

Comportamiento inmunolectroforético de los sueros sanguíneos de los híbridos Cebú-Holstein

A. GRANADO J., H. PAUSTE, P. DUQUESNE Y D. DUQUE

Departamento de Investigaciones Pecuarias, C.N.I.C., Habana

Recibido en: Dic. 1969

ABSTRACT. Some antibovine antisera of Holstein, Zebú and F-1 (Holstein-Zebu) breeds were obtained. These antisera were studied vs the blood serums of each of the breeds. General results (common to the three breeds) and particular results (specific for each breed) were obtained. A deep study of some fractions and the effective individualization of others is recommended.

RESUMEN. Se obtuvieron antiseros antibovinos de las razas Holstein, Cebú y F-1 (Holstein-Cebú). Se estudian estos antiseros, frente a los sueros sanguíneos de cada una de las razas. Se obtienen resultados generales comunes a las tres razas y resultados particulares, específicos de cada raza. Se aconseja profundizar el estudio de algunas fracciones y la individualización efectiva de otras.

INTRODUCCION

Los resultados obtenidos por nosotros en el fraccionamiento proteico por electroforesis en papel, del suero sanguíneo de bovinos de raza Holstein (*Granado, inédito, 1969*) Cebú y el Híbrido F-1 de ambos, nos impuso la necesidad de tratar de buscar dentro de algunas de las fracciones cuantitativamente semejantes, algunas diferencias cualitativas, que nos permitirá conocer más profundamente las diferencias proteicas de los híbridos resultantes.

Para ello recurrimos al auxilio de la inmunolectroforesis que nos permitirá obtener mayor número de fracciones (*Berfeld, 1956; Block y cols., 1955; Brakke, 1955; Crewle, 1961; Erikssen, 1960; Grabar y cols., 1960; Kunkel, 1954; Laurel, 1963; Mac Donald, 1955; Tiselius y cols., 1953 y Weber, 1961*). Sabedores de antemano que resultaría imposible hacer un estudio exhaustivo de cada una de las fracciones proteicas nos inclinamos por señalar que aquellas que resultaran más perceptibles.

Para poder llevar a cabo las comparaciones entre los espectros inmunolectroforéticos del suero sanguíneo de los F-1, (Holstein-Cebú), necesitamos previamente el conocimiento de las inmunolectroforesis de sus progenitores la raza Cebú y la raza Holstein.

Para ello se inmunizaron tres grupos de conejos con los sueros de las razas Holstein, Cebú y F-1, y los antisueros de cada uno de ellos se pusieron frente a los de cada una de las razas.

MATERIAL Y METODO

Para llevar a cabo la obtención de los antisueros de las 3 diferentes razas bovinas, se formaron tres grupos de tres conejos cada uno y se inmunizaron según el siguiente esquema.

ESQUEMA

Se comenzó la prueba el día 22 de octubre de 1969.

Primera semana

- | | |
|------------------|---|
| 1a. Dosis día 22 | Se le inyectó 0.5 ml de suero bovino + 1.5 ml de suero fisiológico por vía intravenosa. |
| 2a. Dosis día 24 | Idem, al anterior. |
| 3a. Dosis día 26 | Idem, al anterior. |
| 4a. Dosis día 28 | Idem, al anterior. |

Segunda semana

- | | |
|----------------------|---|
| 2a. Dosis día 1 nov. | Se le inyecta 1 ml de suero bovino + 1 ml de suero fisiológico por vía intravenosa. |
| 3a. Dosis día 3 " | Igual al anterior |
| 4a. Dosis día 3 " | Idem, al anterior |
| 4a. Dosis día 5 " | Idem, al anterior |

Tercera semana

- | | |
|----------------------|--|
| 1a. Dosis día 7 nov. | Se le inyectó 1.5 ml suero bovino + 0.5 ml de suero fisiológico por vía intramuscular. |
| 2a. Dosis día 9 nov. | Idem, al anterior |
| 3a. Dosis día 11 " | Idem, al anterior |
| 4a. Dosis día 13 " | Idem, al anterior |

Cuarta semana

1a. Dosis día 15 nov.	Se le inyectó 2 ml de suero bovino por vía intramuscular
2a. Dosis día 17 nov.	Idem, al anterior
3a. Dosis día 19 "	Idem, al anterior
4a. Dosis día 21 "	Idem, al anterior

Es decir se comenzó la primera semana con 0.5 ml de suero bovino más 1.5 de suero fisiológico. Se le inyectó dosis en días alternos cada dosis. Así se le va aumentando la dosis o sea la cantidad de suero bovino cada semana se le disminuye 0.5 ml de suero fisiológico hasta que la última se le inyecta 2 ml de suero bovino puro.

OBSERVACIONES

La segunda dosis de la tercera semana aparecieron muertos dos conejos, uno inyectado con suero Cebú y el otro con F-1. Pensamos que no haya sido producto de la inmunización (o sea un shock anafiláctico) sino de la otitis que presentaban ambos conejos y que hayan hecho un absceso.

Se omitió la vía intravenosa por ofrecer peligro de shock anafiláctico a dos conejos por lo que se utilizó la vía intramuscular.

Preparación del Gel de Agar

Se utilizó agar de tipo ion agar, preparado inmediatamente antes de ser usado. Se preparó al 1.2% y se usó como solvente una solución buffer de veronal acetato, de pH 8.6 y F.I. 0.075. Para cada placa se utilizaron 8.5 ml del gel de agar en caliente. Las placas se usan al otro día.

Fraccionamiento Electroforético

El fraccionamiento proteico se efectuó por el método agaforesis utilizando sol. buffer de pH 8.2 y F.I de 0.075.

El tiempo de migración fue de dos horas con 14 mA por placa, la inmunodifusión se hizo por el método de Outcherlony, dejando la placa en cámara húmeda durante 24 horas.

La coloración que se usa es de Negro Amido al 2% y la decoloración se llevó a cabo con una mezcla de Metanol-Acido-Acético agua. Los sueros utilizados

fueron 50 muestras de vacas F-1 de primer parto, 15 muestras de Holstein hembra y 15 de Cebú, comercial. Cada una de estas muestras luego de fraccionadas se pusieron frente a cda uno de los antisueros de conejos, es decir todos los sueros de F-1, contra antisueros F-1, contra Holstein y contra los antisueros de Cebú. Y lo mismo se hizo con los sueros de Holstein y de Cebú.

DISCUSION

Dada la escasa información (*Cornelius, 1963 y Williams y cols., 1955*) llegada hasta nosotros sobre el comportamiento inmunoeléctroforético de los sueros bovinos, utilizamos para la inmunización el esquema antes descrito, en lugar del usado por nosotros en otros trabajos, (*A. Granado y cols., 1965*) para inyectar solamente como antígeno el suero bovino, en solución salina, y no acompañado con sulfato aluminico, potásico, al fin de evitar la presencia de elementos coadyuvantes.

Una vez obtenidos los antisueros utilizamos la de todos los conejos, sacrificando a veces la mayor cantidad de anticuerpo de alguno de ellos para de ese modo evitar que interviniera algún factor individual. (*Outcherlony, 1958, Hirschfeld, 1960 y Svenson y cols., 1955*).

Para la obtención del gel de agar así como para la migración inmunoeléctroforética utilizamos el Buffer Barbitol Acetato, en lugar de Barbitol Citrato o Barbitol Sódico-Barbitol Acido, al objeto de que la migración catódica y anódica pudiera hacerse más notable.

Se estudiaron separadamente los antisueros de cada una de las razas: Cebú, Holstein y F-1 (Cebú-Holstein) y obtuvimos los siguientes resultados que dividimos en generales y particulares.

RESULTADOS

Frente a los tres tipos de antisueros se obtuvieron varias fracciones movilizadas anódicamente, de las cuales nosotros estudiamos cuatro:

- 1) Que migra a la zona de albúmina
- 2) Que migra a la zona de α_1 (presuntamente glicoproteína)
- 3) Que migra a la zona de α_2 (lipoproteína)
- 4) Que migra a la zona de α_2 (macroglobulina)

En la zona de la migración catódica (o tal vez pudiera llamarse endosmática) se obtienen también varias líneas de precipitación en las que estudiamos:

- 1) La beta 1 lipoproteína
- 2) La transferrina
- 3) Tres fracciones en la porción de las inmunoglobulinas que denominan $\gamma_{1,A}$; $\gamma_1 M$ y γ_2 .

Como en nuestros estudios queríamos centrar la atención en la zona de las inmunoglobulinas, se usó una dosis más de suero para tratar de reactivar éstas. Como consecuencia en las inmunolectroforesis frente a antisueros-anti-Cebú y anti-Holstein el exceso de anticuerpos redisolvió el precipitado de la albúmina arrastrando algunas fracciones de las α_1 globulinas. No así los anti-F-1.

Antisero Anti-F-1

Antisero anti-F-1, frente a los sueros Holstein y Cebú, prácticamente no marca la zona de albúmina y donde se observa se ve más larga la correspondiente al suero de Holstein y más cóncava la de los sueros de Cebú; frente al propio suero F-1, las albúminas se ven muy semejantes entre sí.

En todas se observan bien las α_1 glicoproteínas aunque a la técnica de coloración de Schiff o de N.A.D.I. no se colorean tan bien como en los sueros humanos.

La α_2 macroglobulina y α_2 lipoproteína se observa bien en todas las razas, y muy especialmente en las F-1.

La transferrina es muy visible en las tres razas y merece un estudio especial más detallado, teniendo en cuenta su importancia genética y como transportadora de hierro.

La B_1 lipoproteína ofrece en todas las razas, como un halo alrededor del pozo, y no se colorea muy bien ni por el oil red, ni el Sudan IV.

En las inmunoglobulinas encontramos que la γ_2 está muy marcada en sueros de razas Cebú.

En la Holstein se marca muy bien la línea correspondiente a γ_2 .

En las F-1 se ven diferencias en las zonas de $\gamma_{1,A}$ y $\gamma_1 M$; donde hay unas líneas más marcadas que otras, diferencia que nosotros consideramos muy importantes. (Sueros No. 83-84 0 102-109). Se ve muy netamente marcada la fracción γ_2 .

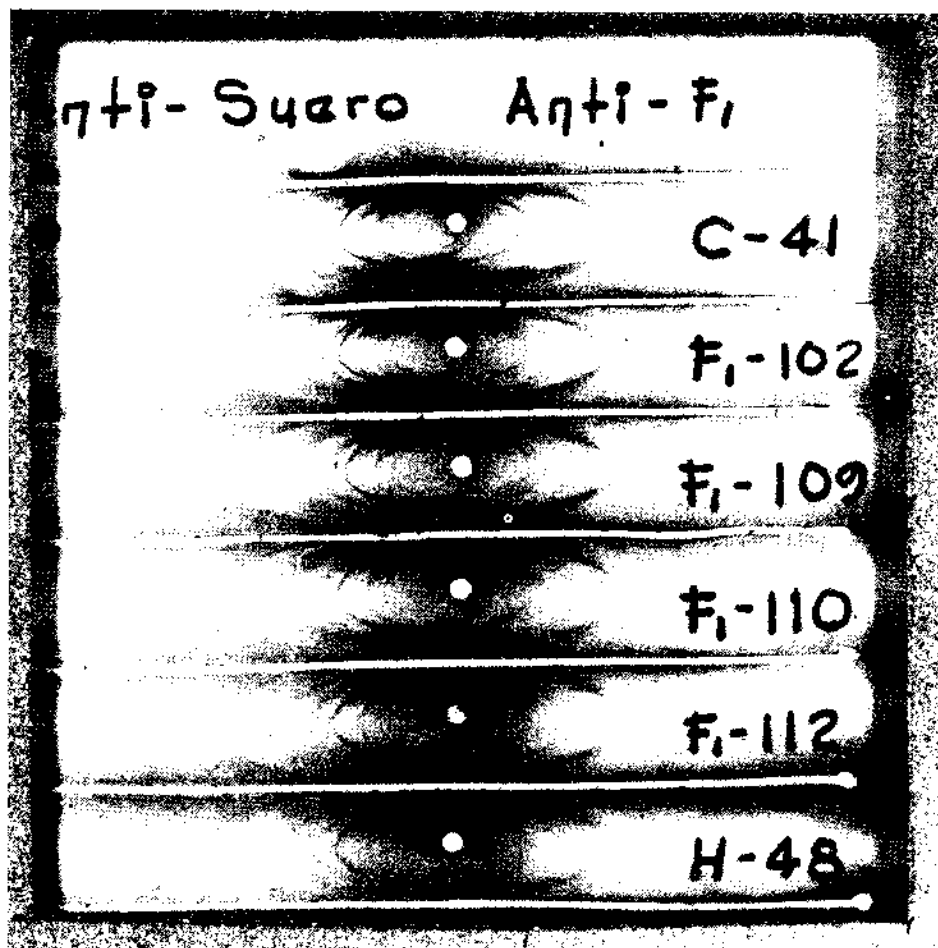


FIG. 1. Inmunolectroforesis de sueros de bóvidos de razas Holstein, Cebú e híbrido F-1 (H-C) frente a antisueros de F-1 (H-C). (Explicación en el texto).

Frente a Antisuero Anti-Cebú

Debido a nuestra necesidad de realzar las líneas correspondientes a la inmunoglobulina, el exceso de anticuerpos de albúmina, ha redissuelto el precipitado arrastrando consigo parte de las α_1 globulinas.

La zona de la transferrina ofrece muy neta y es muy semejante a todas las razas.





FIG. 3. Inmunoelectroforesis de sueros de bóvidos de razas Holstein, Cebú e híbrido F-1 (H-C) frente a antisueros de Holstein. (Explicación en el texto).

Frente al suero de Cebú son muy visibles las líneas γ_1A ; γ_1M ; y γ_2 , pero no muy marcadas.

Frente a su propio suero hay redisolución de la albúmina por exceso de anticuerpo, y las otras fracciones se observan bien.

El suero de F-1, precipita muy bien con este anti-suero en la región de las inmunoglobulinas se marcan muy bien las tres fracciones γ_1A ; γ_1M y γ_2 .



FIG. 4. Inmunolectroforesis de sueros de bóvidos de razas Holstein, Cebú e híbrido F-1 (H-C) frente a antisueros de Holstein. (Explicación en el texto).

CONCLUSIONES

- 1) En los estudios practicados para la obtención de antisueros anti-F-1, se observa que los antisueros de conejo obtenidos por inyección de sueros de F-1 y Holstein obtienen mejores fracciones que los de Cebú.
- 2) Aparecen diferencias notables a nivel de las transferrinas, fracción que por su importancia genética y fisiológica será estudiada por nosotros próximamente.

- 3) Aparecen a nivel de las inmunoglobulinas diferencias que deben ser estudiadas más profundamente para determinar su carácter hereditario o su relación con la mayor o menor resistencia del animal al medio que lo rodea.
- 4) Se sugiere la idea de efectuar un estudio más detenido de las fracciones, glico y lipoproteicas de los sueros, así como de fracciones como ceruloplasmina y las haptoglobinas.

REFERENCIAS

- BERFELD P. M. S. A modified Method for Protein Separation by Zone Electrophoresis on A Starch Gel. *J. Biol. Chem.*, 60, 220, 1956.
- BLOCK R. D., ZWEIG E. L. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, A. Manual. Academic Press, New York, 1955.
- BRAKKE M. K. Zone Electrophoresis of Dyes, Proteins and Zone Electrophoresis of Dyes Proteins and Viruses in Density Gradient Columns of Sucrose Solutions, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 55, 175, 1955.
- CORNELIUS CH. Biochemistry of Domestic Animals, Academic Press, London, New York 1963.
- CREWLE A. J. Inmunodifusión, Academic Press, New York and London, 1961.
- ERIKSSON S. The Electrophoretic Alpha₁ Globulin Pattern of serum in antitrypsin deficiency, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 132, 1960.
- GRABAR P., WILLIAMS G. A. Analyse Immunoelectrophoretique Masson Cic. Paris, 1960.
- GRANADO, MASSOPUST., PÉREZ ATENCIO. La Inmuelectroforesis Rev. Pediatría Vol., 37 No. 3 Junio 1965.
- HIRSCHFELD, J.: Characterization of precipitating components in normal human sere obtained by an immunoelectroretic technique Acta pathol. Microbiol. Scandinav. 49:255, 1960.
- KUNKEL, H., "Zone Electrophoresis", en Methods of Biochemical Analysis, I, 141-70. D. Glick, Direct. Interscience Publishers. New York, 1954.
- LAUREL, C. B. The electrophoretic Alpha I globulin pattern of serum in Alpha I antitrypsin deficiency. Scand. J. Clin Lab. Invest. 15: 132, 1963.
- MACDONALD, H. J. Ionography, Electrophoresis in Stabilized Media Year Book Publishers, Chicago, III. 1955.
- OUTCHERLONY O. Diffusion Gel |Methods for Immunological Analysis, Prvgr., Allergy, 5, 1, 1958.
- SVENSON H, VALMET E. Density Gradient Electrophoresis. A new method of separating electrically Charged compounds. Science Tool 2, 11-13 1955.
- TISELIUS, A., FLODIN P. "Zone Electrophoresis" en advances in Protein Chemistry, VIII, 461-85. Academic Press. New York, 1955.
- WEBER THOMAS B. Electrophoresis Analysis of Bovine serum by vertical and horizontal tips of apparatus Amer. Jour. Vet. Res 25 (105): 386-390. 1961.
- WILLIAMS F. G., JR., PIKELS E. L. "Improved Hangi-Strip Paper Electrophoresis Technique". Science, 121, 829-30 (1955).