, 418.
- 19.- Gardner, E.J. "Principios de Genética". Ed. Limusa. México D.F. 1979. pp 147-150, 155, 156.
- 20.- Good, A.R. & Fisher, W.D. "Immunobiology" Espaxs. Barcelona, Esp. 1977. pp 3, 179.
- 21.- Graff, R.J., Lappé, M.A. & Snell, G.D. "The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts". *Transplantation.* 7: 105, 1969.
- 22.- Grúnbacher, F.J. "Human X chromosome carries quantitative genes for Immunglobulin M". *science*, 176: 311, 1972.
- 23.- Herskowitz, I.H. "Principles of Genetics". Collier Mac Millan Editions. 2nd Edition. New York U.S.A. 1977 pp 436, 522-524, 525.
- 24.- Hood, E.L; Wood, B.W; Weissman, L.I. "Immunology" The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, 1978. pp 56, 59, 62, 64.
- 25.- Huber, B.T. "Antigenic marker on a functional subpopulation of B cells, controlled by the I-A suregion of the H-2 complex". *Proc. Natl. Acad.Si.* 76: 3460, 1979.
- 26.- Huber, B.T., Jones, P.P. & Thorley-Lawson, D. "Structural analysis of a new B-cell-differentiation antigen associated with products of the I-A subregion of the H-2 complex. 78: 4525, 1981.
- 27.- Hudson, L. & Hay, F.C. "Inmunología Práctica". Ed. Jims. Barcelona/España. 1979. pp 3, 6, 35, 137, 238.
- 28.- Kabat, E.A., Mayer, M. "Inmunología Experimental". La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1968. pp 11, 79-84, 94.
- 29.- Katz, F.E. & Steward, M.W. "Studies on the genetic control of antibody affinity. *J. Immunol.* 117: 477, 1976.
- 30.- Kiyono, H., Mosteller, L.M., Edridge, J.H., Michalek, S.M. & Mc Ghee, J.R. "IgA response and secretory antibody production". *J. Immunol.* 131: 2616, 1983.
- 31.- Klareskog, L., Forsum, U. & Peterson, P.X. "Hormonal regulation of the expression of Ia antigens on mammary gland epithelium". *Eur. J. Immunol.* 10: 958, 1980.

- 32.- London, W.T. & Drew, J.S. "Sex differences in response to hepatitis B infection among patients receiving chronic dialysis treatment". Proc.Natl.Acad.Sci. 74: 2561, 1977.
- 33.- Lyon, M.F. "Evolution of X-chromosome inactivation in mammals" Nature 250 : 651, 1974.
- 34.- Mazié, J.C., Joskowics, M. & Thezé, J. "Expression of GAT-715 idiotype by GAT-specific plaque forming cells from various strains of mice". Cell.Immunol. 61: 280, 1981.
- 35.- Mc Miller, M.M. "Differential mortality by sex in fetal and neonatal deaths". Science 204: 89, 1979.
- 36.- Michaels, R.H. & Rogers, K.D. "A sex difference in Immunologic Responsiveness". Pediatrics 47: 120, 1971.
- 37.- Mohandas, T., Sparkes, R.S., Hellkuhl, B., Grzeschik, K.H. & Shapiro, L.J. "Expression of an X-linked gene from an inactive human X chromosome in mouse-human hybrid cells: Further evidence for the non inactivation of the steroid sulfatase locus in man" Proc.Natl.Acad.Sci. 77: 6759, 1980.
- 38.- Mozes, E. & Fuchs, S. "Linkage between immune response potential to DNA and X chromosome". Nature 249: 167, 1974.
- 39.- Newton, R.C. & Warner, C.M. "Genetic Control of the immune response of mice to highly dinitrophenylated human gamma-globulin DNP<sub>56</sub>HGG". J.Immunol. 124: 223, 1980.
- 40.- Nora, J.J., Fraser, F.C. "Genética Médica" La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1980.
- 41.- Nurmi, T. "The association of serum IgM and IgG levels with the number of X chromosomes in patients with abnormal number of X chromosomes". J.Immunogenet. 9: 155, 1982.
- 42.- Olsen, R.G., & Krakowka, S. "Inmunología e Inmunopatología de animales domésticos". Ed. El Manual Moderno. 1983.

- 43.- Pisetsky,A.S., Berzofsky,J.A., & Sachs,D.H. "Genetic control of the immune response to Staphylococcal nuclease. VII. Role of non H-2 linked genes in the control of the antinuclease antibody response." J.Exp.Med. 147: 396, 1978.
- 44.- Purtilo,D.T. & Sullivan,J.L. "Immunological Bases for Superior Survival of Females". Am.J.Dis.Child. 133: 1251, 1979.
- 45.- Raveche,E.S., Klassen,L.W. & Steinberg,A.D. "Sex-differences in formation of anti-T cell antibodies." Nature 263: 415, 1976.
- 46.- Rhodes,K.,Markham,R.L.,Maxwell,P.M & Monk-Jones,M.E. "Immunoglobulins and X chromosome". British Medical Journal. 3: 439, 1969.
- 47.- Rosenwasser,L.J. & Huber,B.T. "The xid gene controls IgM39- associated immune response gene function". J.Exp.Med. 153: 1113, 1981.
- 48.- Rowley,M.J. & MacKay,I.R. "Measurement of antibody-producing capacity in man" Clin.Exp.Immunol. 5 : 407, 1969.
- 49.- Sabin,A.B., Krumbiegel,E.R. & Wigand,R. "ECHO type 9 virus disease" Am.J.Dis. Child. 96: 197, 1958.
- 50.- Scher,I.,Frantz,M.M. & Steinberg,A.D. "Immune response to rI-rC " J.Immunol. 110: 1396, 1973.
- 51.- Shulman,S.T. & Ayoob,E.M. "Severe staphylococcal sepsis in adolescents". Pediatrics 58: 59, 1976.
- 52.- Smith,H.R., Chused,T.M. & Steinberg,A.D. "The Effect of the X-linked immune deficiency gene (xid) upon the Y chromosome-related disease of BXSB mice". J.Immunol. 131: 1257, 1983.
- 53.- Stern & Davison. "Effect of estrogen and cortisone on immune hemoantibodies in mice of inbred strains". J. Immunol. 74: 479, 1955.
- 54.- Stern,K. & Duwelius,A. "Hepatic and Splenic uptake of colloidal radiogold in Rat after partial hepatectomy". Proc.Soc.Exper.Biol & Med. 100: 546, 1959.
- 55.- Stern,K. & Duwelius,A. "Phagocytosis in liver and spleen of rats with Lewis Lymphoma". Cancer Research 20: 587, 1960.

- 56.- Stiffel,C., Mouton,D. et.al. "Polygenic regulation of general antibody synthesis in the mouse". *Progress in Immunology*. 2: 203,1974.
- 57.- Stollar,D.B.,Fuchs,S. & Mozes,E. "Immune response of mice to nucleic acids: strain-dependent differences in magnitude and class of antibody production". *J.Immunol.* 111: 121, 1973.
- 58.- Stoop,J.W., Zegers,B.J.,Sander,P.C.,et.al. "Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults". *Clin.Exp.Immunol.* 4 : 101,1969.
- 59.- Terres,G.,Morrison,S.L. and Habicht,G.S. "A quantitative Difference in the Immune Response between Male and Female mice". *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 127:664, 1968.
- 60.- Thompson,P.A. "Techniques in Clinical Immunology" Blackwell Scientific Publications. 2nd Ed. Oxford, 1981.
- 61.- Voller,A.,Bidwell,D. & Barlet. "Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of viral infections,"*En Manual of clinical immunology*. Ed. por Rose,N.R. & Friedman,H. Amer.Soc. Microbiol. Washington, 1976, pp 506.
- 62.- Washburn,T. Medearis,D. & Childs,B. "Sex differences susceptibility by infections". *Pediatrics* 31:57, 1965.
- 63.- Weinstein,Y.,Ran,S. & Segal,S. "Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse". *J.Immunol.* 132:656, 1984.
- 64.- Weiser,R.S.,Myrvik,Q.N. & Pearsall,N.N. "Fundamentals of immunology for students of medicine and related Sciences" Lea & Febiger . USA. 1971.
- 65.- Winchester,A.M. "Genética; Un estudio de los principios de la herencia". CECSA. México,D.F. 1978.
- 66.- Wyle,F.A., & Kent,J.R. "Immunosuppression by sex hormones: The effects upon PHA and PPD - stimulated lymphocytes." *Clin.Exp.Immunol.* 27: 407, 1976.
- 67.- Zeicher,M., Mozes,E. & Lonai, P. "Lymphocytes alloantigens associated with X-chromosome-linked immune response genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 74: 721, 1977.