

# Variaciones cuantitativas de la población de células peritoneales controladas por el complejo H-2

## H-2 Controlled Variation of Peritoneal Cell Population Numbers

FIDEL ZAVALA, ALICIA RAMOS y GUSTAVO HOECKER

Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 6556, Correo 7. Santiago - Chile

(Recibido el 25 de octubre de 1980)

The number of neutral red positive peritoneal cells-macrophages —is variable in adult non stimulated mice. A survey made in H-2 congenic mice has shown it to be a polymorphic character. The results of crossings between congenic strains with high and low numbers of peritoneal macrophages suggest this trait to be genetically determined by at least two loci, one locus with major effects being H-2 linked.

El sistema *H-2* del ratón es un conjunto de genes ligados entre los cuales existen determinantes de variados aloantígenos celulares (K, D, L, Ia) y de algunos factores del complemento (1). Además de estos genes estructurales se han descrito como ligados al complejo *H-2* ciertos caracteres de tipo regulatorio vgr., la edad de aparición de receptores para C3b en los esplenocitos (2), o de células carentes del antígeno Thy-1 y de receptores para C3b (3). Ivanyi *et al.* (4) han demostrado que estas acciones regulatorias ligadas a *H-2*, no sólo se refieren a las células involucradas en la respuesta inmune, en especial linfocitos, y a los órganos que los contienen, sino que, además del peso del timo y de los nódulos linfáticos, el de los testículos y sus glándulas anexas está asociado con el sistema *H-2*. Estos caracteres aparecen como influenciados por genes ligados a *H-2* y a otros de efecto menor ubicados en otros cromosomas.

Cohn *et al.* (5) señalan que en ratones adultos NCS, el recuento diferencial de las células libres obtenidas de peritoneo no estimulado está constituido en un 50 a 60% por células monocitoides con núcleo reniforme y, salvo la presencia de ocasionales granulocitos (< 0,01), las demás son linfocitos. Baird *et al.* (6) dan cifras seme-

jantes en hembras híbridas F<sub>1</sub> (C57B1/6 x DBA/2). Stuart *et al.* (7) observan que los ratones híbridos de 4 a 8 semanas producen cantidades mayores de células peritoneales y mejores cultivos que los animales de cepas puras. No tenemos conocimiento de un estudio sistemático de las bases genéticas de la variación numérica de estas poblaciones celulares.

Es necesario resaltar que la población de macrófagos (M $\phi$ ) del ratón es altamente dinámica y está influenciada por varios factores tales como la edad, el sexo, el estado de salud e incluso sujeta a variaciones ambientales (7).

A pesar de estas variables que hacen difícil su estudio, en este trabajo damos cuenta de la existencia de un nuevo polimorfismo genético autosómico referido al número de macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones adultos de 12 semanas no estimulados.

## MATERIAL Y METODOS

### Ratones

Los ratones usados comprenden las cepas congénicas A/Sn (*H-2<sup>a</sup>*) y A.SW (*H-2<sup>s</sup>*); B10 (*H-2<sup>b</sup>*), B10.Br (*H-2<sup>k</sup>*), B10.D2 (*H-2<sup>d</sup>*), B10.A (*H-2<sup>a</sup>*) y ratones de las cepas

puras no-congénicas, C3H ( $H-2^k$ ) y AKR ( $H-2^k$ ). Todos estos animales se criaron en nuestro bioterio bajo las condiciones corrientes de mantención.

#### *Células del exudado peritoneal (PEC) y macrófagos*

Para la obtención de las PEC, a los ratones sacrificados por dislocación cervical se les inculó por vía intraperitoneal 2,0 ml de salino (0,85%) que contenía 20 U de heparina. Después de tres minutos de un masaje suave de la masa abdominal se abrió la cavidad, se recuperó el volumen inoculado (alrededor de 1,6 a 1,7 ml) y se transfirió a tubos de celulosa de 5 ml siliconados para evitar la adhesión celular.

La suspensión celular mezclada en la proporción de 1 volumen por 2 vols de solución de Hayem B se contó en un hemocitómetro. Otra alícuota se mezcló con 2 vols de una solución de rojo neutro (Merck) al 0,01% en salino, se incubó por 10 min a la temperatura ambiente y se contó el número de células que presentaban vacuolas con rojo neutro.

Desde el punto de vista morfológico y para nuestros fines, hemos definido como macrófagos aquellas células que incorporan el rojo neutro en sus vacuolas citoplásmicas, habida consideración que este colorante se ubica en los lisosomas y que los linfocitos carecen de lisosomas visibles al microscopio corriente (8).

#### *Fagocitosis*

Para las pruebas de fagocitosis, se usó 0,5 ml de la suspensión de PEC, centrifugándose en un tubo plástico de 1 ml (Fischer) a 300 x g por 5 min. Se descartó el líquido sobrenadante y las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio de cultivo (Eagle MEM) el cual contenía 0,2% de glóbulos rojos de cordero (GRO) tratados previamente con suero de ratón anti-GRO (EA). Después de incubar a 37° durante 90 min, las células adherentes se resuspendieron agregando lidocaína (9) y se contó el número de  $M\phi$  con GRO fagocitados en microscopio corriente o de fases contrastadas.

#### *Tipificación de H-2*

El haplotipo  $H-2$  de las cepas parentales, A/Sn y A.SW, de los híbridos  $F_1$  (A/Sn x A.SW) y de la progenie de los cruzamientos retrógrados se identificaron con suero hiperinmune A/Sn anti A.SW y viceversa, de acuerdo con un método ya descrito (10).

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la Tabla I muestran que el número total de PEC de ratones A/Sn y A.SW no son significativamente diferentes. En contraste, las poblaciones de macrófagos definidas por cualquiera de los dos criterios empleados, son significativamente diferentes entre estas dos cepas congénicas que sólo difieren en  $H-2$  ( $p < 0,005$ ).

TABLA I

Número de células peritoneales exudadas (PEC) y de macrófagos ( $M\phi$ ) de dos cepas congénicas de acuerdo con dos criterios diferentes

	Media del número de células x $10^6$ por ml $\pm$ E.S.		
	PEC	Células rojo neutro positivas	Células fagocitarias *
A.SW**	4,23 $\pm$ 0,34	1,65 $\pm$ 0,17	0,82 $\pm$ 0,08
A/Sn	4,58 $\pm$ 0,46	0,69 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,25

\* Células con uno o más eritrocitos endocitados.

\*\* 10 ratones por grupo.

En el análisis segregacional de este rasgo cuantitativo empleamos la técnica de identificación de  $M\phi$  por marcación con rojo neutro porque, aparte de su simplicidad y reproducibilidad, causa escasa mortalidad durante el período de manipulación y no presenta ambigüedades por tinción inespecífica del citoplasma.

Los resultados del análisis genético muestran (Tabla II) que los híbridos (A/Sn x A.SW) $F_1$  tienen cantidades de  $M\phi$  intermedias entre las de ambas cepas parentales. No se observan diferencias sexuales significativas ni diferencias apreciables entre los híbridos  $F_1$  de cruzamientos recíprocos.

Los resultados de los cruzamientos retrógrados (CR) de los ratones (A/Sn x A.SW) $F_1$  con ambas cepas parentales (A y B) se presentan en la Tabla II. El número

TABLA II

Segregación de *H-2* y del número de células rojo-neutro positivas ( $M\phi$ )<sup>a</sup>

Ratones <sup>b</sup>	$\bar{X} M\phi \times 10^6$ por ml $\pm$ E.S. de acuerdo con el genotipo <i>H-2</i>			
	<i>a/a</i>	<i>a/s</i>	<i>s/s</i>	$p^c$
Padres:				
A.SW	—	—	1,65 $\pm$ 0,17	—
A/Sn	0,69 $\pm$ 0,10	—	—	—
(A.SW x A/Sn)F <sub>1</sub>	—	0,91 $\pm$ 0,12	—	—
Cruzamientos retrógrados:				
A) (A.SW x A/Sn)F <sub>1</sub> x A/Sn	0,64 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	—	< 0,01
B) (A.SW x A/Sn)F <sub>1</sub> x A.SW	—	1,22 $\pm$ 0,13	1,30 $\pm$ 0,11	N.S. <sup>e</sup>

a Las cifras totales de PEC de A/Sn, A.SW, (A/Sn x A.SW)F<sub>1</sub> y de sus descendientes no fueron significativamente diferentes.

b 8 a 10 ratones por grupo.

c Los valores de  $\rho$  se obtuvieron por la prueba de *t*.

d Las diferencias entre la progenie *a/s* de los cruzamientos A y B,  $\rho < 0,025$ .

e N.S. no significativo.

de  $M\phi$  que aparece es la media de los recuentos individuales de 8 a 10 ratones de los diferentes genotipos *H-2*.

La progenie del cruzamiento A, (A/Sn x A.SW)F<sub>1</sub> x A/Sn, incluye ratones homocigotos *H-2<sup>a</sup>/H-2<sup>a</sup>*, (*a/a*), y ratones heterocigotos *H-2<sup>a</sup>/H-2<sup>s</sup>*, (*a/s*).

En el cruzamiento B, se produjeron homocigotos *H-2<sup>s</sup>/H-2<sup>s</sup>*, (*s/s*), y heterocigotos *H-2<sup>s</sup>/H-2<sup>a</sup>*, (*s/a*). La segregación de los genes *H-2* fue la esperada normalmente.

Los resultados principales fueron los siguientes: 1) los ratones F<sub>1</sub> presentaron valores intermedios de  $M\phi$  comparados con las cifras observadas en las cepas parentales, lo que indica un efecto codominante de los genes involucrados (Tabla II); 2) existe una diferencia significativa ( $\rho < 0,01$ ) entre el número de  $M\phi$  de los descendientes homocigotos *a/a* y los heterocigotos *a/s* en la progenie del cruzamiento A (Tabla II). Este hallazgo que ocurre en un cruzamiento entre dos cepas puras congénicas para *H-2* es evidencia del ligamento del gen o genes principales responsables de este carácter al locus *H-2*; 3) en la progenie del cruzamiento B, (A/Sn x A.SW)F<sub>1</sub> x A.SW, las diferencias del número de  $M\phi$  entre los homocigotos *s/s* y los heterocigotos *a/s*, no fueron significativamente diferentes, pero el número promedio de  $M\phi$  fue en todos los casos, significativamente mayor que el de los padres puros A/Sn, genéticamente

*a/a*; 4) la comparación entre la progenie heterocigota *a/s* de los cruzamientos A y B muestra una diferencia significativa ( $\rho < 0,025$ ) en el número de macrófagos.

Esto, aunque no invalida el ligamento con *H-2* de este polimorfismo, introduce una asimetría en el tipo de acción génica. Este no es un caso único, habiéndose observado asimetrías en la acción génica entre pares de cepas puras congénicas en la protección contra el daño por radiación en experimentos de trasplante de médula ósea (11). Estos resultados paradójales, pueden ocurrir en los sistemas genéticos complejos por recesividad de algunos alelos o por efectos epistáticos de genes complementarios presentes en una de las dos cepas en cruzamiento.

5) El análisis del número de  $M\phi$  en diferentes cepas puras resumido en la Tabla III refuerza el ligamento con *H-2*; de éstas, B10.A y A/Sn, que comparten un haplotipo *H-2<sup>a</sup>* de origen común (1), tienen un número medio similar, bajo de  $M\phi$ ; los ratones congénicos B10, B10.D2 y B10.Br comparten una cifra de  $M\phi$  alta que es significativamente diferente a la de la cepa congénica B10.A y de aquellas que presentan el haplotipo *H-2<sup>a</sup>*.

6) Finalmente, existen diferencias significativas ( $\rho < 0,005$ ) entre las cantidades medias de  $M\phi$  de los ratones C3H, AKR y

B10.Br, todos los cuales llevan un mismo haplotipo *H-2<sup>k</sup>*. Estas cepas no son congénicas ni están estrechamente emparentadas en su origen (1) y difieren en otros loci ligados con *H-2*.

El conjunto de los resultados de los cruzamientos entre el par congénico A/Sn x A.Sw (Tabla II) y los hallazgos señalados, indican con probabilidad que hay, por lo menos, dos loci que controlan el número de macrófagos exudados en el peritoneo: uno de ellos debe estar ligado al complejo *H-2*. No es posible aún determinar la importancia relativa de estos genes ni sus mecanismos de acción. La posibilidad de que éstos modulen la diferenciación desde células primitivas o monocitos a macrófagos merece una verificación experimental.

Aunque no fue el motivo principal de este trabajo el análisis del número de todas las poblaciones de células peritoneales, conviene señalar un hecho muy evidente que consiste en que el o los procesos que regulan el número de macrófagos son independientes de aquel o aquellos que afectan al número *total* de células p. ej.: B10.Br tiene un número alto de macrófagos y un promedio total bajo de células peritoneales. Lo inverso ocurre en B10.A (Tabla III).

TABLA III

Total de PEC y macrófagos en diferentes cepas de ratones adultos\*

Cepa	H-2	$\bar{X}$ de células x 10 <sup>6</sup> por ml $\pm$ E.S.	
		PEC	M $\phi$
B10	b	6,84 $\pm$ 1,04	1,62 $\pm$ 0,11
B10.A	a	6,43 $\pm$ 0,81	0,85 $\pm$ 0,11
B10.D2	d	7,37 $\pm$ 0,73	1,56 $\pm$ 0,17
B10.Br	k	3,66 $\pm$ 0,34	1,45 $\pm$ 0,18
AKR	k	5,58 $\pm$ 0,48	1,54 $\pm$ 0,10
C3H	k	3,48 $\pm$ 0,20	0,68 $\pm$ 0,04
A/Sn	a	4,58 $\pm$ 0,46	0,69 $\pm$ 0,10
A.SW	s	4,23 $\pm$ 0,34	1,65 $\pm$ 0,17

\* 8 ratones por grupo.

Como la contribución mayor al total de células, con exclusión de los macrófagos, está dada por los linfocitos, puede postularse y hay evidencias en la literatura (4) que genes, también ligados a *H-2*, podrían determinar mayormente este segundo polimorfismo.

Todos estos hechos e interpretaciones nos hacen postular el complejo *H-2* como un sistema mayor de control del número de los elementos celulares que intervienen en la respuesta inmune.

## AGRADECIMIENTOS

Publicación financiada parcialmente por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y Cooperación Internacional. Universidad de Chile, Proyecto B 421-81-34.

## REFERENCIAS

1. KLEIN, J. (1975). *Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex*. Chapter 2; pp. 16-37. Springer-Verlag, New York.
2. GELFAND, M.C., SACHS, D.H., LIEBERMAN, R., y PAUL, W.E. (1974). *J. Exp. Med.* 139: 1142-1153.
3. FERREIRA, A., y NUSSENZWEIG, V. (1976). *J. Immunol.* 117: 771-773.
4. IVANYI, P., GREGOROVA, S., y MICHOVA, M. (1972). *Folia Biol.* 18: 81-97.
5. COHN, Z.A., y BENSON, B. (1965). *J. Exp. Med.* 121: 153-169.
6. BAIRD, L.G., y KAPLAN, A. (1977). *Cell. Immunol.* 28: 22-35.
7. STUART, A.E., HABESHAW, J.A. y DAVIDSON, A.E. (1978). *Phagocytes in vitro*. Chapter 31, pp. 1-30. In: *Handbook of Experimental Immunology. Cellular Immunology*. D.M. Weir. Ed. Blackwell Scientific Publications.
8. SÖHNLE, P.G., y SUSSDORF, D.H. (1972). *Immunology*, 23: 361-374.
9. BUHLES, W. y SHIFRINE M. (1977). *J. Reticuloendothel. Soc.* 21: 285-289.
10. HOECKER, G., RAMOS, A., y FERREIRA, A. (1970). *Transplant Proc.* 2: 76-82.
11. HOECKER, G., MORGADO, F., RAMOS, A., y PIZARRO, O. (1962). *Genotypes and bone marrow transplantation*. In: *Ionizing Radiations and immune Processes*. pp. 381-401. Charles R. Leone, Editor. Gordon and Breach, Science Publishers Inc.