

BUSQUEDA DE ANTIGENOS HOLANDRICOS O LIGADOS AL CROMOSOMA Y (*)

Por Indalecio Rodolfo Quinteros ⁽¹⁾ y Wilmer J. Miller ⁽²⁾

RESUMEN

Los caracteres genéticos que son heredados "ligados al sexo", en moscas y mamíferos están controlados por genes localizados en el cromosoma X (cromosoma Z de aves), en contraste a los genes que se sitúan en los cromosomas no-sexuales o autosomales.

Se considera que son muy pocos los rasgos controlables por genes ubicados en el cromosoma Y (alternativa en la herencia para X) o en el cromosoma W en aves (alternativa para Z).

FOX et. al. (1965) encontró un posible antígeno ligado a Y en Drosophila, y CELADA y WELSHONS (1962) detectaron uno en lauchas.

Si el control genético de los antígenos ligados al cromosoma Y, se demuestra simple y "dominante" en contraste con su ausencia, actuando de manera similar a como lo hacen la mayoría de los genes que controlan los antígenos, podemos suponer que las sustancias transportadoras de anti-Y o anti-W absorbidas por células XX o ZZ (es decir, provenientes de estas fuentes), están capacitadas para liberar un "reactivo específico" que controle los antígenos Y o W.

Y-LINKED OR HOLANDRIC ANTIGEN STUDY

SUMMARY

Genetic characters which are inherited in a "sex-linked" manner are controlled by genes located on the X chromosome of flies and mammals (the Z chromosome of birds) in contrast to genes on the non-sex chromosomes or the autosomes. A very few traits may be controlled by genes on the Y chromosome (alternative in inheritance to X) or the W chromosome in birds (alternative to Z).

(*) Trabajo realizado en el Department of Genetics de Iowa State University, AMES, Iowa, U. S. A., durante el período de beca externa otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y autorizado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, República Argentina. Entregado para su publicación el 2 de abril de 1969.

(1) Profesor Adjunto Full-time, a cargo de las Cátedras Genética y Biometría y Genética Microbiana (Introducción), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(2) Assistant Professor, Department of Genetics, Iowa State University, AMES, Iowa, U. S. A.

FOX et al. (1959) found such a possible Y-linked antigen in Drosophila, and CELADA and WELSHONS (1962) found one in mice.

If genetic control of Y-linked antigens is simple, and "dominant" to its absence like most antigen controlled genes, then anti-Y or anti-W carrying tissue absorbed by cells of XX or ZZ source should leave a reagent specific for the Y or W controlled antigen.

ANTECEDENTES

Cuando las técnicas microscópicas alcanzaron un completo desarrollo, fue posible comprobar que un par de cromosomas difería de los demás.

También se demostró que los miembros componentes de uno de los pares eran exactamente iguales entre si en uno de los sexos (generalmente el femenino), pero de apariencia o aspecto diferente en el otro sexo y que los dos componentes idénticos en un sexo, eran iguales a uno de los miembros del par desigual del otro sexo.

El cromosoma que estaba presente dos veces en la hembra y una en el macho, fue denominado "cromosoma X". El cromosoma desigual se denominó "cromosoma Y". De esta manera, los dos sexos fueron caracterizados como sigue:

XX = hembra
XY = macho

Por ejemplo, el ser humano de sexo masculino tiene un cromosoma X, un cromosoma Y y 22 pares de otros cromosomas, haciendo un total de 46. La mujer tiene un par de cromosomas X (2 cromosomas X) y también los otros 22 pares existentes en el hombre.

El par especial de cromosomas ha recibido el nombre de CROMOSOMAS SEXUALES y los pares diferentes a éstos, fueron denominados AUTOSOMAS o CROMOSOMAS AUTOSOMALES.

Salvo pocas excepciones, parece ser que Y no transporta genes homólogos a los del cromosoma X y algunos autores sostienen que el cromosoma Y, no desempeña un papel represen-

tativo en la herencia de los genes ligados al sexo (sex-linked genes).

HERENCIA DEL CROMOSOMA Y

De acuerdo a los conocimientos actuales, el cromosoma Y no transporta gran número de genes. La mosca *Drosophila* macho que no ha recibido el cromosoma Y será estéril, lo que indica que debe haber un gene o genes para la fertilidad del macho, en el cromosoma Y. Normalmente, parecería que ninguno de tales genes tuviera aleles sobre el cromosoma X, puesto que los machos estériles tienen un cromosoma X.

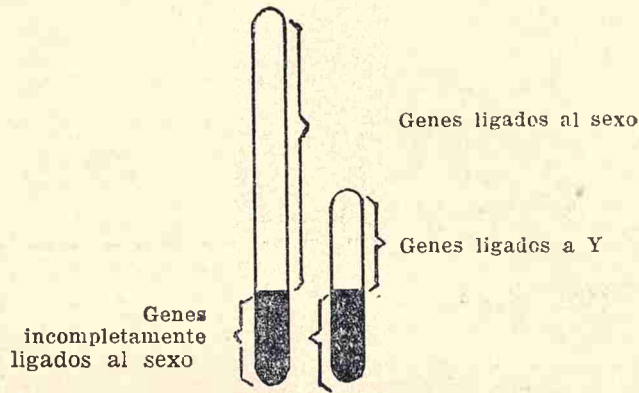
Para interpretar cómo puede ocurrir esta eventualidad, es necesario considerar la relación existente entre los cromosomas X e Y. (Esquema 1).

Aquí surge el interrogante siguiente: ¿Cómo están relacionados estos dos cromosomas?

La mayoría de los genes se encuentran localizados en la región del cromosoma X, para la cuál el cromosoma Y no posee la correspondiente porción homóloga.

Según diversos autores, las porciones homólogas de los cromosomas X e Y están prácticamente exentas de genes, aun cuando ha sido descubierto en esta región, un gene para "cerdas cortas" (bobbed bristles). Este gene mutante puede estar en ambos cromosomas (X e Y), teniendo un alele en machos y hembras.

La forma de herencia de estos genes es un tanto similar a la de los genes autosomales, y en el caso de genes recesivos, su localización en los



Esquema 1. — El esquema representa una clasificación de los genes sobre los cromosomas sexuales de animales, con el método XY de la determinación sexual. Solamente los genes incompletamente ligados al sexo tienen alelos en ambos cromosomas, vale decir, en el cromosoma X y en el cromosoma Y.

cromosomas sexuales sólo puede ser determinada mediante tests especiales de "linkage". Se dice que tales genes están ligados al sexo de manera incompleta (incompletely sex-linked).

GENES LIGADOS A Y

Siempre de acuerdo a diversos autores, también hay unos pocos genes en la porción no homóloga del cromosoma Y del macho, conocidos como genes ligados a Y (Y-linked genes), los cuales, además, presentan diferentes pautas de herencia.

Parece ser que dos genes para fertilidad en machos de *Drosophila*, están localizados en esta zona del cromosoma Y. FOX et al. (1959) encontraron en *Drosophila*, un posible antígeno ligado a Y.

Algunos investigadores han sugerido la herencia de 17 genes humanos ligados a Y, lo que fue discutido por otros que consideran no debe tomarse esta sugerencia como regla.

Un gene autosomal dominante, limitado sexualmente al hombre, en algunos casos podría originar pedigrees que aparecerían mostrando la herencia ligada a Y. La característica que aparece como más probable ligada a Y, es la HIPERTRICHOSIS de las orejas (desarrollo de pelos muy largos en el pabellón auricular).

CURT STERN, en su libro *PRINCIPLES OF HUMAN GENETICS* expresa

que en el hombre, de los muchos cientos de características heredadas, sólo muy pocas muestran en forma absoluta, su herencia ligada a Y, citando como ejemplo el caso notable de los llamados "Hombres puerco-espín" (porcupine men), quienes vivieron en Inglaterra durante los siglos 18 y 19.

En 1717 nació un niño aparentemente normal, de padres normales. A las ocho semanas de edad, la piel de este niño se tornó amarillenta, cambiando gradualmente al color negro para luego engrosarse, desarrollando en la totalidad del cuerpo, excepto palmas de pies y manos, cabeza y cara, gruesas placas erizadas de pelos semejantes a cerdas de aproximadamente una pulgada de longitud.

Edward LAMBERT (éste era su nombre), tuvo seis hijos (varones) con la misma condición genética.

El rasgo fue observado en las cuatro generaciones posteriores, con las siguientes particularidades:

- a) Presente en cada hijo varón de padre afectado.
- b) Ausente en todas las hijas, no siendo transmitido este rasgo por ninguna de ellas.

STERN considera que este estado era causado por un gene presente en el cromosoma Y. Esta condición ha sido designada con el término médico ICHTHYOSIS HISTRIX GRAVIOR, suponiéndose que la primera apari-

ción del rasgo podría deberse a una mutación.

Otro ejemplo dado por STERN es el rasgo denominado WEBBED TOES, aparentemente de herencia ligada a Y, presentando una conexión o unión entre el segundo y tercer dedo de los pies que recuerda a los palmípedos. El rasgo apareció en 14 varones miembros de la familia SCHOFIELD en los Estados Unidos (Stern, 1961). Ninguno de ellos careció del rasgo, y ninguna de las 11 hijas de los hombres afectados lo poseían.

Con los trabajos de W. J. WELSHONS y L. B. RUSSEL (1959) quedó establecida "una función del cromosoma Y" en lauchas, al demostrar su capacidad determinante masculina. Puesto que la herencia del "antígeno masculino" (male antigen) normalmente es paralelo con la del cromosoma Y, una "función" adicional "no" independiente de la diferenciación sexual, es sugerida por la observación que las hembras de algunos linajes de lauchas son capaces de rechazar injertos de machos (Eichwald and Silmsker, 1955).

Existe abundante información concerniente a la reyección de tejidos de machos injertados en hembras isólogas. Pero también existen ejemplos demostrados por MARIANI, MARTINEZ, SMITH and GOOD (1958), y BILLINGHAM AND SILVERS (1958), en que algunas hembras toleraban el antígeno masculino. Las hembras con esta condición, fueron utilizadas experimentalmente para demostrar la presencia de un "antígeno común" en machos de los diferentes "inbreedings" testados.

En base a que ciertas hembras de algunos linajes no reaccionaron contra machos que poseían el antígeno, se presumió una diferente capacidad reaccional de hembras contra machos. Los estudios realizados utilizando híbridos F_1 de "clases reactivas" y "no reactivas" (Zaalberg, 1959) y en "backcross" experimentales (Klein and Linder, 1961), llevaron a idénticos resultados.

Ciertos puntos básicos que conciernen a la determinación genética, como así también, a la transmisión del antígeno masculino, todavía requieren clarificación (Celada y Welshons, 1962).

CELADA y WELSHONS (1962) manifiestan que al desconocer si las conclusiones basadas sobre los resultados de trasplante de piel podrían ser extensivos al trasplante de tejido hemopoyético, inician sus investigaciones para testar la sensibilidad de distintas líneas al antígeno masculino.

Estos investigadores utilizan en sus trabajos, lauchas "excepcionales" XO y XXY. De esta manera, empleando un método cuantitativo y basado en el injerto de células hemopoyéticas aisladas de bazo, llegan a las conclusiones siguientes:

La utilización de lauchas con una constitución cromosómica "excepcional", hembras XO y machos XXY, ha hecho posible demostrar que:

- a) La determinación del antígeno masculino no es el resultado de la "sola condición X" normalmente presente en el macho.
- b) El antígeno masculino, determinado por el cromosoma Y, no es suprimido por la condición "doble X", normalmente presente en la hembra.

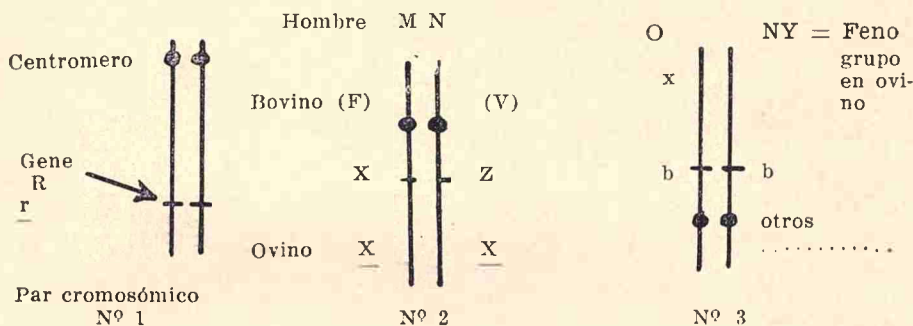
Otros experimentos han demostrado que los antígenos determinados por los cromosomas Y, de diferente origen, siempre dan reacción cruzada, y la comparación cuantitativa directa de la antigenicidad de C3H-Y y C57BL-Y (lauchas machos), revelan la identidad de estos dos antígenos. No pudieron detectar reacción-cruzada entre rata macho y laucha macho, y no encontraron diferencias antigénicas ligadas a X en C3H ó C57BL.

Estas y otras investigaciones relacionadas al cromosoma Y, indujeron a iniciar las indagaciones, en el sentido de poder demostrar la presencia de algún antígeno o antígenos ligados a Y y su vinculación a los factores de grupos sanguíneos.

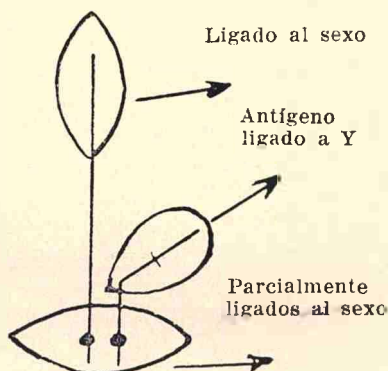
MATERIAL Y METODO

El fundamento del trabajo está basado en la producción de anticuerpos mediante hétero e isoimmunización, con el mismo procedimiento empleado para grupos sanguíneos.

les. El esquema 2 adjunto, sintetiza esta idea, donde los autosomas muestran los genes para factores sanguíneos y los cromosomas sexuales, el



Autosomas en ovinos



Esquema 2. — Representación panorámica de genes en autosomas y en cromosomas sexuales.

Teóricamente, el proceso de hiperimmunización debe producir anticuerpos contra sustancias antigénicas originadas por genes autosomales y genes ligados a los cromosomas sexuales.

supuesto gene para el "factor" masculino ligado a Y.

Los animales utilizados son hiperimmunizados con células rojas provenientes de MACHOS de distintas especies: bovino, ovino y equino.

PROTOCOLOS DE TRABAJO

1. HETEROINMUNIZACIONES EN CONEJOS (bovinos)

Receptor	Sexo, color, etc.	Material inyectado
Conejo R 25-1	♂ blanco	WHF ♂ 511 - 1 ml 25 % glób. rojos lavados.
" R 22-2	♂ negro	" " " " "
" R 25-4	♂ aguti	" " " " "
" R 24-1	♀ negro	WHF ♂ 533 " " "
" R 22-1	♂ blanco	" " " " "
" R 23-8	♀ negro	" " " " "

En la vena marginal de la oreja de cada conejo, se aplicaron 14 inyecciones de 1 ml de glóbulos rojos lavados y suspendidos al 25 % en salina (día por medio), provenientes de los toros WHF 511 y WHF 533, que actuaron como dadores del presunto "antígeno macho".

Siete días después de la última inoculación, se sangró por vía intracardiaca, extrayendo 60 cc de sangre a cada animal.

En la experiencia, antes de utilizar el suero obtenido, el mismo debe ser calentados a 56°C durante 30 minutos para inactivar el Complemento.

2. HETEROINMUNIZACIONES EN CONEJOS (ovinos y equinos)

Receptor	Material inyectado	
Conejo R 23-4 ♂	Carnero H ♂	1 ml 25 % glóbulos rojos lavados
„ R 123-1 ♂	„	„
„ R 19-9 ♂	„	„
„ R 23-5 ♀	Carnero D 623 ♂	„
„ R 27-5 ♀	„	„
„ R 27-6 ♀	„	„
„ R 23-6 ♀	Equino W. Shetland ♂	„

Se aplica el mismo procedimiento correspondiente al Protocolo anterior.

3. ISO - INMUNIZACION (ovinos)

Receptor (ovejas)	Material inyectado	
D 8	Carnero H ♂ (dador)	50 ml 50 % glóbulos rojos lavados
D 12	„	„
H 38	„	„
H 39	„	„
D 11	Carnero D 623 ♂ (dador)	„
H 28	„	„
H 32	„	„
H 36	„	„

Se efectúan cuatro inoculaciones, una por semana. Siete días posteriores a la última inyección, se extrae por vía yugular, un litro de sangre a cada animal inoculado.

Para determinar la presencia de anticuerpos y el título, cada uno de los sueros es testado en la misma forma que se hace con los inmunosueros a utilizar en grupos sanguíneos.

Conocido el título y capacidad reactiva, se procede a absorberlos con células rojas perfectamente seleccionadas. Por ejemplo, en el caso de bovinos, se exhaustan todos los posibles anticuerpos contra factores de grupos sanguíneos, haciendo la absorción exclusivamente con células rojas provenientes de animales hembras, con la finalidad de liberar el anticuerpo o anticuerpos contra el factor masculino, si éstos existieran en el antisuero.

PROTOCOLO Q - 86

Antisuero y números	S 1 Carnero H ♂ 418523 (D8) ♂	S 2 D 623 (32) ♂	S 3 H ♂ (H 38)	S 4 H ♂ (D 12)	S 5 D 623 ♂ (H 28)
2 : 1	Pool de células				
Absorbido por	ovejas D3, 5, 6, 10, 37 H18, 22, 23, 24, 29				
Dilución de absorción	No diluido	> ND	> ND	> ND	> ND
Dilución en test	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64
Células rojas					
H ♂ 418523	4	4	—	—	—
♂ D 623	4	4	—	—	—
♀ ♀ D 3	—	—	—	—	—
5	4	4	—	—	—
6	4	4	—	—	—
10	—	—	—	—	—
37	—	—	—	—	—
H 18	—	—	—	—	—
22	4	4	—	—	—
23	4	—	—	—	—
24	4	4	—	—	—
29	4	4	4	—	—
Antisuero	R 19-9 anti-H ♂	R 23-4 anti-H ♂	R 23-5 anti-D 623 ♂	R 27-6 anti-D 623 ♂	R 123-1 anti-H ♂
3 : 1	Pool células				
Absorbido por	ovejas D3, 5, 6, 10, 37 H18, 22, 23, 24, 29				
Dilución de absorción	1/4	> 1/4	> 1/4	> 1/4	> 1/4
Dilución en test	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64
Células rojas ovino					
H ♂	—	—	—	—	—
D 623 ♂	—	—	—	—	—
D 3 ♀	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—
37	—	—	—	—	—
H 18	—	—	—	—	—
22	—	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—

El símbolo (—) significa reacción negativa.

PROTOCOLO Q - 87

Antisueros	R 25-1 anti-WHF 511 ♂	R 22-2	R 25-4	R. 24-1 anti WHF 533 ♂	R 22-1	R 23-8
2.5 : 1	WHF 386			WHF 386		
Absorbido por células ♀ bovino	+			+		
	380			387		
Dilución de absorción	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Dilución en test	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64	ND 4 16 64
Células de bovino						
♂ WHF 511						2 1
♂ WHF 533						
WHF 386						
380						
387						
290A						3 2
391						3 2
417						
390						3 2

El símbolo (ND) significa no diluido.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Aún cuando en esta primera experiencia los resultados no han sido los esperados, esta etapa inicial abre un nuevo camino de investigación en inmunogenética, para ser continuado quizá modificando un tanto el procedimiento experimental y con mayor cantidad de animales.

Los resultados obtenidos, analizados a través de los protocolos, revelan la presencia de anticuerpos en el iso-inmunsuero del ovino hembra D8 contra células de ovinos machos, pero estas reacciones también se observaron contra las células rojas de algunas hembras. En este caso quedó planteado el interrogante de si verdaderamente durante las absorciones se habían exhaustado todos los anticuerpos comunes a antígenos provenientes de ambos sexos, teniendo en cuenta la observación de que las reacciones contra ambos machos eran extremadamente potentes, lo que indicaría la probable presencia de alguna dosis agregada de anticuerpos anti-macho.

En el Protocolo Q-87 correspondiente a la heteroinmunización del conejo R 23-8 con eritrocitos de un toro [WHF 533 ♂ (R 23-8)], posteriormente a las absorciones realizadas con el "pool" WHF 386 + WHF 387 ♀♀ (suero absorbido con células rojas de

animales hembras), se observa que el antisuero no reacciona contra el dador, pero sí contra las células del toro WHF 511 y las vacas WHF 290A, 390 y 391. Esto hizo suponer en la detección de un posible nuevo factor sanguíneo, pero, no obstante ello, quedaron planteados los interrogantes siguientes:

- a) ¿Hay en el inmunsuero WHF 533 ♂ (23-8 ♀) algunas dosis "anti-macho"?
- b) ¿Por qué razón este inmunsuero no reacciona contra las células dadoras?
- c) Se detecta junto a una posible dosis "anti macho" algún nuevo factor sanguíneo bovino?
- d) Por otra parte, los protocolos revelan que las posibles dosis "anti-macho" fueron producidas en "animales hembras" lo que induce a otro interrogante. ¿Pueden los "machos" producir anticuerpos "anti-macho" o los anticuerpos "antimacho" sólo son estructurados en animales hembras?

La continuación de nuestras investigaciones acerca de los posibles antígenos ligados al cromosoma Y, en gran parte se referirán a la aclaración de los interrogantes planteados.

BIBLIOGRAFIA

- Billingham, R. E. and W. K. Silvers* (1958). Induction of tolerance of skin isografts from male donors in female mice. *Science* 128: 780-781.
- Celada, F. and Welshons, W. J.* (1963). An immunogenetic analysis of the male antigen in mice utilizing animals with an exceptional chromosome constitution. *Genetics* 48: 139.
- Fox, A. S.* (1958). Genetics of tissue specificity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 73: 611.
- Klein, E. and Linder, O.* (1961). Factorial analysis of the reactivity of C57BL females against isologous males skin grafts. *Transplantation Bull.* 27: 457.
- Mariani, T.; Martínez, C.; Smith, J. M. and Good, R. A.* (1958). Immunological tolerance to male skin isografts in female mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 99: 287.
- Eichwald, E. J. and Sümser, C. R.* (1955). *Skin. Transplantation Bull.* 5: 148.
- Stern, C.* (1961). *Principles of human genetics*, San Francisco, Freeman.
- Welshons, W. J. and Russell, L. B.* (1959). The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 45: 560.
- Zaalberg, O. R.* (1959). An analysis of the Eichwald-Sümser effect. *Transplantation Bull.* 6: 433.