

PRODUCCION DE UN SUERO ANTI LINFOCITICO HUMANO

Dr. Luis del Valle*, Dra. Ana Lorena Caballero*, Dr. Nidia Calvo*

INTRODUCCION

La inmunohematología ha logrado un auge muy importante en los últimos años, y esto es más evidente en los programas de trasplantes de órganos (5). A consecuencia de eso el Laboratorio se ha enriquecido con múltiples pruebas para el análisis de los tejidos; entre las más corrientes está la citotoxicidad, en la cual se utiliza un suero antilinfocítico humano como control positivo (2, 6). Su utilización confirma la validez del resultado (7). En nuestro medio no contamos con un antisuero de este tipo, lo que dificulta la interpretación correcta de las pruebas que involucran citotoxicidad; esto nos planteó la necesidad de desarrollar un esquema de trabajo para producir un suero antilinfocito humano (SALH), en un animal fácil de manipular en el laboratorio como el conejo que se sensibiliza por medio de inoculaciones repetidas y da una respuesta inmune con altos niveles de anticuerpos (3).

La aplicación de este principio nos permite obtener un suero anti-linfocítico (SALH), dependiente del complemento, capaz de producir efectos citotóxicos por medio de la fijación del complemento. Esta reacción antígeno anticuerpo es específica hacia los linfocitos los cuales se lisan (3).

Este procedimiento tiene por objeto avalar las pruebas relacionadas con el estudio de la especificidad de la respuesta inmune hacia los tejidos humanos.

MATERIAL Y METODOS

I- Aislamiento de las células:

Se tomaron 76 muestras de sangre total citratada, de 10 ml cada una; 20 del personal voluntario del Laboratorio del Hospital Nacional de Niños y 56 tubos piloto de donadores del Banco de Sangre del mismo Hospital.

Los linfocitos se aislaron por medio de "Ficoll Hypaque", según método ya conocido (6) y modificado de la siguiente manera: 6 ml de sangre citratada, más 2 mililitros de Dextrán (PM 70.000) se dejan reposar por media hora, hasta que el plasma rico en elementos celulares se separe bien; se toma este plasma y se diluye 1:2 con solución Hanks y se le agrega el "Ficoll Hypaque", para formar la gradiente de densidad (4).

Los linfocitos aislados se lavan una vez con Hanks; y por centrifugación diferencial se les eliminan los eritrocitos y/o plaquetas que puedan quedar. Los linfocitos

* Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera" CCSS, San José — Costa Rica.

aislados, son resuspendidos a una concentración adecuada, según el propósito. Para ser usados en el procedimiento de sensibilización, se llevan a una concentración de 10^9 /ml y de 2×10^6 /ml para la prueba del anticuerpo.

II- Inoculación de los conejos:

Se inocularon dos conejos, siguiendo el siguiente esquema:

- a) Período de sensibilización: 15 días
- b) Los días de inoculación: 1, 2, y 10
- c) Período de sangría: Días 0,8, y 15 (12 ml cada vez)
- d) Premedicación: Días 2 y 10 (0,1 mg de epinefrina y 2 ml de Sol. Medrol, IV, antes de cada una de las inoculaciones) Ver Cuadro 1.

Cuadro 1

Esquema de sensibilización

Día número	Inoculación	Premedicación	Sangría
0			sí
1	sí		
2	sí	sí	
8			sí
10	sí	sí	
15			sí

III- Prueba del anticuerpo:

- a) Preparación del antisuero
Una vez sangrado el conejo (días 8 y 15), su suero se inactiva a 57°C , por una hora. Se mantiene congelado a -70°C hasta su uso.
- b) Preparación del control negativo
El día 0, antes de la sensibilización, se le hace una sangría a los conejos. El suero obtenido se trata igual que el antisuero.
- c) El complemento
Practicar una sangría a un conejo no sensibilizado. Una vez separado en alícuotas el suero obtenido, se guarda a -70°C hasta su uso, pero no por más de un mes. Esta será la fuente de complemento (2, 7).
- d) Preparación de la placa de Terasaki
Agregar 5 microlitros de aceite mineral a cada uno de los pozos que se van a ocupar.
- e) La prueba del anticuerpo:
Se preparan 76 suspensiones de linfocitos. Se monta una prueba de citotoxicidad, de acuerdo al procedimiento de Terasaki mencionado.
Por cada muestra montamos tres pruebas, dos son coloreadas con eosina al 5% y la tercera con azul tripán. En total son 684 pruebas: 456 con eosina y 228 con azul tripán.

Se valoran las placas montadas de esta forma e incubadas a 37, a 25 y a 40°C. Seguidamente se pone una lambda del antisuero (SALH), según el procedimiento del punto III g y una del control, en los lugares respectivos y se incuban las placas a las temperaturas mencionadas en III e.

Luego de esa incubación se agrega una lambda de complemento fresco de conejo e incuba a temperatura ambiente por 45 minutos. Después se colorean según los procedimientos ya reportados por otros autores (6).

f) La lectura.

Realizarla en un microscopio invertido valorando la citotoxicidad según el criterio de Terasaki, modificado. Sólo se tomará como positivo cuando hay un 100% de muerte celular (6).

g) El título del anticuerpo (SALH).

A partir de un "pool" de tres donadores, se prepara una placa según indicaciones de los puntos III d y e; aquí el SALH fue diluido partiendo de 1:5, hasta por 20 diluciones más y con factor de dilución de 2. El resto del procedimiento fue según los puntos e y f del método. Para interpretar el título se toma como positivo hasta la última dilución que dé un 100% de muerte celular; y ésta será la dilución de trabajo para la valoración de la especificidad del SALH (punto g).

h) Determinación de la dependencia del complemento en el SALH.

Preparar una mezcla de linfocitos de 8 donadores a una concentración de 2×10^6 /ml.

En una placa de Terasaki se pone un microlitro de las células más un microlitro del SALH. Después de treinta minutos de incubación a temperatura ambiente, se le agrega una lambda de eosina al 5%. Todo bajo 5 microlitros de aceite mineral.

La prueba se monta 48 veces, cada una con su respectivo control negativo.

i) Control preliminar de citotoxicidad.

Utilizar linfocitos de diez donadores, montar diez pruebas por donador de acuerdo a los puntos III e y f del protocolo, 40 con azul Tripán al 2% y 20 con eosina al 5%.

El antisuero (SALH) es el que se obtuvo de la sangría del día 10.

Recolección de datos:

Durante el procedimiento de inoculación uno de los conejos murió después de la segunda sensibilización. Clínicamente fue una reacción anafiláctica severa, con insuficiencia respiratoria y paro cardíaco. Por esta razón al otro conejo se le aplicó premedicación y no tuvo problemas de reacción postsensibilización.

La sangría preliminar a los 8 días produjo un SALH con una capacidad citotóxica de un 70% en todas las células probadas.

El título del anticuerpo SALH de la segunda sangría fue de 100% de citotoxicidad hasta una dilución de 1:10 del antisuero; diluido 1:20 la citotoxicidad fue de un 70%. De una dilución de 1:40 en adelante hasta por 17 diluciones dobles no se encontró muerte celular. El uso de tres diferentes temperaturas no modificó el patrón de reacción. Para la prueba del anticuerpo se usaron los linfocitos de las 76 muestras citratadas. En total se montaron 420 pruebas, más sus respectivos controles negativos.

En todos los casos se empleó un SALH diluido 1:10 de acuerdo al título encontrado. En todos los casos las células se lisaron en un 100% por lo que se toma la reacción como positiva. No hubo diferencia de sensibilidad en las reacciones a diferentes temperaturas. Tampoco hubo diferencia entre los dos tipos de colorantes empleados. El azul Tripán requiere de varios pasos intermedios que no son necesarios en la eosina. Cuando se valoró la dependencia del complemento por parte del SALH para la reacción de citotoxicidad no había muerte celular en la prueba.

DISCUSION

El desarrollo de esta investigación nos demuestra que es factible la obtención de un suero anti linfocítico humano en conejos. Se alcanzaron buenos niveles de anticuerpos en sólo 15 días de sensibilización. El nivel sube de 0% el primer día a 70% de actividad citotóxica el día 8; luego a un 100% el día 15, con un título de 1:10. Estos datos hacen suponer que posteriores sensibilizaciones, así como más tiempo, provocarán mayores elevaciones.

Elaborar el esquema de sensibilización y probar el SALH nos permitió establecer pautas en cuanto a la metodología a seguir durante una prueba general de citotoxicidad. Así, pudimos definir temperaturas, tiempos, concentración de las células, proporción adecuada de los reactivos, etc.

La prueba del anticuerpo además de demostrar la efectividad del procedimiento de sensibilización, nos permitió concluir que la incubación por treinta minutos a temperatura ambiente, es lo más práctico para la reacción.

No hubo diferencias entre las reacciones cuando empleamos tres diferentes temperaturas, a saber 4°C, 37°C y 22 a 24°C (temperatura ambiente).

El hecho de que uno de los conejos muriera demuestra la necesidad de vigilar la correcta premedicación, antes de cada inoculación (3).

El rango de temperatura en la fase de complemento siempre fue el mismo. Según Dewar & Murray (1) hay diferencias en los resultados si la temperatura se modifica, pero se ha reportado que de 22 a 24°C son adecuados para un procedimiento general como éste (2).

Es interesante que la modificación de la cantidad de complemento empleado por nosotros (un microlitro en vez de cinco), no dio reacciones débiles.

Dewar & Murray (1) encontraron el mismo patrón con el complemento, cuando usan un microlitro y no los cinco clásicos, lo que coincide con nuestras observaciones.

Probablemente mayores tiempos de incubación permiten mejores respuestas debido a mayor sensibilización, hecho que no tratamos de demostrar aquí.

Sin embargo, al igual que Willoughby et al.(7), encontramos que un cambio en la temperatura ambiente (22-24°C), no modifica significativamente el patrón y la fuerza de la reacción.

Es necesario hacer resaltar el hecho de que todas las células estuvieron vivas en la prueba de dependencia del complemento. Esto demuestra que cuando hay muerte celular, se debe a la acción conjunta de la reacción antígeno-anticuerpo y posterior fijación del complemento, y no por una muerte inespecífica debido a algún factor sérico.

Como conclusión podemos decir que se pudo producir en conejos un SALH alta-

mente efectivo para ser usado en las pruebas de citotoxicidad, a la vez que se estableció un esquema fácil de sensibilización de los conejos; fue posible determinar los procedimientos más adecuados para la citotoxicidad y para evaluar la calidad del antisuero.

Consideramos que el trabajo es un aporte importante, en el estudio de los fenómenos inmunológicos de tejidos, especialmente cuando éstos están involucrados en programas de transplantes de órganos, como fue nuestro propósito.

RESUMEN

Se reporta el protocolo para la producción de suero antilinfocítico en conejo, el cual se emplea como control positivo en pruebas de citotoxicidad. También se establece la forma de evaluarlo.

SUMMARY

We report a protocol through which we produced a rabbit anti human lymphocyte serum for cytotoxicity test, used as a positive control. We also report the way for evaluation.

BIBLIOGRAFIA

1. Dewar P. & Murray S.: Lymphocytotoxic antibody detection and crossmatching for renal transplantation. *Transplantation* 21: 387, 1976.
2. Hopkins K. & Mac Queen J.: Basic microlymphocytotoxicity technique. The AACT Laboratory manual. AACT II-1, 1981.
3. Hudson L. & Hay F.: Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications p. 269, 1980.
4. Reisner Y. et al.: Allogenic bone marrow transplantation using stem cells fractionated by lectins: VI, in vitro analysis of human and monkey bone marrow cells fractionated by sheep red blood cells and soybean agglutinin. *Lancet* 20: 1320, 1980.
5. Roitt T. Inmunología esencial. Edit. JIMS p. 225, 1978.
6. Terasaki P. & Park M: Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. Manual of tissue typing techniques, NIH Publication No. 80, 1979.
7. Willoughby F. & Mac Queen J.: Modifications of the microcytotoxicity test. The AACT Laboratory manual AACT, II, 2-1981.