

SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN OVINOS (OLA): I. OBTENCIÓN DE SUE-
ROS REACTIVOS A PARTIR DE HEMBRAS PRIMÍPARAS Y MULTÍPARAS DE LA RAZA
MERINA.

(MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN SHEEP (OLA): I. PRODUCTION OF TYPING
SERA FROM PAROUS DAMS OF SPANISH MERINO SHEEP).

por

De Luca d'Oro, Gloria M.* y D. Llanes**

* Cátedra de química biológica. Facultad de ciencias médicas. Universi-
dad Nacional de Córdoba. C.C. 35 Suc. 16/5016 Córdoba. República Ar-
gentina.

** Departamento de genética. Instituto de zootecnia. Facultad de veteri-
naria. Universidad de Córdoba. 15005 Córdoba. España.

Palabras clave: Animales domésticos. Inmunogenética.

Keywords: Livestock. Immunogenetics.

Summary

Sera from 122 parous Merino sheep were screened for cytotoxic antibodies against sheep lymphocytes. Twenty antisera were selected. These sera were subjected to cluster analysis, and six specificities, designated M1-M6 were detected.

Resumen

Sueros procedentes de 122 ovejas paridas, de raza merina, han sido a-
nalizados en cuanto a su capacidad citotóxica contra antígenos linfocita-
rios ovinos. Se han encontrado 20 sueros positivos, los cuales han sido a-
grupados, por medio de un análisis de agrupamiento (clúster), en seis es-
pecificidades llamadas M1-M6.

Recibido para publicación el 13-2-1986.

Introducción

El nombre de antígenos de histocompatibilidad hace referencia al hecho de que intervienen en el rechazo de trasplantes. La región donde se sitúan los genes que controlan estos antígenos se conoce por complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Fue descrito en primer lugar en el ratón, pero análogos sistemas se han encontrado en todas las especies de mamíferos y aves estudiadas hasta ahora (Gotze, 1977).

El estado de caracterización de los antígenos de histocompatibilidad, para las especies domésticas, es escaso si lo comparamos con la especie humana, primates y ratón.

En ovinos se han obtenido evidencias de este sistema, conocido por OLA (Ford, 1974, 1975; Millot, 1971, 1979, 1984; Stear y Spooner, 1981; Cullen y col., 1982).

Los estudios del MHC, en animales domésticos, se han ligado al conocimiento de la asociación entre el MHC y la regulación de la respuesta inmune y, por lo tanto, a la sensibilidad o resistencia a ciertas enfermedades, de individuos con un determinado sistema antigénico (Cullen y col., 1982). De aquí el interés que presenta su estudio, ya que un conocimiento más preciso de la distribución de los antígenos de histocompatibilidad, dentro de los rebaños, puede permitir detectar asociaciones con diversas enfermedades. Esta asociación ha sido descrita entre los antígenos OLA-A4-AB y B6 y la enfermedad conocida por scrapie o tembladera (Millot, 1982).

Hasta el presente, en nuestro país no se han realizado trabajos sobre el MHC en ovinos, por lo que nuestros primeros pasos se han dirigido a la obtención de sueros reactivos que nos permitan conocer la distribución de antígenos linfocitarios en razas españolas. En estos estudios utilizaremos, para la obtención de los sueros reactivos, el suero procedente de hembras primíparas y multíparas.

Material y métodos

El suero analizado se obtuvo de hembras paridas de raza merina. Las células se extrajeron de animales de diversas razas (tabla I).

SUEROS. Se ensayaron 122 sueros de ovejas primíparas y multíparas. Los sueros fueron separados de la sangre venosa e inactivados a 56° C, durante

30 minutos, y luego fraccionados y guardados a -20° C hasta su utilización en la prueba de microcitotoxicidad.

Como control de citotoxicidad positiva se usó un suero de conejo antilinfocitos ovinos, obtenido por inmunización de un conejo, con suspensiones de linfocitos de ovejas en PBS, que contenían, generalmente, de 3 a 5×10^6 células por mililitro, inoculando 0,5 ml cada vez. Las inoculaciones se realizaron dos veces por semana, durante tres semanas, por inyección intradérmica.

Al cabo de dos semanas de la última inoculación se obtuvo suero por extracción intracardiaca de sangre. El título de citotoxicidad del suero fue, al menos, de 1/132. Como control negativo, las células fueron enfrentadas a PBS, en lugar de suero.

Inicialmente fueron enfrentados los sueros, sin diluir, con linfocitos de al menos 35 ovejas. Los sueros que no mostraron ser claramente positivos, y los negativos, fueron descartados. Así mismo, los sueros que resultaron positivos fueron absorbidos con eritrocitos; y posteriormente, titulados.

CELULAS. La obtención de linfocitos se realizó según técnica de Stear y Spooner (1981) modificada: 2 ml de sangre heparinizada fueron volcados sobre 2,5 ml de Ficol-Urografin Schering 76% (densidad 1078 g/ml) y centrifugados en gradiente de densidad, durante 40 minutos, a 4000 g, en centrifuga refrigerada. La interfase, rica en linfocitos, fue recuperada y lavada por tres veces con PBS, a 1600 g, durante 10 minutos cada vez. Después del primer lavado fue agregado un mililitro de tampón lisis, en frío, para quitar los restos de eritrocitos. Finalmente la pella de células fue resuspendida en PBS. Después del conteo las concentraciones fueron ajustadas a $5-6 \times 10^6$ células, por ml. La viabilidad y pureza de las células fue determinada en microscopio con cámara Neubauer, hemocitométrica.

PRUEBA DE CITOTOXICIDAD. Se realizó según técnica de Terasaki y McClelland (1964) ligeramente modificada: dentro de las placas Terasaki, los reactivos fueron distribuidos con una jeringa Hamilton, a razón de 2 microlitros de suero. Cada microlitro de suspensión linfocitaria contenía entre 5000 y 6000, y un microlitro de complemento (proviene de suero de conejo libre de citotoxicidad). Las placas fueron incubadas a 37° C; las células fueron fijadas con tres microlitros de formalina al 30%, en PBS, pH 7,2, y cubiertas con aceite de parafina, hasta su lectura.

El porcentaje de citotoxicidad fue determinado usando un microscopio

de contraste de fases, de luz invertida. Citotoxicidades menores de 30% se consideraron negativas (fig. 1c); y entre 35-60%, relativamente positivas (fig. 1b); y las superiores al 65%, positivas (fig. 1a). Cada antisuero fue comprobado con cada individuo, por duplicado y al menos en dos diferentes ocasiones.

PROCEDENCIA DE LAS CELULAS. Las de oveja se obtuvieron de diferentes fuentes (tabla I).

COMPLEMENTO. Fueron ensayados complementos provenientes de diversos animales y complemento humano. Si bien el complemento humano demostró ser el más efectivo, se usó complemento de conejo, por ser más accesible (fig. 2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Los antisueros seleccionados fueron analizados por comparación 2 por 2, de pares de antisueros, donde cada suero fue comparado con todos los otros (van Dam y col., 1981). La significación de la similitud se midió con una décima de χ^2 de independencia; y el grado de asociación fue expresado por el coeficiente de correlación (r, tabla II). Los sueros más similares fueron agrupados de acuerdo con el método de Sorensen (Dagnielie P., 1975).

Resultados y discusión

De los 122 sueros ensayados, 27 fueron positivos; 8, dudosos; y el resto, negativos. Los sueros dudosos y los negativos fueron eliminados, y los positivos fueron absorbidos con eritrocitos, quedando definitivamente 20 sueros claramente positivos; sueros que representan un 16% del total de los ensayados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Cullen y col., 1981), quienes observaron variaciones de sueros positivos entre el 50% y el 20%. Los títulos de estos sueros se expresan en la figura 3. Puede observarse que el título es bajo, y no debe extrañar, ya que, en general, nuestro método implica la obtención de escaso título, que se compensa con la presencia de una especificidad mayor en los sueros. Los bajos títulos, pensamos, podrán ser superados por un posterior proceso de inmunizaciones que se están realizando actualmente en nuestro laboratorio. Los sueros obtenidos se presentan, en su mayoría, como mono-específicos, ya que su comportamiento es similar cuando se han enfrentado a célu-

las de al menos tres animales distintos. Sin embargo, el suero número treinta (30) parece ser multiespecífico, ya que presenta dos títulos (1/4 y 1/8) distintos, con células de dos animales diferentes.

Los veinte sueros reactivos obtenidos fueron sujetos a un agrupamiento dentro de una especificidad, a base de los valores del coeficiente de correlación, dando lugar a seis grupos antigénicos (tabla III y figura 4). Hacemos resaltar cómo el único suero monoespecífico aparece integrado en un grupo aparte (M6). Cada grupo de determinantes antigénicos fue probado con veinte (20) células diferentes y se observó que sueros del mismo grupo presentaban un mismo modelo de reacción.

En todos los casos los sueros fueron utilizados al título 1; por lo tanto, el suero 30, que pare reconocer dos especificidades, ha sido considerado como monoespecífico y no se conoce hasta el momento si la segunda especificidad es similar a alguna de las detectadas por los otros sueros.

Estos grupos antigénicos, detectados por nuestros sueros, han sido provisionalmente nombrados como M1, M2, M3, M4, M5 y M6, y su denominación definitiva está pendiente del estudio de su forma de herencia, que en estos momentos estamos analizando en nuestro laboratorio.

Agradecimientos

Queremos agradecer al Depósito de sementales ovinos (Hinojosa del Duque) y, especialmente, al director del centro, D. José Aparicio Ruiz, por las facilidades dadas en la obtención de las muestras.

El presente trabajo ha sido financiado, en parte, por el proyecto de investigación número CP8414/1985, concedido por la Junta de Andalucía.

Bibliografía

- Cullen, P.R., C. Bunch, and P. Morris. 1981. Animal Blood Groups and Biochemical Polimorphism 12: 148-159.
- Dagnielie, P. Edt. 1975. Les Presses Agronomiques de Gembloux. Gembloux. Belgique.
- Dam R.H.van. 1981. The major histocompatibility complex of goat. Definition and some aspects of its biological function. Tesis doctoral. Universidad de Utrech.
- Ford, C.H. 1974. J. Immunogenetics 1: 345-354.
- Ford, C.H. 1975. J. Immunogenetics 2: 31-40.

- Goetze, D. 1977. The major histocompatibility system in man and animals. Springer Verlag. Berlin.
- Millot, P. 1971. Comptes rendus de l'Academie des Sciences (D) París 273: 2028-2030.
- Millot, P. 1978. Anim. Blood Groups Biochem. Genet. 9: 115-121.
- Millot, P., J. Chatelain y F. Cathala. 1982. C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., París, 294: 87-89.
- Millot, P. 1984. Expl. clin. Immunogenet. 1: 31-42.
- Stear, M.J., and R.L. Spooner. 1981. Anim. Blood Groups Bioch. Genet. 12: 265-276.
- Terasaki, P.I. 1964. Nature, 204: 998-1000.

Tabla I. Razas, número de animales y procedencia de los utilizados en nuestro estudio.

Raza	Nº animales	Procedencia
SUEROS		
Merina	122	Depósito sementales ovinos (Hinojosa)
CELULAS		
Landschaf	12	Granja Diputación. Córdoba
Merina	7	Depósito sementales ovinos (Hinojosa)
Merina	11	Particular
Romanof	2	"
Manchega	1	"
Segureña	1	"
TOTAL	34	

Tabla II. Fórmulas usadas para el análisis estadístico de los sueros.

1. tabla 2 x 2

antisuero 2

		+	-	
antisuero 1	+	A	B	A + B
	-	C	D	C + D
		A+C	B+D	N = A+B+C+D

2. χ^2 cuadrado para independencia: (χ^2 ind.)

$$\chi^2 = \frac{(A \cdot D - B \cdot C)^2 \cdot N}{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)}$$

3. Coeficiente de correlación:

$$r = \sqrt{\frac{\chi^2 \text{ ind.}}{N}}$$

Tabla III. Coeficientes de correlación entre parejas de sueros probados en 35 ovejas. Subrayados los valores significativos.

SUEROS	2	56	62	3	23	52	60	8	4	11	70	18	7	6	64	12	<u>89</u>	93	80	30	
2																					
56		56	M1																		
62		93	91																		
3		56	53	85																	
23		<u>41</u>	<u>35</u>	<u>86</u>	<u>85</u>																
52						M2															
60						<u>84</u>															
8						79	70														
4						<u>42</u>	73	66													
11										M3											
70										79											
18										57	73										
7										<u>41</u>	75	64									
6																					
64																					
12																					
89																					
93																					
80																					
30																					

M6

Figura 1. Fotomicrografía de linfocitos de ovejas, tras la realización de la prueba de microcitotoxicidad. A, células muertas \approx 90%. B, células muertas \approx 30-40%. C, células muertas \approx 20%.

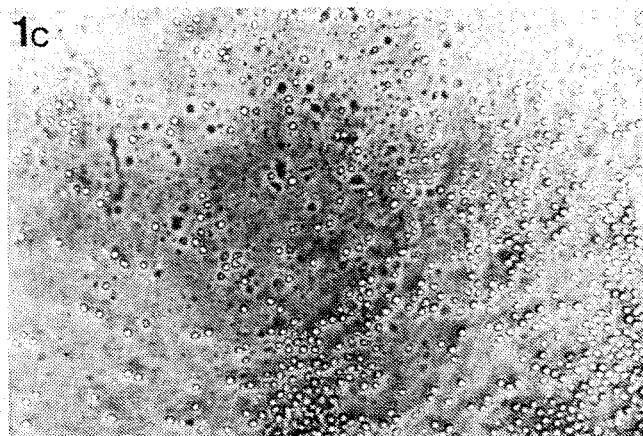
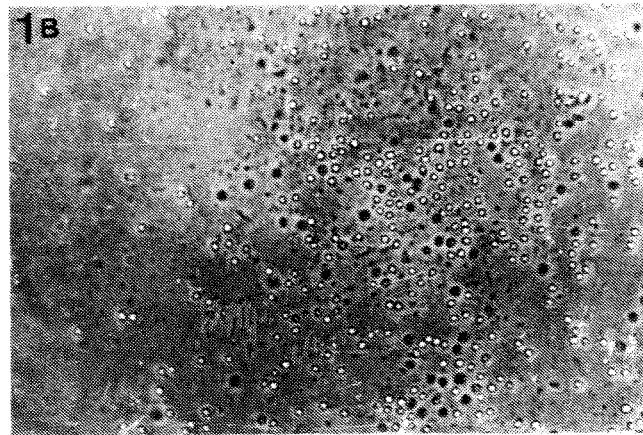
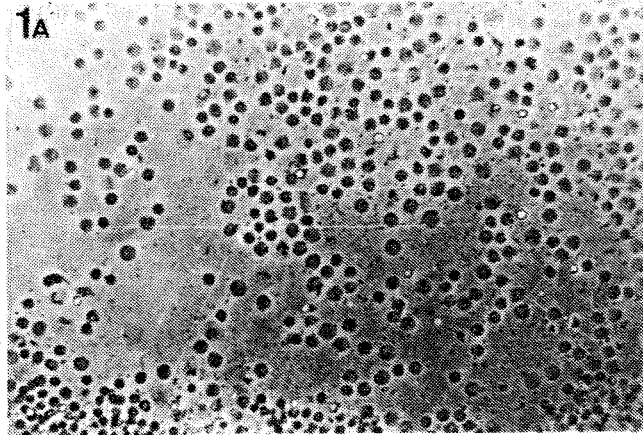


Figura 2. Distintas fuentes de complemento utilizadas. Suero humano ▲ ;
 suero de conejo □ ; suero de cobaya ■ ; suero de cabra △ .
 Figura 3. Título de los 20 sueros positivos obtenidos.
 Figura 4. Agrupación de los sueros respecto a su similitud (método de
 Sorensen).

