

Suero de conejo con actividad de complemento para tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad humano

Rabbit serum with complement activity to typify human major histocompatibility complex

Lic. Walter Góngora Amores,^I Dr. Rolando Sánchez Artigas,^I Lic. Zuleidis Torres Ponce,^I Dr. Javier Corella Sánchez,^I Lic. Dailin Cobos Valdés,^I Lic. Antonio Miranda Cruz,^I Lic. Thamara Dunia Ricardo^{II}

^I Centro de Inmunología y Biopreparados. Holguín, Cuba.

^{II} Laboratorio Territorial de Histocompatibilidad de la Universidad Médica de Holguín. Holguín, Cuba.

RESUMEN

En el ensayo de microlinfocitotoxicidad, el suero de conejo como fuente de complemento desempeña un rol esencial en la clasificación del complejo mayor de histocompatibilidad humano, tanto para la tipificación antigénica como en el *cross-match* linfocitario de la pareja donante-receptor antes de realizar los trasplantes. En este trabajo, se obtuvieron 3 lotes experimentales de dicho hemoderivado con óptimos indicadores de rendimiento, actividad biológica y estabilidad. El exanguíneo de los animales se realizó por la técnica de yugulación. El suero fue separado por centrifugación en condiciones ambientales y de temperatura controladas. Posteriormente, el producto se sometió a filtración esterilizante y se tomaron muestras para los ensayos de calidad. El estudio mostró que el producto conserva la actividad biológica al menos durante 18 meses y que los valores de citotoxicidad se encuentran dentro de los límites de aceptación para su empleo en los ensayos de histocompatibilidad pretrasplante.

Palabras clave: suero de conejo, actividad de complemento, tipificación HLA, técnica serológica, microlinfocitotoxicidad, trasplante de órganos.

ABSTRACT

Microinfocitotoxicity assay is one of the serological methods used to classify human major histocompatibility complex. In this technique the rabbit's serum as complement source, plays an essential role in antigens determination and in lymphocytes cross match assay as necessary stage before the selection of the best donor-receiver pair to realize the organ transplant. Three experimental lots of normal rabbit serum were developed with excellent indicators of efficiency, biological activity and stability. Rabbit's blood was obtained through jugulating technique and serum was separated by centrifugation in controlled environment and temperature's conditions. The sterilization process was performed by filtration and the samples were taken for quality's control assays. Stability studies showed that the product kept the biological activity at least during 18 months after it was processed and cytotoxicity's values were adequate for its employment in histocompatibility pre-transplant assays.

Key words: rabbit serum, complement activity, HLA typing, serological method, microinfocitotoxicity, organ transplant.

INTRODUCCIÓN

El complejo mayor de histocompatibilidad es conocido en el hombre como antígenos de leucocitos humanos (HLA). Los genes que codifican estas proteínas de membrana se sitúan en el brazo corto del cromosoma 6, y conforman el complejo genético más polimórfico que existe.¹

La tipificación HLA ha sido de vital importancia en la medicina de los trasplantes y en la evaluación de la asociación HLA-enfermedad.²⁻⁴ Entre los mecanismos que explican esta relación se encuentran el reconocimiento directo o indirecto que hace el receptor de las moléculas HLA no compatibles del donante con la consiguiente estimulación de su respuesta inmune y el papel que pueden desempeñar determinadas especificidades HLA en la presentación de péptidos endógenos como etiología de enfermedades autoinmunes.⁵

Entre los métodos para la determinación de los antígenos HLA se destacan los serológicos y los basados en las técnicas de biología molecular. En el primer caso, el ensayo de microinfocitotoxicidad se ha convertido en la técnica serológica estándar para la tipificación HLA y fue desarrollado por *Terasaki* y *Mc Clelland* en 1964.⁶

Su principio se basa en poner en contacto linfocitos aislados del individuo a estudiar (donante), con un panel de aloanticuerpos o anticuerpos monoclonales anti-HLA capaces de reconocer determinadas especificidades antigénicas que luego de la adición de suero de conejo como fuente de complemento, si tiene lugar la reacción antígeno-anticuerpo, se activa la vía clásica del complemento con la formación del complejo de ataque a la membrana causando la muerte celular. Este resultado se visualiza microscópicamente con el uso de colorantes vitales y es traducción de la incompatibilidad donante-recetor, lo cual invalida la realización del injerto. Cada

reacción se evalúa por el porcentaje de células muertas y los resultados se registran de acuerdo con un sistema internacionalmente establecido.⁷

El trasplante de órganos es una de las áreas donde el estudio de los antígenos de histocompatibilidad tiene mayor impacto.⁸⁻¹⁰ El desarrollo de los trasplantes en el ser humano como una alternativa terapéutica de procesos patológicos para los estadios terminales de la función de un órgano o tejido, se ha facilitado por el avance en el conocimiento de este sistema genético.

La selección del donante adecuado en un trasplante se basa en el estudio de la presencia de anticuerpos en el suero del receptor contra los HLA que están en el material genético de todas las células nucleadas del donante, de ahí la importancia de la identificación de los antígenos HLA de los receptores y los donadores para seleccionar las parejas donador-receptor más compatibles.¹¹

Los estudios de histocompatibilidad constituyen la clave para el desarrollo de trasplantes exitosos, y en estos, el suero de conejo desempeña un papel fundamental como fuente de complemento para la reacción de microlinfotoxicidad. En los últimos años, han existido limitaciones en la adquisición de este reactivo en nuestro país, a consecuencia de un mercado cada día más escaso, debido al desarrollo de la biología molecular y la sustitución paulatina de las técnicas empleadas.

En este trabajo se obtuvieron 3 lotes experimentales de suero de conejo normal con el fin de emplearlos como fuente de complemento en la tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad humano. La reproducibilidad de los resultados obtenidos en su evaluación, al enfrentar cada lote a sueros controles, demostró la eficacia de la metodología propuesta, tanto desde el punto de vista de rendimiento, eficacia del proceso de filtración esterilizante, como de conservación de la actividad biológica de interés.

MÉTODOS

La sangre se obtuvo a partir de conejos de la raza chinchilla de 1,5 a 2,0 kg de peso, clínicamente sanos y sin tratamiento medicamentoso al menos por 7 días.

La extracción se realizó por la técnica de yugulación en condiciones controladas y se colectó en frascos *corning* estériles de 50 mL sin solución anticoagulante. Se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente para favorecer la coagulación y posteriormente, por espacio de 12 h a 4 °C. Para la separación del suero, las muestras se centrifugaron a 1 500 y 3 000 rpm, en centrifuga refrigerada a 4 °C durante 5 min. En cada operación se desechó el *pellet* formado y aquellas muestras que presentaron ruptura de los eritrocitos cuniculares. Todo el proceso de manipulación de material biológico, se realizó cumpliendo las normas de seguridad biológica implementadas en el reglamento de seguridad del centro.

Ensayo de citotoxicidad

Cada muestra de suero se enfrentó a una suspensión de linfocitos de diferentes individuos de aproximadamente 25 células/mL. Después de incubarlas a 37 °C durante 1 h, se eliminó por decantación el exceso de parafina líquida, se aplicó tripán azul como colorante vital y se realizó la lectura en el microscopio de luz

invertida. Como criterio de conformidad, se aceptaron aquellas muestras de suero que rindieron porcentajes de mortalidad nulos o inferiores al 20 %.

Filtración, dispensado y conservación

Una vez realizado el *pool* con las muestras de suero conformes, se esterilizó el producto mediante filtración con unidades Sartobrán de 0,2 y 0,1 μm de porosidad. El suero obtenido se dispensó en bulbos de cristal de 2,5 mL estériles, a razón de 1 mL por frasco empleando pipetas automáticas y se conservaron a 20 °C hasta su evaluación. Tanto la filtración como el envase del producto se realizaron en cabina de flujo laminar.

Evaluación de la actividad de complemento

Se llevó a cabo mediante el ensayo de microlinfotoxicidad, empleando placas de Terasaki HLA clase I y clase II, muestras de sueros reactivos HLA clase I y clase II, y no reactivos, en el laboratorio territorial de histocompatibilidad del Programa de Trasplante Renal, de la Universidad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello" de Holguín.

RESULTADOS

En la tabla se muestran los volúmenes de sangre, suero y porcentajes de recuperación de cada lote de suero cunicular normal producido.

Para verificar la eficacia de cada operación de filtración esterilizante, se tomaron muestras y se ensayaron según prueba de esterilidad establecida en el Sistema de Gestión de la Calidad implementado. La siembra en medios de enriquecimiento no mostró crecimiento microbiano. La evaluación de la actividad biológica de interés, mostró valores de mortalidad celular superiores al 80 % en los casos en que se emplearon sueros controles reactivos provenientes del panel de muestras del laboratorio territorial de histocompatibilidad de la Universidad Médica de Holguín.

DISCUSIÓN

La técnica de yugulación propuesta para el exanguíneo de los animales fue eficaz, pues permitió recuperar volúmenes de sangre con rendimientos significativos y un porcentaje mínimo de hemólisis por ruptura mecánica de la pared de los hematíes. Otros autores proponen la punción cardíaca como alternativa para la obtención de sangre cunicular.¹² Este tipo de extracción se emplea fundamentalmente en la obtención de sangre completa para el procesamiento de sueros hiperinmunes, cuando los volúmenes son pequeños y es de interés conservar los animales con vida para futuras extracciones. Tiene como desventaja un mayor riesgo de hemólisis, al transitar los hematíes por el interior de las agujas empleadas en la punción.

El volumen promedio de suero por lote fue de 543 mL. La diferencia en los valores estuvo dada por la hemoconcentración de algunos animales y por la obtención de muestras hemolíticas debido a la lisis de hematíes durante la extracción y

manipulación de la sangre. Además, otro factor que tiene gran influencia en el porcentaje de rendimiento, tanto de la obtención de sangre como de suero, es el estrés a que se someten los animales durante su transportación hasta los locales de procesamiento. Esta observación coincide con reportes de otros autores que plantean la necesidad de aclimatar los conejos en condiciones de luz y sonoridad controladas al menos durante una semana antes de su sacrificio.¹³ No obstante, por los volúmenes recuperados, se considera satisfactoria la metodología propuesta, pues en los 3 casos se alcanzan porcentajes de recuperación de suero superiores al 50 %. Además, el incremento paulatino de estos porcentajes es indicativo de la especialización del personal técnico que interviene en cada etapa, lo cual es importante, pues en este proceso el factor humano tiene gran peso en los resultados esperados.

Por su composición, el suero de conejo constituye un medio de cultivo potencial para el crecimiento microbiano. En el proceso tecnológico propuesto, la filtración esterilizante y el dispensado en los frascos definitivos, se consideran pasos críticos y su desarrollo en cabina de flujo laminar fue eficaz, pues garantizó condiciones asépticas que minimizaron el riesgo de contaminación microbiana y la afectación de la actividad biológica de interés. En algunos casos, con la aplicación de la técnica de coloración vital con tripán azul, se detectaron células muertas en el estudio de sueros controles no reactivos, procedentes de la contaminación de la fracción linfocitaria con eritrocitos que sufrieron ruptura mecánica de la pared celular. Estos detritos celulares no afectaron la sensibilidad de la técnica de microlinfotoxicidad, pues los ensayos rindieron porcentajes de mortalidad superiores al 80 % para los sueros reactivos empleados como controles positivos y porcentajes de mortalidad despreciables o nulos cuando se emplearon sueros controles no reactivos.

El suero obtenido se criopreservó a una temperatura de 20 °C con el objetivo de conservar su actividad biológica, lo cual coincide con lo reportado en estudios anteriores.¹⁴

Se concluye que:

1. La técnica de yugulación para el exanguíneo de los animales, permitió recuperar volúmenes de sangre satisfactorios con ínfimos porcentajes de hemólisis por ruptura de la pared de los eritrocitos.
2. La metodología propuesta para la obtención de suero fue factible, con porcentajes de recuperación por encima del 50 %.
3. El dispensado del producto en cabina de flujo laminar fue factible, garantizando el ambiente aséptico necesario para la realización de la operación.
4. El suero cunicular obtenido conservó la actividad biológica de interés después de su procesamiento y mostró valores de citotoxicidad dentro de los límites de aceptación para su empleo en los ensayos de histocompatibilidad pretrasplante.
5. El estudio en anaquel de este producto biológico ha mostrado estabilidad por más de 18 meses en condiciones de congelación a -20 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonet L, Martínez Z. Los métodos serológicos y moleculares en la tipificación de los antígenos de leucocitos humanos. *Minirevisión. Bioquímica*. 2004;29:126-30.

2. Howell WM, Navarrete C. The HLA System: an update and relevance to patient donor matching strategies in clinical transplantation. *Vox Sang.* 1996;71:6-12.
3. Giralt P, Urra JM, Sanabria C, Giralt J, Pérez MJ, Benito P. Biological differences on onset among type 1A diabetics in relation to HLA DQ genetic markers. *Med Clin. (Barc)* 2003;120:6-9.
4. Pascual M, Mataran L, Jones G, Shing D, Van Der Slik AR, Giphart MJ, et al. HLA haplotypes and susceptibility to rheumatoid arthritis. More than class II genes. *Scan J Rheumatol.* 2002;31:27-8.
5. Mc Cluskey J, Au Peh C. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenetics.* 1999;1:3-20.
6. Terasaki PI, McClelland JD. Micro droplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 1964;204:998-100.
7. Martin S, Dyer PA. Identification and importance of MHC. The definition of HLA specificities by cytotoxicity. *Transplant Immunol.* 1994;2:108-15.
8. Morris PJ. *Kidney transplantation. Principles and practice.* 2da. ed. London: Grune & Stratton; 1984. p. 581.
9. García LF, Arango AM, Henao JE, Arbelaez M. Blood transfusions and HLA compatibility in first cadaveric kidney transplants treated with cyclosporine A. *Transpl Proc.* 1988;20:715-19.
10. Barry TS, Finn OJ. Human allograft derived T celling - donor class I- and class II-directed cytotoxicity and repertoire stability in sequential biopsies. *Human Immune.* 1988;22:185-98.
11. Sara C, Luis F. El complejo mayor de histocompatibilidad humano. *Sistema HLA. IATREIN.* 1989;2:137-55.
12. Rivero RA, Bencomo AA, Villaescusa R, Rubio R. Desarrollo de reactivos biológicos: una alternativa ventajosa 30 años después. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 1997;12(2).
13. Protocolo estándar para la generación de sueros policlonales en conejo. [citado 14 Dic 2010]. Disponible en: <http://www.proteinalternatives.com/servicios/>
14. Gallardo JM. Técnicas y protocolos experimentales en Biomedicina. 2006. [citado 14 Dic 2010]. Disponible en: <http://labtox-02.blogspot.com/2006/01/obtencion-de-suero.html>

Recibido: 24 de febrero de 2012.
Aprobado: 7 de mayo de 2012.

Lic. *Walter Góngora Amores*. Centro de Inmunología y Biopreparados. Holguín, Cuba. Correo electrónico: wga@cibho.hlg.sld.cu