

«OBTENCION DE SUEROS REACTIVOS EN LA DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS OVINOS Y SU APLICACION CON LOS POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS AL ESTUDIO INMUNOGENETICO DE LA OVEJA CHURRA»

Por Fermín San Primitivo Tirados

INDICE

INTRODUCCION.-SECCION 1.^a.-I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-II. MATERIAL Y METODOS.-II.1. Definiciones.-II.2. Reacción de hemólisis.-II.2.a. Material de laboratorio.-II.2.b. Preparación del test.-II.2.c. Realización del test.-II.2.d. Lectura del test.-II.3. Dinámica en la obtención de reactivos.-II.3.a. La población problema.-II.3.b. Parejas donante-receptor.-II.3.c. Desarrollo del proceso de inmunización.-II.3.d. Pruebas de potencia y obtención de sueros.-II.3.e. Pruebas de absorción.-II.3.f. Titulación de los reactivos.-II.3.g. Contrastación de los reactivos.-II.3.h. Conservación de los reactivos.-III. RESULTADOS Y DISCUSION.-SECCION 2.^a.-I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-II. MATERIAL Y METODOS.-II.1. Material animal.-II.2. Material de laboratorio.-II.3. Extracción y preparación de las muestras.-II.4. Determinación de grupos sanguíneos.-II.5. Determinación de polimorfismos bioquímicos.-II.5.a. Hemoglobinas.-II.5.b. Transferrinas.-II.5.c. Albúminas.-III. RESULTADOS.-IV. DISCUSION.-CONCLUSIONES.-RESUMEN.-BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

A raíz del descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos humanos ABO por Landsteiner en 1900, y de su aplicación directa en la transfusión sanguínea, probada suficientemente durante la Primera Guerra Mundial, numerosos investigadores trataron de trasladar estos avances al campo de los animales superiores.

Durante las primeras décadas del Siglo XX, las investigaciones sobre grupos sanguíneos animales no dieron un resultado satisfactorio, debido sin duda al intento de obtener un sistema similar al hallado por Landsteiner en la especie humana.

A partir de la década de los años 50, con la introducción de las técnicas de

inmunización, las investigaciones comenzaron a arrojar resultados positivos, iniciándose el estudio de diferentes polimorfismos sanguíneos y llegando a establecerse en diversas especies animales, sobre todo en la especie bovina, unos cuadros serológicos suficientemente extensos como para ser aplicados a identificación, estudios genéticos y correlaciones diversas.

Hoy, con las modernas técnicas y el auge que ha experimentado la Inmunogenética existen fundadas esperanzas de que los polimorfismos en general —utilizados como marcadores genéticos— puedan contribuir en gran medida, al conocimiento genético de las distintas especies de animales domésticos.

Esta importante actualidad de los polimorfismos sanguíneos animales es la que nos ha inducido a estudiar, en una de nuestras razas autóctonas ovinas, aquellos polimorfismos que creemos más importantes actualmente y de mayor aplicación, con la intención de sentar las bases para una investigación futura en este mismo campo de la Inmunogenética animal.

Hemos elegido el ganado ovino como objeto de nuestro trabajo por varias causas. En primer lugar por la importancia numérica de este ganado en el Censo Nacional, aproximándose a los 20 millones de cabezas, con fluctuaciones anuales; así como en el Censo Provincial con cerca de medio millón de cabezas. En segundo lugar, el Departamento de la Facultad de Veterinaria en el que estamos integrados, trabaja fundamentalmente sobre nutrición ovina, por lo que pretendemos completar estos trabajos con nuestra pequeña aportación, desde un ángulo distinto pero en cierto sentido complementario. La tercera razón se basa en el hecho de que la Estación Agrícola Experimental de León puso a nuestra disposición un rebaño perfectamente controlado y de historial conocido, en el que podíamos iniciar perfectamente estos trabajos. Por otra parte, este trabajo constituye el resultado de la colaboración de dos Departamentos de las Facultades de Veterinaria de León y Zaragoza; en esta última Facultad se ha constituido un núcleo importante de investigadores en el campo de la Inmunogenética, las técnicas puestas a punto y la experiencia adquirida por este grupo, ha constituido la última razón de la elección del ganado ovino como objeto de nuestro trabajo.

Hemos dividido nuestra Tesis Doctoral en dos grandes secciones, por razones de ordenación de los trabajos realizados. En la primera sección incluimos los trabajos destinados a la obtención de los reactivos de grupos sanguíneos, como trabajo experimental de base, ya que presenta la máxima dificultad en el contexto de la determinación de grupos sanguíneos. Una vez finalizada esta primera fase, iniciamos la segunda sección en la cual aplicamos los reactivos obtenidos, junto con las técnicas de determinación de Polimorfismos Bioquímicos (Hemoglobinas, Transferrinas y Albúminas), a un rebaño típico de raza Churra, pretendiendo introducir en nuestro trabajo algunas de las aplicaciones mejor estudiadas del conjunto formado por los Grupos Sanguíneos y los Polimorfismos Bioquímicos.

Finalmente deseamos dejar constancia aquí de la nomenclatura que hemos empleado en cuanto a grupos sanguíneos se refiere. Es bien sabido que desde el comienzo de las investigaciones sobre grupos sanguíneos, se han empleado dos tipos de nomenclatura. Una utilizada hasta el año 1972, propia de cada centro de investigación y que en muchas ocasiones no concordaba con las nomenclaturas utilizadas en otros centros, lo cual inducía al confusiónismo. Otra, utilizada a partir de la reunión celebrada en julio de 1972 en Jouyen-Josas, a la que asistieron investigadores de todo el mundo y en la cual se dictaron las bases por las que regirse en nomenclatura de grupos sanguíneos ovinos. En nuestro trabajo utilizamos esta segunda nomenclatura, aún incompleta, pero admitida internacionalmente.

Por razones de espacio, no ha sido posible incluir la parte de esta tesis correspondiente a la Revisión Bibliográfica.

SECCION 1.^a—PREPARACION DE SUEROS REACTIVOS EN LA DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS OVINOS.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como ha quedado expresado en la introducción, la determinación de los grupos sanguíneos en las especies animales presenta una gran importancia en la actualidad.

Para realizar esta determinación es preciso llevar a cabo una investigación previa, consistente en obtener los reactivos precisos, ya que éstos son patrimonio privado de los laboratorios especializados y no existen en el mercado.

Esta investigación previa presenta una gran dificultad para un doctorando ya que precisa conocimientos inmunogenéticos especiales, grandes medios en animales y material de laboratorio y un equipo especializado en la materia.

Teniendo en cuenta estas grandes limitaciones se ha realizado este trabajo con la finalidad de conseguir resultados previos que permitan en el futuro abordar ampliamente el problema e iniciar una investigación más profunda en este campo.

En principio nos enfrentamos con la dificultad de la total ausencia de investigaciones sobre grupos sanguíneos ovinos en nuestro país, lo que nos animó aún más a iniciar estas investigaciones que creemos de gran interés en un futuro inmediato.

Nuestra primera y mayor limitación era nuestra propia escasez de conocimientos, por lo que tratamos de documentarnos en el tema, revisando una amplia bibliografía.

Finalizada esta etapa inicial y merced a una Ayuda de la Fundación «José Fernández», concedida por la Universidad de Oviedo, nos trasladamos a París donde junto a la Doctora Podliachouk, investigadora del Instituto Pasteur,

tuvimos oportunidad de introducirnos en las técnicas generales inmunogenéticas y asentar los conocimientos adquiridos durante la revisión de la bibliografía. Más tarde, en el Laboratorio de Genética Bioquímica del I.N.R.A. de Jouy-en-Josas, comenzamos el planteamiento general de nuestros experimentos con el Doctor Nguyen, especialista muy cualificado en investigación de grupos sanguíneos ovinos, quien se comprometió a realizar el examen de los grupos sanguíneos de las ovejas que manejaríamos en nuestras investigaciones y a guiarnos en nuestros primeros pasos.

Ya desde el principio elegimos como base la especie ovina y en particular la raza Churra. Esta elección se basa en el hecho de la conexión existente entre el Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de León al que estamos adscritos y la Estación Agrícola Experimental de León, perteneciente al C.S.I.C., que dispone de un rebaño de ovejas de raza Churra. Por otra parte, toda la investigación que lleva a cabo el citado Departamento versa sobre este ganado y se consideró de interés para el mismo la realización de estos experimentos.

A parte del hecho fundamental anteriormente expuesto, no hemos de olvidar que la producción ovina representa un porcentaje sustancial en el contexto de la producción ganadera nacional, con un censo de unos 17 millones de cabezas. En nuestra provincia el censo ovino es importante (500.000 cabezas), siendo mayoritaria la raza Churra, que por otra parte es una raza de gran rusticidad, mal estudiada filogénicamente y en vías de selección, lo que la hace muy adecuada para este tipo de investigaciones inmunogenéticas.

Una vez superadas nuestras mayores dificultades y establecidos los primeros contactos con investigadores de la talla de Podliachouk y Nguyen, pudimos plantear los experimentos con arreglo a nuestras posibilidades.

El planteamiento general de esta primera sección de nuestra Tesis Doctoral es a grandes rasgos el siguiente:

1.º.—Disponer de un número suficiente de ovejas con grupos sanguíneos conocidos, hecho amablemente facilitado por el Dr. Nguyen quien examinó 99 de nuestras ovejas con las que pudimos dar comienzo a nuestras investigaciones.

2.º.—Estudiar los resultados obtenidos por el Dr. Nguyen con vista a plantear las experiencias correspondientes.

3.º.—Realizar las inmunizaciones destinadas a la obtención de sueros inmunes a partir de los cuales obtener los diferentes reactivos.

4.º.—Realizar las pruebas correspondientes con los sueros inmunes obtenidos con el fin de obtener los reactivos monoespecíficos básicos para nuestro trabajo.

5.º.—Realizar la contrastación de los reactivos obtenidos por nosotros, con las ovejas examinadas en Francia, para confirmar la validez de los mismos.

II. MATERIAL Y METODOS.

II.1. Definiciones.

Grupo sanguíneo.—Es aquella característica de la sangre que puede evidenciarse por reacciones inmunológicas de tipo antígeno eritrocitario-anticuerpo sérico, o dicho de otro modo, el conjunto de factores antigénicos-fenogrupos que posee un individuo.

Factor antigénico.—Es la fracción de antígeno eritrocitario que da lugar a la formación de los diferentes anticuerpos específicos.

Reactivo.—Es un antisuero o suero inmune que ya no es fraccionable por absorción. Sólo contiene un tipo de anticuerpo. A cada antígeno corresponde un factor antigénico eritrocitario determinado.

Suero inmune.—Es aquel suero portador de anticuerpos obtenidos por inmunización de un receptor, con antígenos eritrocitarios de un donante. A partir de esto, mediante absorción, se obtiene el reactivo.

Absorción.—Recibe este nombre el proceso por el cual un anticuerpo se elimina de un suero inmune, absorbiéndolo con eritrocitos portadores del antígeno apropiado.

Prueba de potencia.—Es una reacción de hemólisis en la cual el reactivo se diluye siguiendo una progresión geométrica de razón 1/2, para averiguar cuál es la dilución a la cual el reactivo se comporta mejor. Nosotros hemos utilizado esta misma reacción para comprobar el resultado de las inmunizaciones, a la vez que hallábamos la dilución apropiada del suero. Mediante esta reacción se comprueba el título idóneo al que se debe utilizar un reactivo.

Título.—Para nosotros es la dilución anterior a la más elevada que causa todavía una hemólisis completa con el factor antigénico correspondiente. Para el suero inmune el título se obtiene del total de pruebas realizadas.

Fenogrupos.—Es un conjunto de factores gobernados por un gen. Se le denomina también alelo.

II.2. Reacción de hemólisis.

Es la reacción básica para la identificación de los antígenos eritrocitarios. Se basa en la lisis que produce el complemento (de cobaya o de conejo) a glóbulos rojos que han sido sensibilizados previamente por anticuerpos específicos.

II.2.a. Material de laboratorio.

Pipetas Pasteur.—Para la distribución de reactivos, hematíes y complemento hemos utilizado pipetas Pasteur especiales que expenden gotas de 0,025 ml., con objeto de mantener constantes las proporciones de la reacción.

Pipetas calibradas.—Para la dilución de los hematíes hemos utilizado

pipetas calibradas de 0,2 ml. especiales para sangre, de boca ancha para prevenir la destrucción de los hematíes. Para los demás trabajos de medidas de líquidos hemos utilizado pipetas calibradas de distinta capacidad.

Tubos de hemólisis.—Hemos utilizado como recipientes para la reacción tubos de hemólisis reforzados, con el fondo semi esférico, rechazando todos aquéllos que presentaban el fondo plano, con objeto de homogeneizar la forma que toma el depósito de hematíes en el fondo del tubo, en las reacciones negativas o parcialmente positivas.

Centrífuga.—En todos nuestros trabajos de centrifugado hemos utilizado una centrífuga marca Heraeus-Christ modelo Junior III, con sistema adaptador a varios cabezales.

Hemos utilizado un recipiente de nuestra fabricación, completamente cerrado y con departamentos para contener agua destilada con objeto de mantener la humedad del recipiente constante e impedir la desecación de los tubos durante el período de duración de la reacción.

Solución salina.—Siempre que hemos empleado solución salina la hemos preparado de la misma forma, mediante dilución al 0,9 % de cloruro sódico en agua destilada, estandarizado a pH de 6,8 a 7,2 mediante regulación con hidróxido sódico.

II.2.b. Preparación del test.

Lavado de hematíes.—Este proceso se realiza de forma diferente según el destino de los hematíes lavados. Si se van a utilizar para la inmunización, se realizan cuatro centrifugaciones, si se destinan a realizar la reacción de hemólisis puede suprimirse alguna centrifugación.

En general el proceso es el siguiente: Una vez las muestras de sangre citratada en el laboratorio, se procede a una primera centrifugación de 5 minutos a 3.000 r.p.m. para eliminar el plasma y el anticoagulante. Una vez eliminado este sobrenadante se añade solución salina aproximadamente en la misma cantidad que se ha eliminado de plasma, cuando se trata de inmunización y en mayor cantidad cuando se trata de efectuar la reacción de hemólisis. Después de añadida la solución salina, se agita suavemente, para homogeneizar sin provocar hemólisis y se centrifuga de nuevo, realizando esta operación cuantas veces sea necesario para que el líquido sobrenadante quede limpio y transparente, momento en el cual los hematíes se consideran suficientemente lavados. Generalmente son suficientes tres lavados para hematíes destinados a inmunización y dos para hematíes destinados a la reacción de hemólisis. En este último caso se requieren menos lavados, por añadirse mucha mayor cantidad de solución salina en cada lavado, lo que permite acelerar el proceso. Durante el lavado se eliminan, además del plasma, las capas de leucocitos y plaquetas que quedan entre hematíes y plasma formando una zona blanque-

cina. La eliminación se ha efectuado mediante aspiración con pipeta conectada a una trompa de agua.

Dilución de los hematíes.—Esta operación se realiza una vez finalizado el lavado y nosotros la hemos efectuado siempre mediante pipeta graduada, usándola con sumo cuidado para no provocar hemólisis en los hematíes. En laboratorios especializados cuentan con un dosificador diluidor sumamente práctico, que evita los peligros y trabajos de pipetear muestra tras muestra. La dilución se realiza al 2 % en solución salina.

Dilución del reactivo.—Debe realizarse la dilución del reactivo a emplear, si es que no lo tenemos diluido previamente. Si el reactivo procede de la absorción y se va a realizar la reacción de hemólisis subsiguiente ya lo tenemos diluido al 1: 4 y nosotros no hemos realizado más diluciones. Si se realiza prueba de potencia se precisan diluciones sucesivas según se describe más adelante y, si se trata de una determinación ordinaria de grupos sanguíneos, se realiza la dilución que indique el título de potencia del reactivo en cuestión.

Preparación del complemento.—En todas nuestras reacciones hemos empleado complemento absorbido de conejo. El suero de conejo lo hemos obtenido de animales procedentes del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de León, de raza «Gigante Castellano», recogiendo la sangre directamente del corazón en las condiciones de asepsia exigidas.

Una vez recogida la sangre —en ausencia de anticoagulante puesto que lo que se quiere obtener es suero— se deja en reposo durante dos a dos y media horas para que de comienzo a la retracción del coágulo, centrifugando después a 3.000 r.p.m. durante un tiempo que depende del volumen del recipiente utilizado. Este suero se mezcla en proporción 1: 1 con hematíes lavados procedentes del mayor número posible de ovejas. Nosotros hemos utilizado al menos 12 ovejas para esta operación. Después de una leve agitación, para homogeneizar el conjunto, se deja en reposo durante media hora, al cabo de la cual se procede a una nueva centrifugación. Esta debe ser lo suficientemente prolongada como para depositar todos los glóbulos rojos, de forma que permita obtener el suero sin problemas y no debe ser tan intensa que produzca hemólisis. Una vez obtenido el suero se repite la operación de absorción de la misma forma. Terminada esta segunda absorción y tras una nueva centrifugación se considera que la absorción es completa y por tanto puede utilizarse como complemento.

Identificación de los tubos.—Con anterioridad a la realización de la reacción de hemólisis y con objeto de evitar los posibles errores, numeramos todas las gravillas de arriba a abajo y de izquierda a derecha, colocando en las filas las diluciones de hematíes y en las columnas los reactivos o las diluciones del reactivo según los casos. A su vez y como dispositivo de seguridad numeramos todos los tubos de izquierda a derecha y de arriba a abajo.

11.2.c. Realización del test.

Una vez realizados todos los anteriores trabajos previos, se procede a dar comienzo a la reacción propiamente dicha. Nosotros hemos realizado la reacción en tubos. En gran número de laboratorios utilizan placas que pueden estar adaptadas a las máquinas pipeteadoras automáticas. Si no se poseen estas máquinas, la utilización de placas o tubos es indiferente.

Seguidamente, se reparten en los tubos de hemólisis, con las pipetas Pasteur dos gotas de reactivo, añadiendo a continuación una gota de la dilución de hematíes al 2 %. Posteriormente se agita para homogeneizar el conjunto y poner en contacto el antígeno y el anticuerpo. Después se deja en reposo durante media hora, transcurrida la cual se añade una gota del complemento anteriormente preparado. En determinados laboratorios han venido utilizando como complemento una mezcla al 9 : 1 de suero de conejo y suero de cobaya, sin embargo, y a pesar de que para ciertos reactivos es mejor el complemento de cobaya, actualmente se tiende a utilizar únicamente el complemento de conejo, para evitar variaciones en las reacciones y estandarizar la hemólisis.

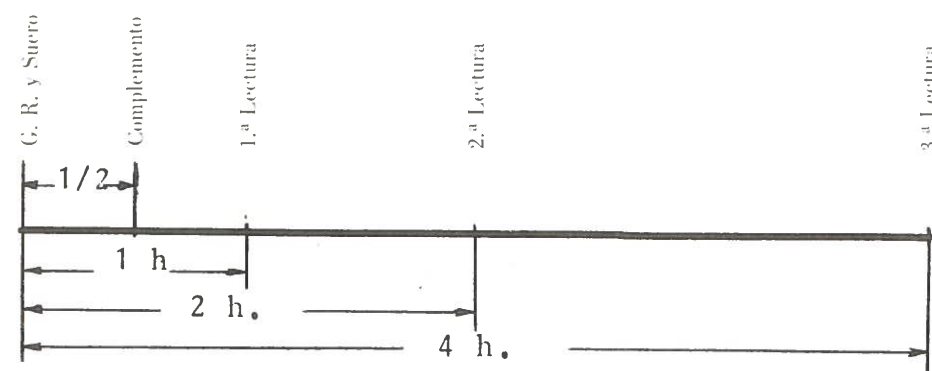
Después de añadir el complemento se agita de nuevo, dejando en reposo a continuación durante otra media hora.

En este punto la técnica presenta ciertas variaciones de unos laboratorios a otros en lo referente a determinación de grupos sanguíneos, no en cuanto a pruebas de potencia y absorción. Algunos laboratorios introducen las placas o tubos en estufas adecuadas que mantienen una humedad y temperatura constante, con lo cual aceleran la reacción al aumentar la temperatura a 30° C. En muchos de estos casos realizan una sola lectura mediante fotografía de las placas, como se hace en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos del I.N.R.A. de Jouy-en-Josas. En otros laboratorios, como el de Grupos Sanguíneos del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, tapan las placas con plástico adherente, con lo que impiden la desecación e introducen las placas en estufa preparada, realizando tres lecturas visuales consecutivas.

La temperatura a la que hemos realizado estas pruebas fue de $20 \pm 2^\circ$ C. Para evitar la evaporación del contenido de los tubos, se introdujeron en un recipiente construido al efecto y cerrado, que contiene placas de Petri con agua destilada, de esta forma mantenemos dentro del recipiente una humedad constante y podemos suplir en cierta forma la estufa.

Después de un reposo de media hora a partir de la adición del complemento, se procede a la primera lectura siguiendo la técnica empleada por nosotros. A continuación se agita de nuevo y se deja reposar los tubos durante una hora, al cabo de la cual se realiza la segunda lectura. Después de esta segunda lectura se dejan los tubos de nuevo en reposo durante dos horas, al término de las cuales se realiza la tercera y última lectura.

El desarrollo cronológico de la reacción de hemólisis se esquematiza a continuación:



11.2.d. Lectura

Durante la realización del test, hemos hablado de tres lecturas que presentan alguna diferencia. En la primera lectura se utiliza un criterio y otro diferente para las dos lecturas posteriores.

Primera lectura:

Únicamente anotamos las reacciones que son negativas y las que presentan positividad en cualquier grado utilizando las siguientes notaciones. El signo - para las reacciones negativas. El signo + para las reacciones que sean claramente positivas o presenten positividad en cualquier grado.

Segunda y tercera lecturas:

Además de las reacciones totalmente negativas o totalmente positivas. Para las reacciones positivas parciales se emplean los signos t, 1, 2 y 3 dejando el signo - para las negativas y la cifra 4 para las totalmente positivas, según se especifica a continuación:

(-) Para las reacciones negativas.

(t) Para aquellas reacciones que presentan coloración ligeramente rojiza, observándose un gran sedimento de hematíes.

(1) Cuando se considera que un porcentaje del 5 al 30 % de los hematíes están hemolizados.

(2) Cuando la hemólisis afecta a un porcentaje de hematíes comprendido entre el 30 y el 60 % de los presentes.

(3) Cuando el porcentaje de hematíes hemolizados supera el 60 % pero no llega al 100 %.

(4) Cuando la hemólisis afecta al total de hematíes presente, sin que se observe sedimento alguno.

Al término de la tercera lectura, consideramos como reacción positiva aquella que, al menos en su tercera lectura, ha sido señalada como hemólisis

de grado 3, considerando, a efectos prácticos, como negativas las hemólisis parciales señaladas con el grado t, 1 y 2.

II.3. *Dinámica en la obtención de reactivos*

II.3.a. *La población problema.*

Una vez conocidos los resultados del análisis sanguíneo de nuestras ovejas, se realizó un estudio cuidadoso para establecer las posibilidades que a la vista de los mismos se ofrecían.

Los resultados estaban referidos a seis de los siete sistemas conocidos hoy en ganado ovino —excepto el sistema X que este laboratorio aún no había conseguido— y a cuatro reactivos aún no clasificados en ninguno de los sistemas conocidos.

En el sistema A figuraban cuatro reactivos, Aa, Ab, 19 y 16, de los cuales el 16 se encontraba únicamente en dos ovejas en una de las cuales la reacción era débil. Por otra parte el reactivo Ab y el 19 aparecían siempre juntos en nuestras ovejas, como ocurría en muchos de los países europeos (1, 2 y 3). Por lo tanto intentamos obtener únicamente el Aa y el Ab.

Respecto al sistema B, figuraban los antígenos Bb, Bc, Bd, 4, Be, Bf, Bg, Bh, Bi, y 3G, no figuraba el Ba porque es un antígeno no encontrado en Europa, es un hallazgo de Rasmusen y sólo él lo ha encontrado hasta el momento. De los anteriores antígenos, el Bg no existía en nuestras ovejas y el 4 sólo en tres de ellas, en dos de las cuales era débil, por lo que decidimos eliminar ambos de nuestras experiencias. Así pues del sistema B podíamos intentar obtener los anticuerpos correspondientes a los antígenos: Bb, Bc, Bd, Be, Bj, Bh, Bi, y 3G. Es preciso tener en cuenta que varios de estos reactivos no son isoimmunohemolisinas, es decir, no proceden de inmunizaciones en ovejas, sino que proceden de reactivos bovinos. De todas formas nosotros pretendemos realizar todas las inmunizaciones posibles.

Por lo que se refiere al sistema C, los antígenos detectados en Jouy-en-Josas eran: Ca, 6, Cb, CL y 32. El CL no apareció nunca en nuestras ovejas y el 32 estaba siempre presente por lo que ambos fueron eliminados de la experiencia. Por su lado el 6 y sobre todo el Cb estaban en proporción muy elevada, lo cual planteaba problemas a la hora de elegir ovejas receptoras adecuadas que no debían poseer estos antígenos, lo cual limitaba en grado sumo el número de animales utilizables. Por lo tanto en este sistema podíamos intentar la obtención del reactivo anti-Ca, aunque ensayamos también el anti-6 y el anti-Cb.

En cuanto al sistema Ma, es muy poco frecuente en nuestras ovejas y además, casi todas dan una reacción débil, por lo que las posibilidades de obtención disminuyen considerablemente.

Los sistemas D y R fueron eliminados de nuestras experiencias ya que el

primero viene determinado por aglutininas en vez de hemolisinas y precisa otro tipo de reacción para ser determinado. Por su parte el sistema R está determinado por anticuerpos naturales obtenidos en ganado bovino y no requiere proceso de inmunización razón por la cual lo eliminamos.

Con relación a los reactivos que figuran como independientes, fuera de los sistemas conocidos, se trata de los reactivos 30, 36, 37 y 38. El 30 estaba presente en todas las ovejas menos en 3, mientras que los otros eran muy poco frecuentes. No pondremos gran interés en su obtención.

II.3.b. *Parejas donante-receptor*

Una vez estudiados los grupos sanguíneos de las ovejas de que disponemos para los experimentos, se requiere un estudio cuidadoso para obtener las parejas donante-receptor más adecuadas.

Como base para este estudio, hemos de tener en cuenta que el receptor debe poseer todos los antígenos para grupos sanguíneos que posea el donante, menos aquéllos cuyos anticuerpos tratamos de obtener, pudiendo poseer además todos aquéllos que le falten al donante. Por su parte los antígenos del donante debe poseerlos el receptor o ser objeto de la obtención.

Para este estudio es preciso tener presente el hecho de que un animal puede inmunizarse a la vez contra dos o tres antígenos, pero la potencia puede ser distinta para cada uno de ellos. Normalmente encontraremos un anticuerpo con mayor potencia que los otros.⁷ Por otra parte, la inmunización será más efectiva si sólo introducimos un antígeno en la oveja receptora.

Teniendo en cuenta estas cuestiones, en nuestras experiencias, hemos procurado introducir —siempre que nos ha sido posible— un solo antígeno al receptor, salvo cuando, debido a la particular constitución sanguínea de donantes y receptores, no hemos podido encontrar la pareja adecuada, en cuyo caso hemos introducido dos y a veces tres antígenos en una sola oveja receptora.

En el cuadro n.º I del anexo incluimos el estudio de las parejas donante-receptor utilizadas en cada una de las tres series de experiencias con el resultado obtenido en cada proceso de inmunización.

II.3.c. *Desarrollo del proceso de inmunización*

Durante los trabajos experimentales realizados, hemos efectuado tres series de experiencias de inmunización que trataremos por separado, ya que existe cierta diferencia en la metodología empleada en cada una de ellas.

Primera serie de experiencias de inmunización.

Comenzamos esta serie de experiencias en enero de 1974, utilizando 25 parejas donante-receptor. De estas parejas, usamos dos para obtener el anticuerpo anti-Aa; dos para el anti-Ca; dos para el anti-Cb; una para el anti-6;

dos para el anti-Ma; dos para el anti-Da (en futuras experiencias eliminamos este factor por tratarse de un anticuerpo detectado por aglutinación): dos para el anti-Bb; dos para el anti-Bc; una para el anti-Bd; una para el anti-Be; dos para el anti-Bf; dos para el anti-Bh; dos para el anti-Bi y dos para el anti-3G.

La técnica empleada en esta primera experiencia de inmunización, fue similar a la utilizada por YCAS,¹⁰ pero empleando 5 ml. de sangre^{6, 8, 9}, en lugar de diez a 15 ml. de sangre citratada como utilizaron estos autores. En definitiva, la gran mayoría de técnicas empleadas son variantes de la seguida por Ferguson y col. en 1942⁴ para el ganado vacuno.

El desarrollo de la técnica fue el siguiente: mediante sangría de las ovejas donantes, por punción en la vena yugular, se extraen 5 ml. de sangre sobre 1 a 1,5 ml. de una disolución de 3,8 gr. de citrato sódico pentahidratado en 100 ml. de agua destilada. La extracción de sangre se realizó siempre cuando las ovejas estaban en ayunas. Trasladadas las muestras de sangre al laboratorio se procedió al lavado de los hematíes, siguiendo el procedimiento generalizado en todos los laboratorios de grupos sanguíneos. Se centrifugan las muestras para eliminar el plasma y el anticoagulante, utilizando la centrífuga a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, así como las capas de color blanco que se encuentran entre plasma y hematíes (plaquetas y leucocitos), mediante trompa de agua, se añade solución salina y se agita suavemente para homogeneizar el conjunto, procurando no imprimir movimientos demasiado bruscos que podrían producir la hemólisis a parte de los hematíes.

Esta operación se repite tres o cuatro veces, hasta que el sobrenadante quede perfectamente limpio y transparente así como incoloro, ya que si presenta color rojizo en cualquier intensidad, es síntoma de que se ha producido hemólisis en cierto grado. En este momento los hematíes perfectamente lavados.

Una vez finalizado el lavado se procede a preparar la muestra para su inyección en las correspondientes ovejas receptoras, para lo cual se añade a los hematíes lavados solución salina estéril, hasta recuperar el volumen original de sangre, es decir, unos 5 ml. Se agita suavemente para homogeneizar la mezcla y acto seguido se procede a la inyección.

Hemos inyectado siempre en la vena yugular, utilizando jeringuillas estériles de un solo uso para impedir la transmisión de gérmenes.

Con anterioridad a cada uno de los procesos de inmunización se han realizado pruebas encaminadas al diagnóstico de parásitos sanguíneos en todas las ovejas donantes utilizadas, previniendo de esta forma el transporte de parásitos de unas ovejas a otras, así como la inclusión en dichas ovejas receptoras de posibles antígenos parasitarios que pudieran bloquear el proceso inmunitario previsto. Las pruebas de diagnóstico fueron realizadas por el doctor don Francisco Rojo Vázquez en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de León, obteniéndose en todos los casos resultados negativos.

El proceso de inoculación sanguínea se realizó durante 8 inyecciones consecutivas a intervalos semanales.

Una semana después de la última inyección, que es el momento en el cual la tasa de anticuerpos sanguíneos presenta su máximo, se obtuvo una muestra de sangre, con objeto de obtener suero. Este suero se utilizó en la prueba de hemólisis con el fin de investigar la existencia de anticuerpos.

Los resultados de esta primera experiencia fueron negativos. Se obtuvo alguna reacción positiva pero a título muy bajo e irregular, lo que inutilizó los resultados.

Al no obtener resultados positivos claros en esta primera experiencia, nos trasladamos a Jouy-en-Josas, aprovechando una Ayuda de la Universidad de Oviedo con cargo a la Fundación «José Fernández», con intención de realizar algunas experiencias y seguir «in situ» los procedimientos utilizados por el doctor Nguyen con sus ovejas, para paliar posibles fallos en el desarrollo de nuestra primera prueba.

Como resultado de esta estancia en Francia, pudimos comprobar que los resultados negativos de nuestra primera prueba no parecían debidos a fallos personales sino a que la técnica utilizada no era absolutamente correcta. Si en vez de finalizarla a las 8 inyecciones, hubiésemos proseguido, posiblemente habríamos obtenido resultados positivos. Sin embargo, y fiados en la bibliografía consultada, habíamos sufrido un error fundamental.

El laboratorio de grupos sanguíneos de Jouy-en-Josas estaba en estos momentos utilizando una técnica diferente con la que estaba obteniendo mejores resultados. Esta técnica debidamente estudiada fue la seguida en nuestra segunda experiencia de inmunización.

Segunda serie de experiencias de inmunización.

En octubre de 1974 iniciamos un segundo estudio de las parejas donante-receptor como ya habíamos realizado en los prolegómenos de la primera experiencia.

En la prueba anterior habíamos adquirido algunas experiencias fundamentales que nos sirvieron de mucho en ésta y en la siguiente experiencia. En principio, el número de animales utilizado durante la primera fue excesivo para nuestras posibilidades, por lo que decidimos utilizar en esta prueba un número menor de animales. Por otra parte, decidimos no comenzar la inmunización de todas las ovejas receptoras a la vez, sino hacerlo escalonadamente, introduciendo tres animales en experiencia cada nuevo día de inmunización, de esta forma logramos que las pruebas de potencia y absorción resultaran escalonadas e iguales en el tiempo, ganando en comodidad y eficacia lo que perdimos en número de animales.

A esta nueva experiencia destinamos 14 parejas donante-receptor con el fin de obtener los reactivos correspondientes a los siguientes antígenos: Aa y 6/Ab/Aa y Bi/Aa y Ca/Ca, Be y Bh/Ca/Cb/Bb/Bd/Be, Ma y 38/Bi/Bh/Bh, 37 y 38/Bi.

Como podemos ver, en esta segunda experiencia incluimos varias inmunizaciones encaminadas a obtener dos o tres reactivos, por varias causas. Primero, porque sólo disponíamos de un número limitado de ovejas, ya que las demás se encontraban incluidas en otros tipos de experiencia y segundo porque pretendíamos averiguar si existía alguna diferencia en los resultados.

La técnica empleada en esta segunda experiencia, variaba de la empleada en la primera en lo siguiente:

1.º La cantidad de sangre utilizada pasó de 5 ml. a 10-13 ml.^{6, 10}. Generalmente obteníamos unos 12 a 14 ml. de sangre de la oveja donante durante la extracción, pero en los procesos de manipulación de los eritrocitos, sobre todo durante el lavado y la manipulación de las jeringuillas de inoculación, se pierde cierta cantidad, razón por la cual obteníamos más de 10 ml., para que deducidas las pérdidas nunca mayores de 2 ml. como pudimos observar, la cantidad mínima a inyectar correspondiera a un volumen de 10 ml. de sangre original.

2.º La periodicidad de las inyecciones varió considerablemente ya que de una inyección semanal pasamos a dos, fijando los días de inyección en martes y viernes de cada semana.

3.º La cantidad total de inyecciones de sangre variaron también. En la primera experiencia, el número de inyecciones lo limitamos a 8 desde el principio mientras que en la experiencia presente, no pusimos límite alguno, pretendiendo darle fin cuando los resultados así lo aconsejaran.

Durante el proceso de esta segunda experiencia realizamos 8 inyecciones consecutivas de hematíes, al término de las cuales se extrajeron unos 10 ml. de sangre en tubo estéril sin anticoagulante, para obtener suero con el que probar si el resultado de la inmunización era positivo. A la vez realizamos pruebas de potencia, para poder observar el aumento que experimentaba el suero y poder así fijar el término más conveniente de la experiencia.

En la primera prueba de potencia realizada se obtuvieron reacciones positivas en 7 de los 14 sueros probados, resultando un título variable entre 1/4 y 1/16 siendo la dilución 1/8 el título más frecuente.

Estos títulos resultan bajos, puesto que en ovejas no se pueden realizar sangrías demasiado fuertes y se precisan cantidades suficientes de suero como para poder realizar el examen de grupos sanguíneos a un número de 3.000 ovejas como mínimo, de acuerdo con las normas de la I.S.A.B.R. (International Society for Animal Blood Group Research), después de utilizar la cantidad precisa para las reacciones de potencia y absorción necesarias.

Teniendo esto en cuenta, continuamos con la inmunización mediante otras seis inyecciones de hematíes lavados.

Al término de estas 6 nuevas inyecciones, procedimos a realizar la segunda prueba de potencia, de la misma forma que realizamos la primera y sin detener, por tanto, el proceso de inmunización.

En esta segunda prueba de hemólisis, obtuvimos resultados positivos en los siete sueros que ya dieron reacción positiva durante la primera prueba y además hallamos otro suero con reacción positiva en esta ocasión y que antes había sido negativo. En total se observó reacción positiva en ocho sueros de los 14 probados.

En esta prueba de potencia, los títulos obtenidos fueron sensiblemente superiores a los obtenidos durante la primera, aumentando todos de potencia. Los títulos oscilaron entre 1/8 y 1/32. Al hablar de cada suero en particular se darán datos más detallados.

Aunque algunos de los títulos alcanzados en esta prueba nos permitían ya la obtención de algunos de los sueros inmunes para utilizarlos como origen de reactivos, preferimos proseguir la experiencia mediante otras seis inyecciones de hematíes lavados, pensando que después de los procesos de manipulación necesarios, el título bajaría un poco. Por otra parte deseábamos saber si los títulos continuaban aumentando y si obteníamos más reacciones positivas.

Finalizadas estas seis nuevas inyecciones realizamos una tercera prueba de potencia en la cual no obtuvimos más reacciones positivas que las ya obtenidas en la prueba anterior.

Los títulos de los ocho sueros obtenidos hasta el momento, variaban de 1/16 a 1/64, pero había indicios de que algunos sueros contenían más de un anticuerpo, encontrándose éstos con potencia diferente, lo cual hacía sospechar que el título del suero en alguno de ellos no tendría demasiada importancia, ya que después de la absorción quedaría únicamente el título del reactivo, que podría ser mayor o igual al del suero. Un ejemplo lo tenemos en el suero n.º 408, en el cual la potencia media del suero inmune fue de 1/16 durante la tercera prueba de potencia y sin embargo el reactivo que originó incluso después de congelación y absorción, presentó un título de 1/64. En esta tercera prueba de potencia se obtuvo alguna reacción positiva a una dilución de 1-256, aunque se trataba de un título no utilizable en la práctica.

En general hubo un aumento de título entre la segunda y tercera pruebas, aunque no tan espectacular como el observado entre la primera y la segunda. Este hecho, unido a la necesidad de realizar una tercera experiencia y el deseo de dejar en descanso a las ovejas, sometidas a «stress» muy continuados, nos decidió a dar por finalizada la segunda experiencia de inmunización con el resultado de 8 sueros inmunes obtenidos de las 14 ovejas receptoras empleadas.

Tercera serie de experiencias de inmunización.—Hemos incluido una nueva experiencia con el propósito de ampliar el número de reactivos obtenidos en la anterior. Esta ampliación la hemos realizado en dos sentidos. Por una parte intentamos obtener algunos reactivos ya obtenidos en la experiencia anterior para comprobar, mediante la contrastación, si su comportamiento es similar. Por otra parte, incluiremos en la inmunización algunos antígenos que aún no

hemos incluido en experiencias anteriores o que incluídos, dieron resultado negativo.

Realizado el estudio de las parejas donante-receptor, previo al proceso de inmunización y referido a las ovejas de que disponíamos en ese momento, comenzamos la tercera experiencia de inmunización.

Incluimos en esta experiencia 16 parejas donante-receptor para obtener los siguientes reactivos: anti-Ab y anti-Ma/anti-Ab y anti-Bd/anti-Bb y anti-16-anti-Bc/anti - Bf/anti-Bh/anti - 3G/anti - Ca/anti - Ma/anti - 30/anti - 37/ anti - 38/anti - 6/anti - Cb.

El protocolo de experimentación utilizado fue similar al de la experiencia anterior, a la vista de los resultados obtenidos.

Hemos de hacer constar que en ninguna de las tres experiencias de inmunización hemos utilizado la ayuda de adyubantes de ningún tipo, procedimiento muy utilizado en procesos de inmunización de ganado vacuno pero que en ovino no ha dado, al parecer, resultados positivos (6 y 7).

La diferencia existente entre la segunda y tercera experiencias se refiere al número total de inyecciones administradas. En esta tercera experiencia las ovejas receptoras recibieron un total de 14 inyecciones, en lugar de las 20 de la experiencia anterior por las siguientes razones: Los títulos obtenidos en la primera prueba de potencia de esta experiencia fueron sensiblemente superiores a los correspondientes de la experiencia anterior. Durante la segunda prueba de potencia se obtuvieron títulos similares a los obtenidos en la experiencia anterior (3.ª prueba de potencia), por lo que unido esto a la imposibilidad de disponer de los animales por más tiempo nos obligó a dar por finalizado el proceso con un número total de 14 inyecciones por oveja receptora. Recordemos que el aumento de potencia experimentado durante la segunda experiencia durante la 14 y la 20 inyección no fue grande y tampoco se obtuvieron más reacciones positivas.

Al término de las primeras 8 inyecciones realizamos la primera prueba de potencia obteniendo resultados positivos en cinco de las dieciséis ovejas utilizadas, variando los títulos entre 1/16 y 1/32 (sensiblemente mejores que los obtenidos en la segunda experiencia).

El proceso de inmunización se continuó con 6 inyecciones más de hematies lavados, al cabo de las cuales se realizó la segunda prueba de potencia.

En esta segunda prueba se obtuvo un resultado un tanto extraño. Por una parte, al igual que en la experiencia anterior, encontramos otro suero inmune nuevo respecto a la primera prueba, es decir, un total de 6 sueros.

En general la potencia aumentó siendo utilizables las diluciones de 1/32 en adelante. Aparte de los sueros citados obtuvimos otros que no pudieron ser utilizados debido a sus relaciones aberrantes. En algún caso irregularidades en la respuesta y en otros por dar reacciones de absorción confusas.

En el cuadro n.º I del anexo presentamos un esquema de las parejas

donante-receptor empleadas en cada una de las tres experiencias, indicando el grupo sanguíneo de cada oveja así como los anticuerpos buscados y el resultado de la inmunización. Los detalles particulares de cada suero obtenido los incluimos más adelante.

II.3.d. *Pruebas de potencia y obtención de sueros*

Las pruebas de potencia se realizaron utilizando como base la reacción de hemólisis, ya que encaminamos nuestras experiencias únicamente a la obtención de isoimmunohemolisinas.

Para realizar las pruebas de potencia empleamos como panel de células los hematíes de las ovejas donantes empleadas en la experiencia correspondiente. Solamente en casos excepcionales ampliamos este grupo de ovejas para dar mayor amplitud a los resultados. Llegamos a esta conclusión después de un estudio detallado de los grupos sanguíneos del conjunto de ovejas donante en el que hallamos varias veces representados cada uno de los antígenos conocidos por nosotros.

De todas formas y como veremos más adelante, en determinados casos —siempre en la tercera prueba de potencia— empleamos alguna oveja más como donante de hematíes, ya que deseábamos realizar un estudio más exhaustivo del suero correspondiente.

Para marcar la dilución que indicara el título del suero nos basamos en una regla generalmente admitida por todos los investigadores en grupos sanguíneos ⁷ y que consiste en aplicar la dilución anterior a la última que da positiva en todos los casos, al menos en la tercera lectura.

De todas formas, hemos de tener en cuenta que en algunas ocasiones se aprecian dos tipos de reacciones positivas, unas a un título determinado y otras a un título menor. En estas ocasiones se sospecha en principio la presencia de dos isoimmunohemolisinas que darán lugar a dos reactivos diferentes, cosa que no ocurre con carácter general. Cada uno de estos dos reactivos presentará una potencia diferente, por lo que el título que demos a un suero inmune presentará poco valor en estos casos, ya que de él obtendremos un reactivo con mayor potencia que la admitida para el suero inmune.

Damos la potencia del suero inmune sólo a título informativo, sin que tenga más utilidad práctica —en muchos casos— que el conocimiento de las posibilidades del suero, ya que el título válido del reactivo a emplear se obtendrá inmediatamente después de la reacción de absorción, si esta fuese necesaria.

En el caso de tratarse de un suero monoespecífico —en cuyo caso no se precisa reacción de absorción— el título dado como válido para el suero inmune es el mismo que se le da al reactivo obtenido de este suero, ya que éste pasa directamente a reactivo sin mediar ningún tipo de manipulación que pueda afectar a la potencia ya determinada.

Para realizar las pruebas de potencia utilizamos diluciones correlativas según una progresión geométrica de razón 1/2, de esta forma, utilizamos el suero íntegro -o dilución 1- y después las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, etc., hasta un término final razonable, dado por la marcha de los títulos en las distintas pruebas.

En las pruebas finales, en las cuales la potencia del suero era elevada, se eliminaron las diluciones 1 y 1/2 para evitar el efecto de dosis, que no obstante se apreció a veces en la dilución 1/4. Este efecto neutraliza en cierta medida la reacción de hemólisis, de tal forma que no llega a hemólisis total.

Los hematíes utilizados en las pruebas de potencia fueron lavados al menos tres veces, como se realiza durante los procesos de inmunización y eliminamos los tubos que por una u otra causa presentaban indicios de hemólisis.

La sangría final se realizó mediante punción en la vena yugular, sobre tubos de centrifuga estériles y cuidando al máximo las condiciones de higiene. La cantidad de sangre a obtener osciló entre 200 y 250 c.c. por animal dependiendo del tamaño de la oveja.

La sangre así obtenida se deja reposar durante 2,5 a 3 horas hasta que se aprecia claramente una retracción del coágulo. Acto seguido, se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos. A continuación se recoge el suero sobrenadante y se congela inmediatamente.

II.3.e. Pruebas de absorción

La prueba de absorción es de gran importancia y sumamente delicada. Mediante ella se obtiene la información necesaria para saber si un suero inmune contiene una o más isoimmunohemolisinas específicas de grupos sanguíneos. Es muy delicada porque requiere mucha manipulación de hematíes con riesgo de producir hemólisis.

La técnica utilizada por nosotros es la corrientemente empleada en trabajos sobre grupos sanguíneos ovinos (5, 7). Conocido el suero a absorber y los hematíes necesarios, se procede como explicamos a continuación.

Se recogen hematíes suficientes (en volumen aproximado a tres veces el volumen de suero destinado a la absorción) y se lavan cuidadosamente durante tres o cuatro veces siguiendo la técnica descrita anteriormente.

Una vez eliminado el sobrenadante del último lavado, tenemos listos los hematíes para la absorción. Entonces se realiza una dilución a 1/2 del suero objeto de la absorción y se mezclan los hematíes con el suero diluido en proporción 1/1 (v/v), se agita suavemente hasta que los hematíes queden

homogéneamente distribuidos en el suero, procurando no provocar hemólisis y se deja reposar, a la temperatura del laboratorio, durante 30 minutos.

Pasado este tiempo, se centrifuga y se decanta el sobrenadante, que será el suero absorbido. Una vez obtenido este suero se realiza una nueva dilución en solución salina al 1/2 con lo que el suero original se encuentra diluido al 1/4. A continuación se añaden hematíes (1 : 1) y se agita de nuevo para homogeneizar el conjunto; se deja en reposo durante 30 minutos, al cabo de los cuales se procede a la centrifugación definitiva en la que obtendremos el suero totalmente absorbido.

En nuestra prueba de absorción hemos utilizado para cada suero inmune, los hematíes de todas las ovejas que dieron reacción positiva con el suero original. De esta forma obtenemos sueros absorbidos por diferentes hematíes. Con estos sueros absorbidos procedemos a continuación a realizar un test de hemólisis en el que intervienen todos los sueros absorbidos -como anticuerpo- y todos los glóbulos rojos empleados para la absorción -como antígeno-. Incluimos en el test, además, suero inmune sin absorber y solución salina con complemento, para que actúen de testigos y controles.

Caso de que un suero contenga un solo anticuerpo, las reacciones de hemólisis serán siempre negativas tras la absorción y positivas con el suero sin absorber.

Si el suero inmune contiene dos o más anticuerpos el test de hemólisis presentará reacciones positivas y negativas según qué tipo o tipos de antígenos posean los glóbulos rojos y qué anticuerpo permanezca en el suero absorbido después de la absorción.

Como ejemplo tomaremos la absorción del suero n.º 463 que contiene dos anticuerpos diferentes, anti-Aa y anti-Bh. Este suero da reacción positiva con los hematíes procedentes de las ovejas 201, 206, 239, 256 y 447 de las cuales la 201 y la 206 contienen únicamente el antígeno Aa, la 256 y la 447 contienen únicamente el antígeno Bh y la 239 contiene ambos antígenos.

Al realizar la absorción del suero por los 5 tipos de hematíes los resultados serán diferentes, dependiendo de cuál sea el antígeno o antígenos que posean los hematíes. Los hematíes 201 y 206 eliminarán del suero inmune el anticuerpo anti-Aa, pero no el anti-Bh, por lo que el suero absorbido por estos hematíes contendrá el reactivo anti-Bh. Los hematíes 256 y 447, eliminarán del suero inmune el anticuerpo anti-Bh y por lo tanto el suero absorbido por ella contendrá el anticuerpo anti-Aa. Por último el suero inmune absorbido por los hematíes de la oveja 239, no contendrá ninguno de los anticuerpos ya que elimina los dos.

Al llevar hematíes y sueros absorbidos a un test de hemólisis obtendremos el siguiente resultado:

	201	206	239	256	447
Suero abs. por 201	-	-	+	+	+
Suero abs. por 206	-	-	+	+	+
Suero abs. por 239	-	-	-	-	-
Suero abs. por 256	+	+	+	-	-
Suero abs. por 447	+	+	+	-	-
Suero sin abs.	+	+	+	+	+
Solución salina	-	-	-	-	-

Como podemos deducir de este ejemplo, de un suero inmune podemos obtener dos reactivos diferentes. Uno mediante absorción con cualquiera de los hematíes 201 ó 206, que daría lugar al reactivo anti-Bh y el otro por absorción con cualquiera de los hematíes 256 ó 447, con cuya absorción obtendríamos el reactivo anti-Aa.

Los resultados obtenidos por nosotros en las diferentes pruebas de absorción, los incluimos en las fichas de cada uno de los sueros inmunes hallados.

II.3.f. Titulación de los reactivos

Una vez estudiados los resultados de las pruebas de absorción y localizados los reactivos a obtener, se procede a titular definitivamente cada uno de los reactivos.

Naturalmente esta titulación definitiva debe realizarse con el suero ya absorbido y considerado como monoespecífico. El resultado de esta prueba se anota en la ficha correspondiente de cada suero y será el título de utilización del reactivo a todos los efectos.

La titulación se realiza de la misma forma que hemos efectuado las diferentes pruebas de potencia.

II.3.g. Contrastación de los reactivos.

Una vez obtenidos los reactivos, procedimos a realizar una prueba de los mismos o contrastación, para asegurarnos definitivamente de que los nombres dados a cada reactivo son los verdaderos.

Para esta prueba utilizamos las ovejas supervivientes de las 99 cuyas muestras de sangre fueron estudiadas por el doctor Nguyen en el Laboratorio de Genética Bioquímica de Jouy-en-Josas, para comprobar si nuestros reactivos daban las mismas reacciones que las indicadas por este laboratorio.

De esta forma hemos controlado 12 de los reactivos obtenidos y ya designados por nosotros. Pudimos comprobar que los resultados eran exactos a los obtenidos por el doctor Nguyen para todos los sueros contrastados. Estos

reactivos fueron: 3 anti-Ab, 3 anti-Ca, 2 anti-Aa, 1 anti-Bb, 1 anti-Bf, 1 anti-Be y 1 anti-Bh, todos los cuales han sido utilizados en las determinaciones subsiguientes.

De todas formas observamos una ligera diferencia entre los reactivos anti-Ca y anti-Ab observando que uno de cada tipo presentaba reacciones más débiles que los otros dos en varias ocasiones, pero dentro de la denominación de hemólisis en grado 3 que consideramos positiva.

El cuadro correspondiente a la contrastación se incluye en el anexo (cuadro n.º III).

II.3.h. Conservación de los reactivos

Los sueros inmunes así como los reactivos han sido conservados en arcón de congelación a una temperatura controlada de -16 a -18°C, envasados en pequeños frascos de 15 c.c. cada uno, para evitar el efecto de superficie en los procesos de congelación y descongelación.

Se ha procurado que los sueros permanecieran el menor tiempo posible sin congelar y no hemos realizado recongelaciones, de tal forma que los sueros sobrantes de cada test de hemólisis se han eliminado.

Por lo tanto los sueros han sido sometidos únicamente a dos congelaciones: una inmediatamente después de ser obtenidos como suero inmune y otra inmediatamente después de ser absorbidos, pasando a reactivo.

El complemento de conejo solamente sufre una congelación, ya que la obtención y la absorción se realizan una a continuación de la otra. Bajo ningún concepto hemos utilizado nunca complemento recongelado, siendo siempre eliminado el sobrante de cada test de hemólisis.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Como hemos visto en el capítulo de material y métodos, hemos utilizado dos técnicas diferentes de inmunización con resultados distintos. La utilizada durante la primera experiencia (5 ml. × semana) dio resultados totalmente negativos y la utilizada en las dos experiencias posteriores (2 × 10 ml. × semana) que arrojó resultados positivos en un porcentaje cercano al 50 %.

En cuanto a este tipo de metodología, apenas hemos encontrado referencias bibliográficas referentes al ganado lanar, posiblemente debido al hecho de que para esta especie se han utilizado modificaciones de las técnicas empleadas en el ganado bovino y estas modificaciones no han sido referidas.

A la vista de nuestras experiencias, los antígenos eritrocitarios ovinos parecen poseer un bajo poder inmunitario, por lo que se requieren inyecciones muy frecuentes de eritrocitos y en una cantidad superior al equivalente a 5 ml. de sangre del donante para encontrar una respuesta inmunitaria satisfactoria entre las 8 y las 14 inyecciones.

Posiblemente una técnica intermedia basada en la inyección semanal de los eritrocitos de 10 ml. de sangre llegase a dar respuesta positiva, pero indudablemente el proceso se alargaría más que con la segunda de las técnicas utilizadas, retrasándose la obtención de resultados.

Hemos de tener en cuenta que a veces no interesa aumentar el título de un suero inmune considerado monoespecífico, si al aumentar el título para el anticuerpo presente, aparece algún otro anticuerpo. Al finalizar la inmunización tendremos un suero inmune portador de más de un anticuerpo con lo que se requerirá una previa absorción para obtener los reactivos monoespecíficos, con la consiguiente pérdida de su suero inmune y el trabajo extra que esto supone.

Como ejemplo de lo anteriormente expuesto podemos presentar nuestro suero inmune n.º 408 (ficha de inmunización número 28). Si este suero se hubiera obtenido después de 14 inyecciones, habríamos obtenido un suero monoespecífico sin necesidad de absorción, pero al continuar inmunizando, al cabo de 20 inyecciones apareció como multiespecífico y fue necesario el empleo de la absorción para obtener un reactivo monoespecífico.

En diferentes sueros inmunes hemos podido observar cómo la absorción lleva consigo la pérdida total de algunos de los anticuerpos presentes en el suero inmune. Este efecto lo hemos encontrado en todos los casos salvo en uno en que pudimos obtener dos reactivos por absorción. Este efecto es corriente en este tipo de trabajos.

Como resultado de nuestras experiencias de inmunización hemos obtenido los siguientes reactivos:

2 anti-Aa, 3 anti-Ab, 1 anti-Bb, 1 anti-Be, 1 anti-Bf, 1 anti-Bh y 3 anti-Ca.

Este número está justificado, a nuestro juicio, por las siguientes razones. En primer lugar la peculiar constitución inmunogenética de nuestras ovejas que imposibilitaba la obtención de algunos reactivos. En segundo lugar porque, como ya hemos referido anteriormente, algunos de los reactivos utilizados para determinación de grupos sanguíneos ovinos proceden del ganado vacuno y no pueden obtenerse por isoimmunizaciones ovinas.

Es posible que habiendo utilizado un número mayor de animales y trabajando con rebaños de distinta localización y estructura genética hubiésemos conseguido ampliar la gama de reactivos obtenidos. Pero ello, en todo caso, habría de ser objeto de estudios posteriores.

A continuación incluimos un cuadro con la explicación de la identificación utilizada para cada reactivo y la denominación que le hemos adjudicado como resultado de las pruebas realizadas con él.

Identificación y denominación de los reactivos

N.º Don.	N.º Rec.	N.º Abs.	Fecha Obtención	IDENTIFICACION	DENOMINACION
421	269	-	14-I-75	(421 / 269-14-I-75)	Anti-Aa n.º 1
256	463	462	4-III-75	(256 / 463-462-4-III-75)	Anti-Aa n.º 2
202	233	-	7-I-75	(202 / 233-7-I-75)	Anti-Ab n.º 1
444	219	-	4-III-75	(444 / 219-4-III-75)	Anti-Ab n.º 2
447	470	-	4-III-75	(447 / 470-4-III-75)	Anti-Ab n.º 3
462	455	-	4-III-75	(462 / 455-4-III-75)	Anti-Bb
2	408	239	3-I-75	(2 / 408-239-3-I-75)	Anti-Be
206	230	-	4-III-75	(206 / 230-4-III-75)	Anti-Bf
256	463	201	4-III-75	(256 / 463-201-4-III-75)	Anti-Bh
470	412	256	17-I-75	(470 / 412-256-17-I-75)	Anti-Ca n.º 2
206	402	-	6-I-75	(206 / 402-3-I-75)	Anti-Ca n.º 1
475	474	2	17-I-75	(475 / 474-2-17-I-75)	Anti-Ca n.º 3

Sección 2.^a

APLICACION DE LOS GRUPOS SANGUINEOS Y LOS POLIMORFISMOS BIOQUIMICOS AL ESTUDIO INMUNOGENETICO DE LA OVEJA CHURRA

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una vez obtenidos algunos de los más importantes reactivos serológicos para la identificación de fenogrupos sanguíneos en el ganado ovino, que ha sido el objeto de la primera sección de nuestra Tesis, hemos llevado a cabo un segundo grupo de pruebas destinadas a obtener una primera apreciación sobre el espectro serológico de una agrupación de raza «Churra» de Tierra de Campos.

Con el fin de obtener una visión más completa, aunque inicial, del cuadro inmunogenético de esta importante raza española, hemos incluido el estudio de los más importantes y mejor conocidos Polimorfismos Bioquímicos. Entre ellos incluimos Hemoglobinas, Albuminas y Transferrinas, haciendo uso de la experiencia adquirida por el equipo de trabajo del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y siguiendo las técnicas puestas a punto y ampliamente contrastadas en ganado equino, vacuno, caprino y lanar.

Queremos destacar en este momento que nuestro objetivo no ha sido realizar un estudio completo y detallado del cuadro inmunogenético de la oveja «Churra» puesto que esto implica una serie de trabajos previos para identificar los distintos ecotipos, así como un tiempo y unos medios que se salen fuera del campo propio de una Tesis Doctoral.

II. MATERIAL Y METODOS

II.1. *Material animal*

Los animales que hemos utilizado para esta 2.^a Sección de nuestra Tesis pertenecen a la raza Churra de ordeño y corresponden a un rebaño particular de la Provincia de Valladolid, perteneciente al Municipio de Sardón de Duero.

Estos animales están inscritos en el Libro Genealógico de la raza y presentan todos los caracteres morfológicos exigidos para la misma. En la toma de muestras se han elegido animales hembras pertenecientes a dos generaciones así como los sementales existentes en ese momento. Como veremos en el cuadro de genealogías, uno de los sementales no se encontraba en la explotación en el momento de la recogida de muestras, por lo que no poseemos datos sobre el mismo.

Los animales se explotan en régimen de semiestabulación y se realizan montas controladas para conocer los progenitores de cada animal. A su vez se llevan controles individuales de producción.

II.2. *Material de laboratorio*

En cuanto a la determinación de grupos sanguíneos el material utilizado ha sido el mismo expuesto en la Primera Sección.

Respecto a la determinación de los polimorfismos bioquímicos el equipo básico para la electrofóresis consta de:

Fuente de alimentación.—La fuente de alimentación utilizada ha sido el modelo 20 de la Casa Elvi. Opera con una fuerza de 200 V y suministra una corriente de un amperaje comprendido entre 0 y 400 miliamperios, a un voltaje de hasta 500 V. Una escala de conmutación y un potenciómetro permiten ajustar la corriente deseada, teniendo además capacidad para alimentar a la vez cuatro cubetas electroforéticas. El voltímetro incorporado permite medir la diferencia de potencial existente entre los extremos del gel. La conexión a las cámaras se hace mediante unos terminales no reversibles.

Cubetas electroforéticas.—Son de doble compartimento, cuya finalidad es evitar los cambios de pH de las soluciones en contacto con el gel, de tal forma que éstos sólo se produzcan en los compartimentos en los que se encuentran los electrodos. Cada compartimento de las cubetas electroforéticas contiene 500 ml. de solución tampón. En el momento del corrido se hace comunicar entre sí los dos compartimentos de las cubetas mediante tela absorbente. El gel se comunica con las cubetas electroforéticas mediante tiras de papel Watman n.º 3 por superposición de éste sobre el gel.

II.3. *Extracción y preparación de las muestras*

Hemos recogido muestras de sangre al rebaño anteriormente citado sobre 200 de sus ovejas. A cada animal se le recogieron tres muestras independientes de sangre, dos para la determinación de polimorfismos bioquímicos —una con y otra sin anticoagulante— y otra para la determinación de grupos sanguíneos.

La muestra destinada a la determinación de grupos sanguíneos se recogió sobre una disolución de citrato sódico al 3,8 % e inmediatamente se trasladó a León y se introdujo en el refrigerador en espera de su utilización al día siguiente.

Las muestras destinadas a la determinación de polimorfismos fueron diferentes, una se recogió de la misma forma que la utilizada para grupos sanguíneos y la otra sin anticoagulante para utilización del suero. Ambas muestras se trasladaron inmediatamente después de la recogida a Zaragoza.

II.4. *Determinación de grupos sanguíneos*

Para esta determinación se han utilizado el material y los métodos ya explicados en la Sección Primera. Nos hemos basado únicamente en la reacción de hemólisis.

II.5. *Determinación de polimorfismos bioquímicos*

Para la determinación de los polimorfismos: hemoglobinas, transferrinas y albúminas, es necesario previamente fabricar el gel a utilizar. Este proceso requiere dos etapas: Preparación del molde y fabricación propia del gel. La preparación del molde es general para los tres polimorfismos mientras que la fabricación del gel es particular para cada uno de ellos. Por esta razón esta última etapa la incluiremos al hablar de cada polimorfismo en especial.

El material necesario para la preparación del molde es el siguiente:

Vidrios rectangulares de 30 × 20 × 0,6 cm.

Varillas Perspex de 22 × 2 × 0,6 cm.

El vidrio debe ser de la suficiente calidad para que al verter el almidón caliente sobre él no se rompa o resquebraje. De la misma forma, las varillas son de Perspex para evitar que se doblen por calentamiento.

Con el vidrio y las varillas se forma un molde de 22 cm. de longitud por 14 cm. de anchura por 0,6 cm. de profundidad, de la siguiente forma:

Se aplica en las varillas silicona por una de sus caras extendiéndola de manera que se forme una fina película y se pueda adherir sobre el vidrio sin que se forme ninguna fisura por la que se pueda escapar el gel. Para una mayor fijación se colocan las pinzas en las juntas para impedir que las varillas se desplacen.

Una vez el molde dispuesto se limpia perfectamente de la silicona sobrante que se haya desbordado por el molde.

II.5.a. Hemoglobinas

Una vez preparado el molde para la fabricación del gel se vierten en el mismo de 30 a 33 gr. de almidón hidrolizado en un recipiente de un litro. La cantidad precisa a utilizar varía con la calidad del almidón empleado. Por esta razón, cuando se utiliza un lote desconocido de almidón es preciso calcular la cantidad óptima a utilizar en el gel, cálculo que se realiza fabricando geles con distinta concentración, hasta conseguir el que presente la consistencia y porosidad adecuada a la determinación electroforética que pretendemos realizar.

A continuación se diluyen 75 ml. de la solución tampón de Smithius hasta 250 ml. con agua destilada. La solución tampón de Smithius es la siguiente:

Tris (hidroximetil)-aminometano	20,20 gr.
Acido etilendiaminotetracético	2,00 gr.
Acido bórico cristalizado	1,50 gr.
Agua destilada	1.000,00 ml.

Se ajusta la solución tampón a un pH igual a 8,7.

Seguidamente, se vierten los 250 ml. de la solución tampón diluida en el recipiente que contiene el hidrolizado de almidón, agitando energicamente a fin de que todo el almidón quede suspendido en el tampón, detalle que puede comprobarse cuando no existe ninguna partícula seca de almidón.

A continuación se lleva el recipiente a la llama de un mechero ajustado al máximo agitando continuamente para que el calor de la llama llegue uniformemente a todas las partes del fondo del recipiente.

Al principio la viscosidad de la mezcla es baja y el agitado es fácil, pero a medida que aumenta la temperatura de la suspensión, ésta se torna más opaca y viscosa, para pasar, al continuar el calentamiento, a un estado semitransparente y líquido como al principio. Cuando se llega a este punto, en el cual además comienzan a aparecer burbujas en el fondo del recipiente, se retira éste de la llama y se conecta a una bomba de vacío para impedir la formación de burbujas que interrumpirían el paso de corriente por esos puntos. El vacío se realiza durante un tiempo de unos 20 segundos, desconectando cuidadosamente para evitar que por los efectos de la depresión el gel tome aire de nuevo. Finalmente se vierte el gel en el molde.

Una vez vertido todo el gel, se cubre el molde con un vidrio, evitando la formación de burbujas entre gel y vidrio, colocando encima unas pesas de 500 gr., para que el gel se adapte perfectamente al molde y el exceso vaya saliendo poco a poco.

El gel así fabricado se deja solidificar durante 3 a 4 horas si se hace en frigorífico a 4° C o entre 18 y 24 horas si se hace a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra.—Para preparar la muestra a utilizar en el corrido electroforético se deposita 1 ml. de sangre heparinizada en un tubo de ensayo de 7 ml. y se termina de llenar con solución salina.

Se agita bien, por inversión del tubo 3 ó 4 veces, para homogeneizar o mezclar perfectamente sangre y solución salina y se centrifuga a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos. A continuación se separa el plasma y la solución salina por decantación. Se repite el mismo proceso dos veces más. Después se añaden 4,5 ml. de agua destilada y se agita fuertemente para facilitar la hemólisis.

Una vez producida la hemólisis se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el material del extremo. Este queda depositado en el fondo del tubo y por decantación se recoge el sobrenadante que se lleva al refrigerador hasta su utilización.

Colocación de las muestras.—Para colocar las muestras es preciso preparar en el gel 3 incisiones paralelas al borde menor, quedando el gel dividido en tres porciones de 5 cm. y una de 7. Las muestras se colocan en las líneas de división de la siguiente forma:

En los tubos que contienen las muestras se introducen unos cuadraditos de papel Whatman n.º 3 de 0,6 × 0,6 cm. ya preparados de antemano, para que se empapen de la muestra. Se extraen y el exceso de muestra se elimina por presión entre dos papeles corrientes de filtro. Una vez hecho esto se recogen cuidadosamente con unas pinzas y se introducen en las tres líneas de división del gel. El número de muestras que se introduce por línea es de 12 pero reservando dos espacios de cada línea para la colocación de muestras patrón. De esta forma tenemos una capacidad de corrido de 30 muestras por placa.

A continuación se unen las distintas porciones del gel de tal forma que se encuentren en íntimo contacto las hendiduras efectuadas anteriormente y no exista solución de continuidad al paso de la corriente eléctrica, lo que ocasionaría imperfecciones en el corrido.

Una vez dispuesto el gel se cubre con papel celofán para evitar evaporaciones durante el corrido.

Corrido electroforético.—Preparado el gel, se une a las cubetas electroforéticas que son conectadas a la fuente de alimentación, estabilizando el voltaje a 400 voltios durante 2 minutos y medio. Pasado este tiempo se desconecta la corriente y se extraen los cuadraditos de papel Whatman con la muestra de hemoglobina, uniendo de nuevo las cuatro porciones del gel. Para evitar que las distintas secciones del gel queden completamente unidas y no se puedan separar durante el tiempo de corrido se coloca entre el gel y el molde una varilla de la misma profundidad que el molde y de 3 cm. de grosor.

Una vez dispuesto de nuevo el gel se vuelve a cubrir con el papel celofán, conectando la fuente de alimentación y estabilizándola a 400 V., durante un tiempo de 2 horas.

Corte y teñido del gel.—Una vez finalizado el tiempo electroforético de 2 horas, se procede directamente a la lectura sin necesidad de tinción debido a su propio color. Sin embargo, para obtener una mayor resolución en la lectura, puede realizarse el corte y teñido del gel.

Para esto se despega el molde de las varillas que lo constituyen, quedando el gel sobre el vidrio que hace de base. En los lados de mayor longitud (22 cm.) se colocan unas varillas cuyo espesor es la mitad del molde y con un hilo de nylon, sirviendo las varillas de guía, se corta el gel en dos porciones. A continuación se separan estas dos mitades, obteniendo de esta forma dos medios geles de los cuales el inferior se utiliza en el proceso de tinción y el otro se mantiene en reserva hasta la lectura final, con el fin de poder utilizarlo en caso de deterioro del primero.

Se tiñe la mitad inferior del gel añadiendo con un cuentagotas una solución que contiene: agua destilada, alcohol metílico y ácido acético glacial en la proporción de 5 : 5 : 1, saturado a su vez por el colorante amido-black. Transcurrido el tiempo de teñido que es de un minuto, se lava el gel con agua corriente para eliminar el exceso de tinte y a continuación se introduce en una bandeja que contiene una disolución de colorante, la cual se renueva dos o tres veces hasta que el gel quede completamente decolorado.

Identificación de los tipos de hemoglobina. A la hemoglobina de menor recorrido se ha identificado como B y a la de mayor recorrido como A.

II.5.b. *Transferrinas.*

El equipo básico es el mismo que se utiliza en la determinación de los tipos de hemoglobina. Únicamente varían los distintos componentes del corrido electroforético como son:

Tipo de buffer utilizado en la fabricación del gel y cantidad de almidón hidrolizado que se necesita.

Buffer utilizado para el llenado de las cubetas electroforéticas.

Muestra sérica que se obtiene dejando coagular la muestra de sangre, recogiendo el suero y centrifugándolo a la velocidad de 6.000 r.p.m., para eliminar todos los productos celulares e impurezas que pudiera contener.

Tipo y tamaño de papel Whatman a utilizar para la preparación de la muestra electroforética.

Disposición y número de muestras a colocar en el gel.

Duración y voltaje del corrido electroforético.

Teñido del gel.

En este sentido, las especificaciones correspondientes a la técnica electroforética de transferrinas son las siguientes:

Gel de transferrinas.

Almidón	35 grs.
Buffer gel	250 ml.
Buffer gel transferrinas	
Tris	2.2724 grs.
Acido cítrico	1,1256 grs.
Agua destilada	hasta 1 litro
pH=7,6	
Buffer cubetas	
Acido bórico	18,55 grs.
Sosa	4, grs.
Agua destilada	hasta 1 litro
pH=8,7	

Inserción de las muestras.

Las muestras se insertan a 5 cm. del borde correspondiente al polo negativo. Para la inserción de las muestras se usa papel Whatman n.º 3.

Tiempo de inserción de la muestra:

30 minutos a 220 voltios,

Corrido del gel

Hasta 3 cm. del punto de inserción a 300 voltios. Después, hasta 12 cm. del punto de inserción a 400 voltios.

Corte y teñido del gel.

Igual a hemoglobinas

Identificación de los tipos de transferrinas. En nuestras determinaciones hemos localizado cinco tipos diferentes de transferrinas denominadas: A₁, B₁, B₂, C y D₁, en razón de su movilidad electroforética y de menor a mayor.

II. 5. c. *Albúminas.*

De conformidad con lo comentado anteriormente, las especificaciones correspondientes a la técnica electroforética de albúminas son las siguientes:
Gel de albúmina.

Almidón hidrolizado	33 grs.
Buffer gel	250 ml.

Buffer gel del albúminas
 Tris 1,696 grs.
 Acido cítrico 0,841 grs.
 Agua destilada hasta 1 litro
 pH=6,2

Buffer cubetas, igual al de transferrinas.
 Inserción de la muestra, igual que transferrinas.
 Tiempo de inserción de la muestra.
 5 minutos a 250 voltios.

Corrido del gel.
 Hasta 12 cm. del punto de inserción 350 voltios.

Corte y teñido del gel, igual a hemoglobinas.

Identificación de los tipos de albúmina.

La albúmina S presenta dos bandas mientras que la SF presenta tres.

III. RESULTADOS

En el cuadro n.º IV del anexo incluimos los resultados individualizados de la reacción de hemólisis utilizada para la determinación de los antígenos eritrocitarios en las 200 ovejas de Sardón de Duero. Los resultados del examen para los grupos sanguíneos de las 99 ovejas de la Estación Agrícola Experimental de León se incluyen en el cuadro n.º II del anexo (resultados de Jouy-en-Josás) y en el cuadro n.º III del mismo (prueba de contrastación).

A su vez en el cuadro n.º V del anexo se incluyen los resultados individualizados de los 200 animales de Sardón de Duero para los grupos sanguíneos, las hemoglobinas, las albúminas y las transferrinas. En el cuadro n.º VI del anexo incluimos las genealogías origen del estudio que incluimos en el capítulo siguiente.

Todos estos resultados se resumen en las tablas núms. I, II y III que incluimos en este capítulo de resultados y que presentamos a continuación.

Tabla N.º I.—En ella incluimos el número de animales y porcentaje que presenta cada uno de los genotipos encontrados en esos sistemas A, B y C para cada uno de los dos rebaños analizados (el de la Estación Agrícola Experimental de León y el de Sardón de Duero). Hemos calculado a la vez la media de las dos poblaciones estudiadas que, aunque no presenta gran valor, se acercará más a la media de la raza Churra de cada rebaño por separado.

Tabla n.º II.—En esta tabla presentamos el número y porcentaje de los fenotipos y genotipos observados y esperados así como las frecuencias génicas para cada uno de los tipos de hemoglobina.

Realizada la prueba de «ji cuadrado» correspondiente hemos obtenido un valor de 0,84 que corresponde a una probabilidad mayor de 0,3 y menor de 0,5 lo que indica que la población se encuentra en equilibrio para este polimorfismo.

En esta misma tabla incluimos los resultados observados para la albúmina, hallando un valor de 1,1596 para la «ji cuadrado» que corresponde a una probabilidad mayor del 0,2 y menor del 0,3 lo que indica que la población se encuentra en equilibrio para este polimorfismo.

Tabla n.º III.—En esta tabla incluimos el número y porcentaje de los fenotipos y genotipos observados y esperados así como las frecuencias génicas para los cinco alelos encontrados. Realizada la prueba de «ji cuadrado» hemos obtenido un valor de 13,8198 que corresponde a una probabilidad menor de 0,5 y mayor de 0,3 lo que indica que la población se encuentra en equilibrio para este polimorfismo.

TABLA N.º 1

Distribución porcentual fenotípica de las dos agrupaciones estudiadas y del total para cada sistema eritrocitario.

SIST.	FENOTIPOS	Reb. E.A.E. 99 animales		Reb. Sardón 200 animales		Total 299 an.	
		n.º	%	n.º	%	n.º	%
A	Aa Ab	29	29.29	3	1.5	32	10.70
	Aa	27	27.2767	33,5	94	31,43	
	Ab	37	37.37	10	5.0	47	15.71
	-/-	6	6.06	120	60.0	126	42.14
B	Bb	17	17.17	57	28.5	74	24.74
	Be	2	2.02	0	0.00	2	0.66
	Bf	11	11.11	22	11.0	33	11.04
	Bh	0	0.0	2	1.0	2	0.66
	Bb Be	1	1.01	3	1.5	4	1.33
	Bb Bf	25	25.25	60	30.0	85	28.42
	Bb Bh	4	4.04	10	5.0	14	4.68
	Be Bf	2	2.02	0	0.0	2	0.66
	Be Bh	1	1.01	0	0.0	1	0.33
	Bf Bh	1	1.01	2	1.0	3	1.0
	Bb Be Bf	1	1.01	1	0.5	2	0.66
	Bb Be Bh	2	2.02	1	0.5	3	1.0
	Bb Bf Bh	21	21.21	7	3.5	28	9.36
Be Bf Bh	1	1.01	0	0.0	1	0.33	
Bb Be Bf Bh	3	3.07	0	3	1.0		
-/-	7	7.07	35	17.5	42	14.04	
C	Ca	35	35.35	24	12.0	59	19.73
	-/-	64	64.64	176	88.0	240	80.26

TABLA N.º II

Distribución de los fenotipos y genotipos observados y esperados así como de las frecuencias génicas para las Hemoglobinas y las Albúminas, con indicación de los valores de «ji cuadrado» y Probabilidad.

n.º de Fenotipos Observados	HEMOGLOBINAS			ALBUMINAS		
	0	24	172	171	28	0
Frecuencias Genotípicas Observadas	0.00	0.1218	0.8781	0.8592	0.1407	0.00
FRECUENCIAS GENICAS	0.061		0.939	0.93		0.07
Frecuencias Genotípicas Esperadas	0.0037	0.1145	0.88	0.8649	0.1302	0.0049
n.º de Fenotipos Esperados	0.729	22.45	172.8	172	26	1
Valores de «ji cuadr.»	0.84			1.1596		
Probabilidad	0.5	P	0.3	0.3	P	0.2
n.º total de animales	196			199		

TABLA N.º III

Distribución de los genotipos y fenotipos esperados y observados así como de las frecuencias génicas para las Transferrinas, con indicación de los valores de «ji cuadrado» y Probabilidad

	n.º Fen. Obs.	Fre. Fen. Obs.	FRE GEN.	Fre. Fen. Esp.	n.º Fen. Esp.	«ji²»	P
A ₁	1	0.005	0.115	0.0132	2.6268		
A ₁ B ₁	19	0.0934		0.1	19.9		
A ₁ B ₂	2	0.01		0.0214	4.2586		
A ₁ C	5	0.0251		0.0289	5.767		
A ₁ D ₁	18	0.0904		0.0531	10.567		
B ₁	38	0.0909	0.435	0.1892	37.65		0.3
B ₁ B ₂	18	0.0904		0.0809	16.099		
B ₁ C	21	0.1055		0.1096	21.81		
B ₁ D ₁	39	0.1959		0.2009	39.979		
B ₂	3	0.015	0.093	0.0086	1.7114		
B ₂ C	2	0.01		0.0234	4.6566		
B ₂ D ₁	9	0.0452		0.0429	8.5371		
C	6	0.0301	0.126	0.0158	3.1442		
CD ₁	10	0.0502		0.0582	11.5818		
D ₁	8	0.0402	0.231	0.0533	10.6067		

IV. DISCUSION

Ante todo queremos justificar la presentación de resultados respecto a grupos sanguíneos. Como podemos observar en el cuadro correspondiente se anotan los resultados como frecuencias fenotípicas y no como frecuencias génicas. La razón es que poseemos muy pocos datos genealógicos, lo que hace muy difícil la localización de fenogrupos. Consideramos más adecuado, en este caso, incluir fenotipos en lugar de genotipos.

Con vistas a realizar una comparación entre los dos rebaños analizados para grupos sanguíneos (el de la Estación Agrícola Experimental y el de Sardón de Duero), hemos de hacer notar en principio, que el número de animales analizados fueron 99 para el primer rebaño y 200 para el segundo, lo cual puede influir en los porcentajes hallados. En segundo término hemos de hacer notar que algunas de sus características, dentro del conjunto racial, son diferentes. Mientras que el rebaño de la Estación Agrícola Experimental es puramente experimental, con un grado alto de consanguinidad como conviene al tipo de experimentación al que está, fundamentalmente, destinado, el rebaño de Sardón de Duero es comercial, con un grado de consanguinidad menor y con variabilidad en los sementales utilizados.

Como podemos observar en la tabla correspondiente del capítulo anterior, las diferencias más aparentes que podemos encontrar entre ambos rebaños son:

En lo que se refiere al sistema A, existen diferencias entre los porcentajes correspondientes a los fenotipos portadores del antígeno Ab así como a los porcentajes correspondientes al fenotipo doble recesivo. Así encontramos una gran diferencia en los porcentajes correspondientes al fenotipo Aa Ab que es de un 29 % para el rebaño de la Estación Agrícola Experimental de León y de un 1,5 % para el rebaño de Sardón de Duero; el fenotipo Ab representa un 37 % en la E. A. E. de León y de un 5 % en el Sardón de Duero; el doble recesivo se encuentra en un 6 % de las ovejas de la E.A.E. de León y en un 60 % en las ovejas de Sardón de Duero; las diferencias no son tan altas en cuanto al fenotipo Aa.

Respecto al sistema B, únicamente encontramos diferencias apreciables en dos fenotipos. En el fenotipo Bb encontramos un porcentaje del 17 % en el rebaño de la E.A.E. de León y un 28,5 % en el de Sardón de Duero. El fenotipo Bb Bf Bh presenta un porcentaje del 21 % para la E.A.E. de León y un 3,5 % para Sardón de Duero.

Respecto al sistema C, las diferencias son también notables, con un 35 % para el fenotipo Ca en el rebaño de la E.A.E. de León y un 12 % en el de Sardón de Duero. Los porcentajes correspondientes al fenotipo doble recesivo son de 64 % y 38 % respectivamente.

A pesar de que las diferencias, sobre todo respecto a algunos fenotipos del sistema A, son considerables, no nos atrevemos a emitir una hipótesis para

explicar la causa de las mismas ya que ambos rebaños presentan características diferentes, como hemos explicado anteriormente.

Es posible que estas diferencias sean debidas únicamente al distinto grado de consanguinidad que presentan ambos rebaños o también que se trate de dos agrupaciones ecotípicas diferentes dentro de la raza Churra.

Pasando al estudio de los polimorfismos bioquímicos y por lo que respecta a la hemoglobina en la tabla n.º IV que incluimos a continuación, anotamos los resultados en diferentes razas y ecotipos observados por Asensio en su Tesis Doctoral así como los observados por nosotros.

TABLA N.º IV

RAZA	ECOTIPO	Frecuencias Génicas	
		Hb A	Hb B
MANCHEGA	Genuino	0.14	0.86
	Segureña	0.09	0.91
CASTELLANA	Blanca	0.38	0.61
	Negra	0.17	0.83
OJALADA	Soriana	0.22	0.78
	Turolense	0.32	0.68
LACHA	Genuino	0.23	0.77
MERINA	Entrefino	0.33	0.67
	Serrano	0.36	0.64
TALAVERANA	Genuino	0.51	0.49
CHURRA	Tensina	0.11	0.89
	Genuino	0.06	0.94

Como podemos observar, salvo de oveja Manchera Segureña que presenta una frecuencia génica para la hemoglobina B de 0,91, son los dos ecotipos de la raza Churra analizados los que presentan las mayores frecuencias para esta hemoglobina, siendo el ecotipo genuino, analizado por nosotros, el que la presenta más elevada con un valor de 0,94.

No pretendemos entrar en mayores consideraciones ya que no están aclaradas, hasta el momento, las posibles relaciones de las hemoglobinas con otros caracteres. Sin embargo, existen algunas hipótesis que admiten que los animales portadores de la hemoglobina tipo B presentan mejores condiciones de adaptabilidad a terrenos pobres y climas duros, lo cual podría explicar el por qué la Churra presenta la rusticidad que la caracteriza. Posteriores investigaciones en esta vía podrían aclarar el problema.

Como podemos ver en la tabla n.º II de hemoglobinas, la población se encuentra en equilibrio respecto a este polimorfismo ya que realizada la prueba de «ji cuadrado», obtenemos una probabilidad menor de 0,5 y mayor de 0,3.

En cuanto a transferrinas hemos de hacer constar que en el rebaño de Sardón de Duero no hemos encontrado los tipos denominados Aw, Dw y E por el Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y detectadas en otras razas españolas.

En la tabla n.º III sobre resultados de transferrinas, podemos observar como el alelo que presenta mayor frecuencia génica es el B₁ con una frecuencia de 0,43 seguido del alelo D₁ con una frecuencia de 0,23. El alelo de menor frecuencia es el B₂ (0,093).

Respecto a las albúminas hemos encontrado únicamente los fenotipos FS y SS con frecuencias respectivas de 0,1407 y 0,8592, sin que haya aparecido el fenotipo FF. Hemos de destacar la frecuencia tan elevada que presenta el alelo Al s que ha alcanzado una frecuencia génica de 0,93, la mayor encontrada hasta ahora en razas ovinas autóctonas españolas, según trabajos sin publicar.

Como es de suponer, no podemos realizar estudios comparativos ni consideraciones genético-estadísticas de ningún tipo, habida cuenta de la ausencia de datos a este respecto en la bibliografía española sobre ganado lanar.

Una de las aplicaciones más inmediatas, antes incluso que el estudio de la estructura genética de las poblaciones, es la aplicación de los estudios sobre grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos a la verificación del parentesco.

Independientemente de los errores de identificación de los animales, de manejo de las muestras, de interpretación laboratorial de los resultados y de transcripción de los mismos, surgen los errores originales de los reproductores.

Como comprobación del anterior aserto incluimos en el cuadro n.º VI del anexo la serie de animales por genealogía y la identificación por crotales junto con el parentesco y los resultados obtenidos en grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos, señalando los errores localizados con un círculo negro alrededor del factor o factores implicados.

Como podemos observar en dicho cuadro, encontramos errores en las genealogías números 1, 4, 5, 8, 14, 20, 23 y 24, en total ocho errores en las 36 genealogías estudiadas, lo que hace un porcentaje del 22,22 %. De estas genealogías los números 4, 5, 8 y 14 pueden considerarse como errores de paternidad.

Además de estos errores localizados, uno de los moruecos, el número 722, había muerto con anterioridad a la toma de muestras; utilizaremos las genealogías que de él poseemos para intentar averiguar los antígenos eritrocitarios y

tipos de olimorfismos que poseía. Por otra parte, existen algunas genealogías con padre desconocido que trataremos de estudiar.

En primer lugar, trataremos de averiguar los antígenos eritrocitarios y los tipos de Hb., Al. y Tf. que poseía el anteriormente aludido morueco n.º 722, para lo que utilizaremos las genealogías 29 a 32.

De la genealogía n.º 29 podemos deducir que el macho n.º 722 debía poseer el antígeno Bf, la Hb B, la albúmina S y de transferrina B₁ y D₁.

De la genealogía n.º 30 deducimos que posee los antígenos Bf y Bh a la vez que confirmamos la posesión de la albúmina S.

A partir de la genealogía n.º 31 podemos confirmar la posesión de los antígenos Bf, Hb, B y la Al S por el morueco n.º 722.

Por último y a partir de la genealogía n.º 32 confirmamos los factores Bf, Hb B, Al S y Tf D.

En resumen, el morueco 722 debía poseer, por lo que podemos deducir a partir de las genealogías anteriores, los antígenos eritrocitarios Bf y Bh, la hemoglobina tipo B, la albúmina tipo S y las transferrinas tipos B₁ y D₁.

A la vista de los resultados obtenidos con el morueco n.º 722, podemos intentar completar las genealogías números 33 a 36 en las que se desconocía el padre a la vez que intentamos esclarecer los errores de paternidad localizados en las genealogías números 4, 5, 8 y 14.

Para mayor claridad de este estudio indicaremos a continuación los antígenos eritrocitarios y los tipos de hemoglobinas, albúminas y transferrinas para los tres sementales utilizados en el rebaño de Sardón de Duero.

IDENTIFICACION							
Muestra	Oveja	Gr. Sang.			Hb.	Al.	Transf.
197	220	Aa	Bb	Bf	B	S F	B ₁ D ₁
198	127		Bb	Bf Bh	B	S	B ₁
	722			Bf Bh	B	S	B ₁ D ₁

A continuación trataremos cada una de las genealogías por separado.

Genealogía n.º 33.—El padre de las ovejas n.º 25 (441) y n.º 33 (442) debe poseer los siguientes factores: Aa, Ab, Bf, Bh, Hb B, Al S, Al F, Tf B₁ y Tf D₁. El semental n.º 197 (220) no posee los factores Ab y Bh por lo que no puede ser el padre. El semental n.º 198 (127), no posee los factores Aa, Ab, Al F y Tf D₁ por lo que tampoco puede ser el padre. Hemos de suponer que del semental 722 no poseemos todos los datos por lo que no podemos decidir.

Genealogía n.º 34.—El padre de la oveja n.º 3 (431), debe poseer la hemoglobina B, la albúmina S y la transferrina B₁. En este caso no podemos eliminar ninguno de los sementales ya que todos cumplen las condiciones.

Genealogía n.º 35.—El padre de la oveja n.º 13 (343) debe poseer los factores Bf, Hb B y Tf D₁. El semental 198 (127) no puede ser el padre por carecer del factor Tf D₁. Los otros dos cumplen las condiciones.

Genealogía n.º 36.—El padre debe poseer la Hb B y la Al S condiciones que cumplen los tres sementales por lo que no podemos eliminar a ninguno de ellos como posible padre.

Genealogía n.º 4.—El padre debe poseer los factores Bf, Hb, B, Al F y Tf D₁. El semental n.º 198 (127) no posee los factores Al F y Tf D₁ por lo que no puede ser el padre. Por nuestros datos el semental n.º 722 tampoco posee la Al S sin embargo no podemos asegurarlo.

Genealogía n.º 5.—El padre debe poseer los factores Bf, Hb, B, Al S y Tf D₁. El semental n.º 198 (127) no posee la Tf D₁ por lo que no puede ser el padre. Los otros dos sementales cumplen las condiciones.

Genealogía n.º 8.—El padre debe poseer los factores Aa, Hb B, Al S y Tf D₁. El semental 198¹²⁷ no puede ser el padre por no poseer los factores Aa y Tf D₁. El semental n.º 722 no podemos confirmarlo por carecer de datos.

Respecto a las genealogías núms. 1, 20, 23 y 24 las incompatibilidades halladas en ellas no parecen ser debidas a errores de paternidad. Es posible que los errores se deban a la anotación de la madre más que a confusión de la misma, ya que las ovejas generalmente sólo aceptan a su propio hijo con lo que el error en la madre es difícil. En algunos casos de partos múltiples, algunos corderos suelen ser adoptados trabajosamente por ovejas cuyo cordero ha nacido muerto o ha muerto poco después, caso que puede dar lugar a algunos errores en la anotación de la madre, estos errores son difíciles de localizar debido al gran número de hembras en los rebaños.

Las incompatibilidades encontradas en las genealogías anteriormente citadas son las siguientes:

Genealogía n.º 1.—La hija n.º 23 (1419) no puede poseer el antígeno Ca si ninguno de sus padres lo posee, lo cual indica un error en la anotación de alguno de los progenitores.

Genealogía n.º 20.—La hija n.º 17 (324) no puede poseer la Tf B₂ si esta no existe en alguno de los padres.

Genealogía n.º 23.—La hija n.º 34 (347) debería poseer la transferrina B₂ ya que su madre es homocigótica para la misma.

Genealogía n.º 24.—La hija n.º 41 (402) posee el antígeno Ab que no existe en ninguno de sus padres por lo que debe existir un error en la anotación de los mismos.

Hemos de hacer constar que las determinaciones han sido repetidas para todos los componentes de cada genealogía en la que se han detectado errores, repitiéndose en todas ellas los mismos resultados.

Como hemos visto las investigaciones en grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos se muestran como un medio eficaz para detectar errores

genealógicos. En este caso especial las condiciones no han sido favorables por lo que no hemos obtenido soluciones claras.

De entre el conjunto formado por grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos que hemos aplicado a la identificación de errores genealógicos, la mayor eficacia la ha presentado el polimorfismo de las transferrinas.

CONCLUSIONES

Primera

Se ha logrado la obtención de 12 sueros inmunes monoespecíficos para la determinación de antígenos eritrocitarios mediante isoimmunizaciones en ovejas de raza Churra.

Estos 12 reactivos con su identificación, son los siguientes:

Anti-Aa n.º 1	(421 / 269-14-1-75)
Anti-Aa n.º 2	(256 / 463-462-4-III-75)
Anti-Ab n.º 1	(202 / 233-7-1-75)
Anti-Ab n.º 2	(444 / 219-4-III-75)
Anti-Ab n.º 3	(447 / 470-4-III-75)
Anti-Bb	(462 / 455-4-III-75)
Anti-Be	(2 / 408-239-3-1-75)
Anti-Bf	(206 / 230-4-III-75)
Anti-Bh	(256 / 463-201-4-III-75)
Anti-Ca n.º 1	(206 / 402-3-1-75)
Anti-Ca n.º 2	(470 / 412-256-17-1-75)
Anti Ca n.º 3	(475 / 474-2-17-1-75)

Estos reactivos cumplen las prescripciones establecidas por la I.S.A.B.G.R. y mediante ellos se han identificado los siete antígenos eritrocitarios siguientes:

Aa, Ab, Bb, Be, Bf, Bh y Ca.

Por primera vez en España se ha realizado el examen para grupos sanguíneos en 200 ovejas de raza Churra utilizando estos reactivos.

Segunda

Las frecuencias génicas observadas para los polimorfismos bioquímicos en los 200 animales analizados fueron las siguientes:

Hemoglobinas:

Frecuencia génica para Hb ^A	= 0,061
Frecuencia génica para Hb ^B Q	= 0,939

Albúminas:

Frecuencia génica para Als	= 0,93
Frecuencia génica para Alf	= 0,07

Transferrinas:

Frecuencia génica para Tf ^A 1	= 0,115
Frecuencia génica para Tf ^B 1	= 0,435
Frecuencia génica para Tf ^B 2	= 0,093
Frecuencia génica para Tfc	= 0,126
Frecuencia génica para Tf ^B 1	= 0,231

Tercera

Se ha demostrado la eficacia de la utilización de los grupos sanguíneos y polimorfos bioquímicos en las pruebas de parentesco. En las 36 genealogías estudiadas se ha llegado a detectar un porcentaje de errores del 22,22 %. Para cada error, y con el auxilio de dichas técnicas, se estudian posibles soluciones.

RESUMEN

Esta Tesis consta de dos partes. La primera ha tenido como objetivo la preparación de sueros reactivos para la determinación de grupos sanguíneos en la oveja. Para ello, después de una revisión bibliográfica de los sistemas eritrocitarios ovinos, se realizó la identificación de antígenos eritrocitarios en 99 muestras de sangre de ovejas de raza Churra.

Establecidas las correspondientes parejas donante-receptor, se ha llevado a cabo un proceso de inmunización destinado a la obtención de sueros inmunes, que han sido sometidos a pruebas de potencia y absorción mediante 5est de hemólisis, hasta llegar a la obtención de los reactivos: anti-Aa, anti-Ab, anti-Bb, anti-Be, anti-Bf, anti-Bh y anti-Ca. Estos reactivos han sido titulados y contrastados de acuerdo con las normas establecidas por la I.S.A.B.G.R.

En la segunda parte, se han aplicado estos sueros reactivos, junto a Hemoglobinas, Transferrinas y Albúminas, al estudio inmunogenético de una población de raza «Churra» de ordeño.

Sobre muestras de una población de 200 ovejas de raza «Churra» de ordeño, se han aplicado las técnicas electroforéticas de determinación de polimorfismos bioquímicos junto con las de determinación de grupos sanguíneos, para estudiar su distribución fenotípica, las frecuencias génicas y analizar la estructura de la población.

Así mismo se ha efectuado un análisis de datos genealógicos detectándose, aproximadamente, un 20 % de errores.

RESUME

Cette thèse est composée de deux parties. La première, il a comme but l'étude immunogénétique d'une peuplade de race Churra laitière.

Concernant les preuves d'une population de 200 brebis de race Churra d'action de traire, ils ont appliqué les techniques électrophorétiques de la détermination

Cette thèse est composée de deux parties. La première, il a comme objectif la préparation de sérum réactifs pour la détermination de groupes sanguins chez la brebis. C'est pour ça, qu'après de un contrôle bibliographique des systèmes érythrocytaires ovines, on a réalisé l'identification des antigènes érythrocytaires dans 99 échantillons de sang des brebis «Churras».

Etablies les correspondants vis à vis, donnant-récepteur, on a poursuivi un progrès d'immunisation destiné pour l'obtention de réactifs, qu'on a soumis à des preuves de puissance et d'absorption suivant un test d'hémolyse jusqu'à l'obtention des réactifs: Anti-Aa, anti-Ab, anti-Bb, anti-Be, anti-Bf, anti-Bh et anti-Ca. Ces réactifs ils sont titrés et contrastés suivant les règles établis par la I.S.A.B.G.R.

Dans la deuxième partie, ils ont appliqué ses réactifs, avec l'hémoglobine, transferrine et a de polymorphismes avec celles de détermination de groupes sanguins, pour étudier son distribution phénotypique, les fréquences géniques et analyser la structure du peuplade.

De cette manière, on a réalisé un analyse de renseignement généalogiques en arrivant à la conclusion d'une approximation à peu près, 20% des fautes.

SUMMARY

The work we have carried out has two main parts. In the first one, we have got reactive sera in order to determine the sheep blood groups. After a review of the ovine erythrocytic systems, we have identified erythrocytic antigens from 99 blood samples of the «Churra» breed.

When the donor-receiver animals were studied, a immunization experiment was carried out in order to get immune sera. These have been tested to know its potency and absorption properties by means of an haemolytic test. The reactives we have got are: anti-Aa, anti-Ab, anti-Bb, anti-Be, anti-Bf, anti-Bh, and anti-Ca. All of them were standardized following the ISABGR patterns.

The second half of this work, was design to immunogenetic study of the «Churra» breed in a dairy flock. To determine polymorphisms and blood groups, we have done electrophoretic tests from 200 blood samples of a «Churra» dairy flock. The experiments were designed to study the phenotypic distribution, genic frequencies and to know population pattern.

We have also studied the genealogic data. The percentage of errors is about 20 %.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los Profesores Zarazaga y Zorita por la ayuda prestada en el planteamiento y realización de esta Tesis Doctoral, así como por haber puesto a nuestra disposición los medios que la han hecho posible. Así mismo queremos destacar su espíritu de colaboración favoreciendo y estimulando que sus equipos de trabajo cooperen en un proyecto de investigación conjunto.

A la Dra. Podliachouk (Investigadora del Instituto Pasteur) y al Dr. Nguyen (Investigador del I.N.R.A.) por su desinteresada y eficaz ayuda en el planteamiento experimental de este trabajo.

Al Dr. Vallejo por su colaboración en la interpretación y discusión de los resultados así como por sus sugerencias en la redacción del texto original.

A la Estación Agrícola Experimental de León (C.S.I.C.) y en particular al Director de su línea experimental Dr. Sanz Arias, que puso a nuestra disposición los animales e instalaciones empleados en la realización del trabajo experimental.

Deseo también expresar mi agradecimiento a los miembros de los Departamentos de Genética de las Facultades de Veterinaria de Zaragoza y León y de la Sección de Zootecnia de la E.A.E. de León por su ayuda y apoyo en la realización de esta Tesis.

Finalmente, a la Srta. Campelo por su eficiente labor mecanográfica en la transcripción del original.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-AGAR, N. A., 1968. Ph. D. Thesis, University of Agra.
- 2.-AGAR, N. S., RAWAT, J. S. y ROY, A., 1969. J. Agric. Sci. Camb., 73: 197-202.
- 3.-AGAR, N. S. y SETH, O. N., 1971. Am. J. vet. Res., 32: 361-362.
- 4.-FERGUSON, L. C., STORMONT, C. e IRWIN, M. R., 1942. J. Immunol., 44: 147-164.
- 5.-NGUYEN, T. C., 1972. Ann. Génét. Sel. anim., 4 (3): 363-374.
- 6.-NGUYEN, T. C., Comunicación personal.
- 7.-PODLIACHOUK, L., Comunicación personal.
- 8.-RAMISEN, B. A., STORMONT, C. y SUZUKI, Y., 1960. Genetics, 45: 1595-1603.
- 9.-SOBEY, W. R. y ADAMS, K. M., 1955. Aust. J. biol. Sci., 8: 603-614.
- 10.-YCAS, M. K. W., 1949. J. Immunol., 61: 327-347.