

Inhibición de la actividad fagocítica de macrófagos por sensibilización selectiva a aloantígenos del sistema H-2

M. Santamaria *, I. Molina, R. Garcia-Espejo, E. Aranda, M. C. Ortega y J. Peña

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina
Universidad de Córdoba
14004 Córdoba (España)

(Recibido el 21 de mayo de 1984)

M. SANTAMARIA, I. MOLINA, R. GARCIA-ESPEJO, E. ARANDA, M. C. ORTEGA and J. PEÑA. *Inhibition of Phagocytosis Ability of Peritoneal Macrophages by Selective Sensitization to H-2 Alloantigens*. Rev. esp. Fisiol., 41, 217-220. 1985.

The action exerted by selective sensitizations to alloantigens coded by the Major Histocompatibility System of the mouse, H-2, on the phagocytic ability of the mouse peritoneal macrophages has been studied. The results suggest that when immunizations are performed between completely incompatible animals for the H-2^k haplotype, after the third immunization the total number of macrophages able to carry out phagocytosis decreases very significantly. When the incompatibilities, however, are due to the left half of the H-2 system or to minor histocompatibility antigens, such an inhibition does not appear.

Key words: H-2 Alloantigens, Phagocytosis inhibition.

Se sabe que la respuesta inmune de tipo inespecífico, así como otras actividades no inmunes de las células responsables de aquélla, puede ser modificada por diversos factores, tanto *in vivo* como *in vitro*, entre ellos el pH del medio (1), la presencia de zinc en el entorno de la reacción (2), el estado nutricional del individuo (3), etc. Sin embargo, los mecanismos de regulación de este tipo de respuesta y la interrelación que guarda con la respuesta inmune de tipo específico, son aún mal conocidos ya que la

célula de mayor significación en los circuitos inespecíficos, el monocito-macrófago, es capaz de colaborar y desarrollar por sí misma respuestas de un alto grado de especificidad (4, 5).

En base a ello, hemos iniciado una serie de experimentos para estudiar la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales procedentes de ratones selectivamente sensibilizados con antígenos codificados por el Sistema Mayor de Histocompatibilidad (H-2), o con antígenos menores de histocompatibilidad. Se presentan en este trabajo los resultados obtenidos en la primera fase de los experimentos.

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

Material y métodos

Animales. Se han utilizado ratones de las cepas B10D2 (H-2^d), B10BR (H-2^k), B10A (H-2^s), Balb/c (H-2^d) y AKR (H-2^k), procedentes de la colonia del London Hospital Medical College (Universidad de Londres). En la tabla I se muestran los diferentes haplotipos H-2 de las cepas de ratones empleadas en los experimentos.

Inmunizaciones. Se realizaron mediante inyecciones i.p. de 5×10^7 células esplénicas de cada una de las cepas donantes sobre la cepa receptora. Las inmunizaciones se llevaron a cabo semanalmente durante 1, 3 y 5 semanas. Los experimentos se realizaron 4 días después de la última inmunización.

Test de fagocitosis. Los ratones fueron sacrificados mediante descerebración, previa anestesia. Los macrófagos fueron extraídos por lavado peritoneal con 4 ml de solución salina balanceada de Hank (Wellcome, U.K.), lavados mediante centrifugación a 1 200 r.p.m., durante 10 minutos y posteriormente resuspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 (Flow, U.K.), conteniendo 1 g/100 ml de L-glutamina (Flow) 200/mM y 250 µg/ml de cloxacilina ampicilina (Bencard). El pH del medio fue ajustado a 7,2-7,4 con bicarbonato sódico al 4,4 % (Wellcome). Los macrófagos fueron sembrados a una concentración de 5×10^5 /ml en alícuotas de 100 µl/pozo en placas Lab-Teck (Miles, USA) y, tras incubarlos durante 2 h a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂, se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Oxoid, U.K.) y se añadió a cada pozo 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640. Se dispensaron 20 µl/pozo de una suspensión al 1 % de partículas de látex (Sigma) de 0,082 µ de diámetro, incubándose durante 30 min más, a cuyo término fueron nuevamente lavados 3 ve-

ces con PBS y teñidas con una tinción de giemsa. La lectura de las placas se efectuó en un microscopio óptico a 1 000 aumentos, contándose un mínimo de 300 células/pozo.

Fue considerada fagocitosis positiva toda célula que contenía más de tres partículas de látex.

Resultados y Discusión

El número de macrófagos peritoneales con capacidad fagocítica, procedentes de ratones B10D2 inmunizados con esplenocitos de ratones B10BR, B10A, Balb/c y AKR respectivamente, alcanza la máxima inhibición cuando se ha inmunizado 3 veces consecutivas con ratones B10BR o AKR (incompatibilidad H-2 total). Los resultados se muestran en la tabla II así como los valores obtenidos cuando dichos ratones han sido inmunizados con células de B10A (incompatibles en la mitad izquierda de su haplotipo H-2) o con animales Balb/c (incompatibles en los sistemas menores de histocompatibilidad, excepto en el *M. locus*).

Tabla I. Haplotipos H-2 de las cepas de ratones empleadas en los experimentos.

Cepa	Complejo H-2				
	K	A	E	S	D
B10D2	d	d	d	d	d
B10BR	k	k	k	k	k
B10A	k	k	k	d	d
Balb/c	d	d	d	d	d
AKR	k	k	k	k	k

Al objeto de comprobar si el número de macrófagos presente en la reacción de fagocitosis sufría variaciones que pudieran ser responsables de los resultados obtenidos, se contabilizaba el número de macrófagos desprendidos en los proce-

Tabla II. *Inhibición del número de macrófagos peritoneales con capacidad para fagocitar tras repetidas inmunizaciones (%).*
(1) H-2^k total; (2) H-2^k parcial; (3) Sistemas Menores; (4) H-2^k total y Sistemas Menores; (5) H-2^d total.

Donante	Receptor	Incompatibilidad	1.º Inm.	2.º Inm.	3.º Inm.
B10BR	B10D2	H-2 (1)	1,5	67,6*	2,1
B10A	B10D2	H-2 (2)	16,8	12,4	3,2
Balb/c	B10D2	No H-2 (3)	1,6	17,6	5,2
AKR	B10D2	H-2 (4)	4,1	57,7*	6,8
B10D2	B10BR	H-2 (5)	15,2	10,7	4,3

* Altamente significativo.

sos de lavado, antes de ser incubados en presencia de látex (tabla III).

En los ratones B10D2 con esplenocitos de B10BR tras recibir 3 inmunizaciones se produce una intensa inhibición (67 %) del número de macrófagos peritoneales con capacidad para fagocitar partículas de látex. El número de macrófagos con capacidad fagocítica se consideró como 100 %. Los responsables de esta inhibición parecen ser los aloantígenos codificados por la mitad derecha del haplotipo H-2^k, ya que al inmunizar con células de B10A (incompatible en la mitad izquierda del haplotipo) no se observa tal inhibición; tampoco se aprecia tras inmunizarlos con células esplénicas de Balb/c, que difieren de B10D2 en los sistemas menores de histocompatibilidad.

Para comprobar que este fenómeno es realmente debido a aloantígenos codificados por el haplotipo H-2^k, se inmunizaron ratones B10D2 con esplenocitos de AKR (H-2^k) y ratones B10BR con esplenocitos de B10D2. En el primer caso se obtiene una inhibición del 57,7 % del número de macrófagos peritoneales con capacidad para fagocitar látex mientras que en el segundo no se altera el número de células peritoneales (macrófagos) con capacidad para fagocitar partículas de látex.

La falta de tal inhibición tras 5 inmunizaciones no es fácilmente explicable con los datos de que se dispone en la actualidad y se requieren más estudios para esclarecer este hecho.

Resumen

Se estudia la acción que ejerce la sensibilización selectiva a antígenos del Sistema Mayor de Histocompatibilidad del ratón, H-2, sobre la fagocitosis de macrófagos peritoneales. Cuando la inmunización se realiza entre animales totalmente incompatibles para el haplotipo H-2^k, tras la tercera inmunización, el número de macrófagos capaces de llevar a cabo esta función está disminuida de forma altamente significativa, no inhibiéndose cuando la incompatibilidad se debe a la mitad izquierda del sistema H-2 o a los sistemas menores de histocompatibilidad, así como para el haplotipo H-2^d.

Tabla III. *Número de macrófagos peritoneales presentes en los fluidos de lavado.*

Donante	Receptor	1.º Inm.	2.º Inm.	3.º Inm.
B10BR	B10D2	60 ± 7	47 ± 16	53 ± 11
B10A	B10D2	78 ± 10	61 ± 5	70 ± 7
Balb/c	B10D2	52 ± 7	64 ± 9	54 ± 7
AKR	B10D2	58 ± 6	68 ± 6	52 ± 12
B10D2	B10BR	47 ± 5	54 ± 9	61 ± 4

Bibliografía

1. BECK, A., BERGNER, S. y OFER, L.: *J. Bacteriol.*, **100**, 1204-1208, 1969.
2. CAPVIL, M., STANKOWA, L., BERNARD, P., WELDY, P. y CARLSON, E.: *J. Infect. Immunol.*, **16**, 367-375, 1977.
3. DOUGLAS, S. D. y SCHOOPER, M.: En «Malnutrition and the Immune Response» (R. M. Suskind, ed.), Raven Press, Nueva York, 1977, pp. 224-252.
4. EVANS, R. y ALEXANDER, P.: En «Immunobiology of the Macrophage» (E. Nelson, ed.). Academic Press. Nueva York, 1976, pp. 365-398.
5. OLSTED, R., KAPLAN, G. y SEJECID, R.: *Scand. J. Immunol.*, **16**, 421-425, 1982.