

ANTÍGENOS LINFOCITÁRIOS E RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA¹

JEHUD BORTOLOZZI² e HAROLD C. HINES³

RESUMO - Foram testados, pelo teste de linfocitotoxicidade, 86 animais da raça Jersey, resistentes ao vírus da leucose bovina. Uma amostra de 10 cc de sangue periférico de cada animal foi coletada em meio de cultura e transportada para o laboratório. Foram feitas tipagens eritrocitárias de acordo com as técnicas desenvolvidas. Os resultados obtidos foram analisados e comparados com os dados de uma população normal. Constatou-se aumento significativo da frequência dos alelos W5 e W12 na população experimental, sugerindo que esses alelos podem ser considerados como marcadores genéticos da resistência bovina ao vírus da leucose.

Termos para indexação: histocompatibilidade, linfossarcoma, tipagens sanguíneas, teste de linfocitotoxicidade, frequência gênica, poliformismo.

LYMPHOCYTE ANTIGENS AND RESISTANCE TO BOVINE LEUKOSIS

ABSTRACT - Eighty-six Jersey animals resistant to bovine leukosis virus (BLV) were tested for lymphocyte antigens by cytotoxicity test. A sample of 10 cc of peripheral blood of each animal was collected in culture medium and taken to laboratory. Erythrocytes were typed according to developed techniques. The results analyzed and compared with those from a normal population, showed a significant increase of frequency of the alleles W5 and W12 in the experimental population, suggesting that these alleles could be considered as possible genetic mark for BLV resistance in cattle.

Index terms: histocompatibility, lymphosarcoma, blood typing, lymphocytotoxicity test, gene frequencies, polymorphism.

INTRODUÇÃO

A presença dos genes principais da histocompatibilidade (MHC - major histocompatibility complex) foi detectada em, pelo menos, dez diferentes espécies de mamíferos, mas só recentemente tais genes foram estudados com certa ênfase em animais domésticos. Os antígenos da histocompatibilidade, geralmente detectados nos linfócitos, podem ser vistos como a expressão genotípica de um complexo de alelos múltiplos, os quais estão localizados bem próximos numa pequena região de um autossomo (Gotze 1977).

Em cada espécie até agora estudada, dois tipos de antígenos linfocitários foram identificados: estruturas que são serologicamente detectadas com

anticorpos (SD) e estruturas que são demonstráveis por culturas mistas de linfócitos (LD).

Caldwell et al. (1977) revelaram a existência de SD em bovinos, e Caldwell & Cumberland (1978) postularam o modo de herança de um loco SD, em bovinos da raça Holstein. Spooner et al. (1978), utilizando os reagentes obtidos de imunizações entre pares de mãe-filha, verificaram, através de estudos familiares, que seus dados eram consistentes com a hipótese de, pelo menos, 17 fatores mendelianos controlados por uma mesma região do cromossomo. Evidências de um número muito próximo de grupos de ligação foram apresentadas por outros autores (Spooner et al. 1979).

Amorena & Stone (1978) também confirmaram o padrão de herança dos antígenos BoLA (Bovine Lymphocyte Antigen). Usinger et al. (1977) sugeriram a existência de um loco, LD, confirmada em 1979, durante a realização do Second International Bovine Lymphocyte Antigen Workshop (Spooner et al. 1979).

O interesse no estudo dos antígenos linfocitários dos bovinos tem aumentado devido aos oportunos resultados de associações entre antígenos HLA e doenças no homem (Dick 1978). Evidências preliminares sobre associações entre antígenos BoLA e uma doença em bovinos (carcinoma ocu-

¹ Aceito para publicação em 7 de janeiro de 1985.

Trabalho desenvolvido no Cattle Blood Typing Laboratory, em Columbus, Ohio, USA, e apresentado no 2º Congresso de Genética Aplicada à Produção Animal (Madrid, Espanha, 6/10/82). Financiado pelo CNPq-PIG (Processo 40.2549/82) e Comissão de Projetos Especiais da UNESP.

² Biól., Prof. - Tit., UNESP/IBBMA/Dep. de Genética, Campus de Botucatu, Caixa Postal 102, CEP 18600 Botucatu, SP.

³ Méd. - Vet., Prof. - Tit., Dairy Science Department, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA.

lar) foram detectadas por Caldwell (1979). Essas associações permitirão uma seleção mais eficaz, contribuindo para aumentar, nos rebanhos, os fatores responsáveis pela resistência natural dos animais às doenças.

Olson & Baumgartner (1975) mostraram que poucos animais infectados naturalmente com o vírus da leucose bovina desenvolvem linfossarcoma, e essa situação persiste mesmo quando as infecções continuam. Esse fato mostra que outros fatores, além do vírus, devem estar envolvidos na expressão da doença. Uma possibilidade é que o desenvolvimento do linfossarcoma esteja associado a antígenos linfocitários específicos, codificados pelo sistema principal de histocompatibilidade, recentemente definido em bovinos e controlados pelo loco BoLA.

O presente trabalho mostra as primeiras evidências de associações entre os antígenos linfocitários e a resistência ao vírus da leucose em bovinos da raça Jersey, introduzindo no Brasil as técnicas de produção de reagentes linfocitários e a de tipagens de linfócitos em bovinos, para aplicações nos programas de melhoramento animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo da resistência ao vírus da leucose bovina, foram utilizados 86 animais da raça Jersey, gentilmente cedidos pelo Dr. Jorge F. Ferrer, da Escola de Medicina Veterinária da Universidade de Pensilvânia (New Bolton Center, Pennsylvania, USA) e por ele classificados como resistentes ao BLV. Uma amostra de 10 ml de sangue periférico foi coletada em meio de cultura McCoy's (meio de cultura para linfócitos, composto de 50% de meio mínimo essencial Eagles e 50% de soro fetal) e transportada para o laboratório. Foi usada uma bateria de reagentes aloimune citotóxico para os seguintes alelos: W₂, W₅, W₆, W₈, W₉, W₁₀, W₁₁, W₁₂ e W₂₀. As tipagens eritrocitárias foram feitas de acordo com as técnicas usuais (Bortolozzi 1979).

Separação dos linfócitos

Cerca de 10 ml de sangue bovino foram coletados usando-se EDTA como anticoagulante. Esse sangue, com o auxílio de uma pipeta, é transferido para outro tubo de 16 mm x 100 mm que contém 4 ml de uma solução chamada Ficoll-Hypaque (8,3% de Ficoll-Pharmacia Chemicals, Co. e 6,68% de Hypaque - Winthrop Laboratories). O sangue, colocado pela parede do tubo, fica sobre a solução Ficoll-Hypaque. Esse gradiente é então centrifugado a 1.500 rpm, durante 40 minutos, em uma centrífuga comum.

Os glóbulos vermelhos são separados e se movem para o fundo do tubo. Os granulócitos se movem para a camada de Ficoll-Hypaque. Os linfócitos e as plaquetas formam uma faixa na interfase entre as duas soluções. A banda linfócito planqueta é então removida e ressuspensa a 1 ml de solução Seligmans (solução salina balanceada) em tubos de 12 mm x 75 mm. Em seguida, é centrifugada em alta velocidade por 5 segundos, e o sobrenadante é transferido para outro tubo de 12 mm x 75 mm. Esse passo remove as células rompidas e os granulócitos que formam uma massa branca no fundo do tubo.

A suspensão de células é, então, centrifugada em alta velocidade (Serofuge - 11), durante 3 minutos. Os linfócitos e as plaquetas formam no fundo do tubo uma massa de cor branca. A solução Seligmans é retirada e as células ressuspensas em 5 ml de solução de NH₄Cl (0,14 M), que lisa os eritrócitos que ainda estiverem presentes. A suspensão de células é, então, centrifugada novamente e a solução NH₄Cl retirada. As células são ressuspensas em 5 ml de solução Seligmans. As plaquetas são separadas dos linfócitos, lavando-se as células em alta velocidade, durante 10 segundos, com 5 ml de solução Seligmans, por quatro ou cinco vezes.

Os linfócitos são, então, ressuspensos em uma solução McCoy's, e as células são testadas quanto à viabilidade. Esta é verificada colocando-se as células em uma solução salina com 5% de eozina Y, que cora somente as células mortas. Quando observadas em microscópio com contraste de fase, as células mortas são escuras, enquanto que as células viáveis são claras com uma auréola em torno delas. A viabilidade é, em geral, ao redor de 95%. As células são contadas com o auxílio de um hemocitômetro (AO Bright-Line, Spencer). Usando-se meio de cultura (solução McCoy's), as células são diluídas à concentração de teste, ao redor de $1-2 \times 10^6$ células/ml ou 20-50 células por câmara de hematocitômetro. Esta técnica é baseada em Folger & Hines (1976), com modificações.

Teste de linfocitotoxicidade

O teste é feito em placas de cultura de tecido tipo Falcon 3034 (Becton, Dickinson and Co.). Os reagentes são colocados usando-se seringas tipo Hamilton.

Cada cavidade da placa é preenchida com uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes. Em seguida, 1 µl de soro neutro é adicionado em cada cavidade. Esse soro neutro tem a função protetiva e bloqueia a maioria das atividades citotóxicas do soro de coelho, que é usado como complemento. O soro neutro é obtido de bezerros de grupo sanguíneo J positivo e não deve conter nenhum anticorpo natural contra antígenos das células dos bovinos.

Em seguida, em cada cavidade, adiciona-se 1 µl de soro apropriado (anticorpo contra os linfócitos). Muitas placas podem ser preparadas dessa maneira e congeladas para uso posterior.

Para a realização do teste, as placas são descongeladas à temperatura $\pm 25^\circ\text{C}$ e, em seguida, 1 µl da suspensão

é adicionado em cada cavidade. Deixa-se incubar por 30 minutos quando, então, acrescentam-se 5 µl de complemento e deixa-se incubar novamente por mais 2 horas.

No final do período de incubação, em cada cavidade, adicionam-se 5 µl de corante (eosina Y), seguido de 10 µl de solução de formol (37%) para fixar a reação do corante. Em seguida, as placas são cobertas com lamínulas (43 x 65) e, após 12 horas, lidas em microscópio invertido (objetiva 10 X).

A leitura é feita do seguinte modo:

Valores	Significado
0	não lido (bolhas de ar ou poucas células)
1	negativo (não contém células mortas)
2	negativo duvidoso (5% - 15% células mortas)
4	positivo duvidoso (15% - 30% células mortas)
6	positivo (30% - 80% células mortas)
8	fortemente positivo (80% - 100% células mortas)

Análises estatísticas

As freqüências gênicas para cada alelo foram calculadas usando-se a seguinte fórmula:

$$GF = 1 - \sqrt{1 - f} \tag{1}$$

onde

GF = freqüência gênica

f = freqüência da especificidade dentro do rebanho.

O desvio padrão foi calculado da seguinte forma:

$$s = [GF(1 - GF)/2N]^{1/2} \tag{2}$$

onde

s = desvio padrão

GF = freqüência gênica

N = número de animais testados

O estudo comparativo entre as freqüências gênicas da população estudada e da população controle foi feito através do intervalo de confiança:

$$IC = GF \pm t.s. \tag{3}$$

onde

IC = intervalo de confiança

t = de Student (ao nível de 5% = 1,96)

s = desvio padrão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente procedeu-se às tipagens eritrocitárias dos 86 animais e não se encontrou nenhuma associação entre os grupos sanguíneos e BLV.

Em seguida passou-se a analisar os resultados obtidos com os tipagens dos linfócitos, cujos resultados encontram-se na Tabela 1. As estimativas das

TABELA 1. Representação genotípica dos linfócitos de 86 bovinos da raça Jersey resistentes ao linfossarcoma.

Animal	Genótipo	Animal	Genótipo
099	W12/-	265	W12/W6
124	-/-	268	W5/-
231	W12/-	284	-/-
285	W6/-	287	-/-
288	W12/-	300	-/-
320	W2/W12	322	W12/-
328	W12/-	329	W5/-
330	W12/W10	333	W5/W12
340	-/-	341	W12/-
342	W12/-	343	-/-
345	-/-	349	W12/-
351	W12/-	352	W12/-
354	-/-	356	W12/W10
360	W5/W6	361	W12/-
362	W12/-	363	-/-
364	W12/-	365	W5/W12
8063	W12/-	8066	W12/-
AJ364	W12/-	1822	W12/-
137	W9/-	138	-/-
157	-/-	177	-/-
238	-/-	248	W12/W10
257	W6/-	264	W12/-
269	W5/-	274	-/-
276	-/-	277	W12/-
279	-/-	281	W5/W12
283	W5/W12	286	-/-
289	-/-	290	W5/-
294	W12/-	295	-/-
301	W12/-	303	-/-
306	W12/W6	308	W12/-
309	W5/W4	314	-/-
318	-/-	319	W5/W12
324	W5/W12	325	W12/-
326	W12/-	327	W12/-
331	W12/W6	332	W5/W6
335	W6/-	336	W5/W6
337	-/-	338	W12/-
838	-/-	AJ151	-/-
207	W12/W8	304	W5/W9
334	W12/-	346	-/-
348	W12/-	353	W12/-
357	W12/-	358	W12/-
359	W12/-	366	W12/-

freqüências gênicas para o rebanho estudado e para o rebanho controle estão representados na Tabela 2. Foi considerado como rebanho controle, o rebanho estudado por Caldwell e seus colaboradores, no Texas. A análise estatística mostrou uma

TABELA 2. Frequência gênica de cinco alelos do loco BoLA-A em bovinos da raça Jersey, com os respectivos intervalos de confiança (IC), t = 1,96.

Alelos	Presente trabalho		Caldwell et al. (1979)	
	Frequência	IC	Frequência	IC
W ₅ *	,085 ± ,021	,044 - ,126	,012 ± ,007	,002 - ,026
W ₁₂ *	,335 ± ,036	,264 - ,406	,210 ± ,026	,159 - ,261
W ₆ ns	,048 ± ,016	,017 - ,079	,067 ± ,016	,036 - ,098
W ₉ *	,012 ± ,008	,004 - ,028	,077 ± ,017	,044 - ,110
Nulo ns	,484 ± ,038	,410 - ,559	,596 ± ,032	,533 - ,659
W ₂	,006 ± ,005	,004 - ,016	na	
W ₁₀	,024 ± ,012	,001 - ,048	na	
W ₈	,006 ± ,005	,004 - ,016	na	
W ₁₁	na		,031 ± ,011	,029 - ,053
W ₂₀	na		,006 ± ,005	,004 - ,016

na. não analisadas

ns. diferença não significante

*. diferença significante

diferença significativa entre as frequências dos alelos W₅, W₉ e W₁₂. Embora o número de animais em ambos os rebanhos seja relativamente pequeno (86 e 114), acredita-se que os alelos W₅ e W₁₂ possam ser considerados marcadores genéticos para a resistência ao BLV em bovinos.

Os estudos dos antígenos da histocompatibilidade em bovinos são relativamente recentes e parecem semelhantes aos realizados em outras espécies. As evidências acumuladas até o presente indicam uma série de especificidades no loco BoLA, além de diferenças genéticas entre as raças. A presença do alelo nulo (-) em frequências altas em ambos os rebanhos sugere que especificidades adicionais deverão ser observadas em bovinos e novos alelos deverão ser definidos.

Experimentos para verificar associação entre linfócitos e resistências a doenças em bovinos são muito limitados e nenhum trabalho nesse sentido foi feito, no Brasil, até o presente. Caldwell & Cumberland (1978) apresentaram evidências de que algum soro pode detectar antígenos em bovinos com alta prevalência de carcinoma de célula ocular. Takashima & Olson (1978) não encontraram associação entre antígenos SD e formas adultas de linfossarcoma. Este trabalho mostra a necessidade e oportunidade de iniciar pesquisas nesse campo. É possível detectar associações entre an-

tígenos da histocompatibilidade e resistência a doenças em bovinos com técnicas relativamente simples. O conhecimento dessas associações é de grande importância econômica em programas de melhoramento de bovinos, principalmente no Brasil, onde, devido ao clima tropical, os rebanhos estão sujeitos a uma série muito grande de doenças.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. J.F. Ferrer o fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AMORENA, B. & STONE, W.H. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*, 201:159-60, 1978.
- BORTOLOZZI, J. Grupos sanguíneos e polimorfismo bioquímico em bovinos da raça Canchim. Botucatu, IBBMA-UNESP, 1979. Tese Livre-Docência.
- CALDWELL, J. Polymorphism of the BoLA system. *Tissue Antigens*, 13:319-26, 1979.
- CALDWELL, J. & CUMBERLAND, P.A. Cattle lymphocyte antigens. *Transplant. Proc.*, 10:889-92, 1978.
- CALDWELL, J.; BRYAN, C.F.; CUMBERLAND, P.A. & WASELI, D.F. Serologically detected lymphocyte antigens in Holstein cattle. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, 8:197-207, 1977.

- DICK, H.M. HLA and disease; introductory review. *Br. Med. Bull.*, 34:271-4, 1978.
- FOLGER, R.L. & HINES, H.C. Bovine lymphocyte antigens; serological relationships with erythrocyte and spermatozoan antigens. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, 7:137-45, 1976.
- GOTZE, D. The major histocompatibility system in man and animals. New York, Springer-Verlag, 1977. 406p.
- OLSON, C. & BAUMGARTNER, L.D. Propers for control of bovine leukosis. *Bovine Pract.*, 14:115-20, 1975.
- SPOONER, R.L.; LEVEZIEL, H.; GROSCLAUDE, F.; OLIVER, R.A. & VAIMAN, M. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in cattle. *J. Immunogenet.*, 5:335-46, 1978.
- SPOONER, R.L.; OLIVER, R.A.; SALES, D.I.; MCCOUBREY, C.M.; MILLAR, P.; MORGAN, A.G.; AMORENA, B.; BAILEY, E.; BERNOCO, D.; BRANDON, M.; BULL, R.W.; CALDWELL, J.; CWIK, S.; DAM, R.H.; DOOD, J.; GAHNE, B.; GROSCLAUDE, F.; HALL, J.G.; HINES, C.H.; LEVEZIEL, H.; NEWMAN, M.J.; STEAR, M.J.; STONE, W.H. & VAIMAN, M. Analysis of alloantisera against bovine lymphocyte. Joint report of the 1st International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.*, 10:63-86, 1979.
- TAKASHIMA, I. & OLSON, C. Histocompatibility antigens in bovine lymphosarcoma. A preliminary study. *Ann. Rech. Vet.*, 9:821-3, 1978.
- USINGER, W.R.; CURRIE-COHEN, M. & STONE, W.H. Lymphocyte defined loci in cattle. *Science*, 196: 1017-8, 1977.