

Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*

RAMAYO, L. G.¹; SOBA, M.G.¹; MUNDO, S.L.^{1*}

RESUMEN

La prueba de proliferación de linfocitos inducida por mitógenos *in vitro* se utiliza para evaluar la inmunidad celular. En el presente trabajo, se comparan los resultados obtenidos con el método tradicional, que utiliza linfocitos purificados para el cultivo y la captación de timidina tritiada como método de medición de la proliferación (LP- ³H), con otras dos metodologías: el uso de sangre entera con revelado por captación de timidina tritiada (SE-³H) y el uso de linfocitos purificados con revelado por ensayo colorimétrico con MTT (LP-MTT). Se trabajó sobre muestras de 12 caninos clínicamente sanos que fueron procesadas por las tres metodologías. Se utilizó Concanavalina A como mitógeno y el Índice de Estimulación (IE) como expresión de los resultados. El método de SE-³H arrojó valores de IE significativamente mayores que la técnica clásica, por lo que resultaría útil para evaluar la proliferación linfocitaria en caninos en nuestras condiciones de trabajo. El método de LP-MTT mostró valores de IE significativamente menores, por lo que se requieren más estudios para evaluar su posible uso en la medición de la funcionalidad linfocitaria. Sobre la base de los resultados obtenidos se estableció un rango normal de valores de IE para cada método.

Palabras clave: (inmunidad), (celular), (proliferación), (canino)

¹Área de Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. República Argentina. *Mundo, Silvia L. e-mail: smundo@fvet.uba.ar. Fax: 54-11-4524-8480.

Recibido: abril 2004 - Aceptado: noviembre 2004 - Versión on line: diciembre 2004

Evaluation of cellular immunity in dogs: *in vitro* lymphocyte proliferation test

SUMMARY

In vitro mitogen induced lymphocyte proliferation test is widely used for evaluation of cell-mediated immunity. In the present work, we compare the results of the traditional method, which uses gradient isolated lymphocytes as the source of cells for the culture and tritiated thymidine incorporation to measure proliferative response (LP-³H), with other two methods: culture of whole blood and proliferation measure with ³H- thymidine (SE-³H), and culture of isolated lymphocytes and proliferation evaluation with a colorimetric assay using MTT (LP-MTT). Blood samples of twelve adult, healthy dogs were processed by the three mentioned methods, using Concanavalin-A as mitogen and the Stimulation Index (SI) to express the degree of lymphoproliferation. The SI obtained by the SE-³H method were significantly higher than those of the traditional test, while those obtained by the LP-MTT method were significantly lower. These results show that the SE-³H method could be a suitable alternative to evaluate the lymphoproliferation in our laboratory conditions; it is required more research to evaluate if, in spite of the lower SI, the LP-MTT method could be suitable to evaluate lymphoproliferation in dogs. Based on the results obtained in this experience, we established a normal SI range for each method.

Key words: (cellular), (immunity), (proliferation), (dog)

INTRODUCCIÓN

La inmunidad de tipo celular constituye un mecanismo fundamental para la defensa del organismo. Esta respuesta, mediada por linfocitos T, es esencial para la protección contra patógenos intracelulares: virus, algunas bacterias, hongos y protozoarios ^{14, 23, 25}.

Su disfunción provoca infecciones debidas a estos microorganismos, que pueden llegar a comprometer la vida del animal. Además, dados los procesos de cooperación celular, también pueden resultar afectados los mecanismos de defensa frente a patógenos extracelulares ^{14, 23, 25}.

Debido a la importancia que tiene la acción de los linfocitos T en la defensa del organismo, se han desarrollado pruebas inmunológicas que permiten evaluar su funcionalidad.

La proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por mitógenos es la prueba más ampliamente

utilizada. Se basa en que ciertas lectinas, como la Concanavalina A, se unen a residuos hidrocarbonados de glucoproteínas de superficie de los linfocitos T caninos ¹², estimulando su proliferación policlonal ^{1, 2,5,14, 23, 25}.

En la clínica, esta técnica constituye una herramienta para el diagnóstico de las inmunodeficiencias de tipo celular, tanto primarias como secundarias ^{2,5,14,25}. En inmunología clínica experimental, resulta de gran utilidad para el estudio del efecto que los fármacos, productos biológicos (vacunas, inmunomoduladores) y agentes patógenos provocan sobre la respuesta inmune celular ^{7,16,18}.

El método tradicional para la prueba de linfoproliferación utiliza linfocitos purificados por gradiente de centrifugación como fuente de células para el cultivo y la captación de timidina tritiada como método de medición de la proliferación. Se fundamenta en que las células

en proceso proliferativo inducido por el mitógeno, incorporan la timidina marcada radioactivamente con tritio (^3H) como base para la síntesis del nuevo ADN; por lo tanto estima el número de células que están proliferando. El nivel de proliferación se evalúa en función del nivel de radioactividad alcanzado por las células en cultivo ^{1, 2, 14}.

Una variante de esta técnica la constituye el uso de sangre entera como fuente de linfocitos para el cultivo, manteniendo la marcación con ^3H timidina como método de medición de la actividad proliferativa ^{6, 14, 21}.

A esta variante en la fuente de células, se suman también variaciones en la metodología para medir la proliferación. Es el caso del cultivo de linfocitos purificados por gradiente con revelado de proliferación por ensayo colorimétrico con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Se fundamenta en la transformación de esta sal de tetrazolio, de color amarillo, en cristales de formazán de color azul por parte de enzimas mitocondriales de las células activas; mide, por lo tanto, el número total de células vivas ^{4, 17}.

Cada uno de los procedimientos descriptos presenta diferencias en lo que se refiere a la complejidad operativa, al tiempo que se obtienen los resultados, al costo y al requerimiento de equipamiento. El uso de sangre entera requiere pequeños volúmenes de muestra, es menos costoso y es de más rápida realización, pues no necesita reactivo ni centrifugación para formar gradiente. El revelado por ensayo colorimétrico evita el uso de sustancias radioactivas y requiere de un lector de placas, equipo más accesible que un contador de centelleo.

En caninos, al igual que en otras especies animales, está descripta la utilización de estas dos variantes de la prueba de linfoproliferación. Los resultados y las conclusiones acerca de la idoneidad de estas dos metodologías para evaluar la proliferación linfocitaria en comparación

con el método tradicional, varían entre las diferentes publicaciones ^{1, 6, 8, 21, 24}.

En nuestro laboratorio se realiza la evaluación de la linfoproliferación con el procedimiento tradicional y también se ha trabajado sobre las dos variantes metodológicas descriptas ¹⁹.

En el presente trabajo, se realiza un estudio de las tres diferentes metodologías de linfoproliferación sobre muestras de caninos sanos y se comparan sus resultados. Sobre la base de datos previos y de los obtenidos en esta experiencia se establece, para nuestras condiciones, un rango de valores normales de IE para cada método.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 12 caninos adultos, 8 hembras y 4 machos, de raza Beagle (8 animales), Labrador (1) y mestizos (3), clínicamente sanos al momento de la extracción, mantenidos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

Obtención de las muestras

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción de la vena yugular, usándose heparina como anticoagulante. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso, que siempre tuvo lugar antes de la hora de extraídas.

Procesamiento

Sangre entera (SE): La sangre heparinizada se diluyó 1/10 en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, gentamicina (60 mg/l) y 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol (medio RPMI completo). La concentración estimada de linfocitos, sobre la base de los datos obtenidos por hemograma, fue de 200.000 por ml.

Linfocitos purificados (LP): Los linfocitos se purificaron por centrifugación en gradiente de Hystopaque densidad 1077. Brevemente, se

centrifugó la sangre heparinizada, diluída al medio en PBS estéril pH 7,2, a 400 g durante 20 minutos. El halo enriquecido en células mononucleares se lavó dos veces en PBS y las células obtenidas se suspendieron en RPMI completo a la concentración indicada para cada método: 2.10^6 y 1.10^6 células por ml para los métodos LP- ^3H y LP-MTT, respectivamente. El uso de estas concentraciones celulares se basó en los resultados de pruebas previas de estandarización en las que se seleccionaron las condiciones que arrojaron mayores IE. Se realizó la determinación de viabilidad por tinción vital con azul tripán que resultó, en todos los casos, mayor del 95 %.

Condiciones de cultivo:

Se utilizó placas de cultivo de 96 hoyos fondo en U y medio RPMI completo como medio de cultivo.

Para cada muestra se sembraron 6 hoyos con 100 microlitros de sangre entera diluída (método SE- ^3H) y de suspensión de linfocitos purificados (métodos LP- ^3H y LP-MTT). A tres hoyos se les agregó 100 microlitros de medio de cultivo (hoyos controles) y a otros tres, 100 microlitros del medio de cultivo con el mitógeno (hoyos estimulados).

Se utilizó la Concanavalina A como mitógeno, a razón de 1 microgramo por hoyo.

La incubación se realizó en estufa a 37°C y 5 % de CO_2 durante 96 horas.

Revelado de la proliferación:

Captación de timidina tritiada: Tanto para SE como para LP, 16 horas antes de la finalización del cultivo, se agregó a cada hoyo, 1 microcurie de timidina tritiada (actividad específica 20.00 Ci/mmol). Las células luego se cosecharon con cosechador semiautomático, en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF- $^2\text{A}^2$). Una vez secos, los filtros se colocaron en viales plásticos con líquido de centelleo, midiéndose su nivel de radioactividad durante 3 minutos por muestra, en contador de centelleo líquido Beckman.

El Índice de estimulación de cada muestra

se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{IE} = \frac{\text{promedio de las cuentas por minuto (cpm) de los cultivos estimulados}}{\text{promedio de las cpm de los cultivos no estimulados}}$$

Revelado colorimétrico con MTT: 4 horas antes de la finalización del cultivo, se retiró 100 μl de sobrenadante de cada hoyo y se agregó 10 μl de una solución de 5 mg/ml de MTT. Luego se disolvieron los cristales de formazán mediante el agregado de 100 microlitros de alcohol isopropílico/CIH y agitación. Se midió la densidad óptica en un lector de placas a 570 nm.

El Índice de Estimulación de cada muestra se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{IE} = \frac{\text{promedio de la densidad óptica (do) de los cultivos estimulados}}{\text{promedio de la do de los cultivos no estimulados}}$$

Análisis estadístico:

La comparación de los valores de Índice de Estimulación se realizó utilizando la prueba t de Student para diferencia de medias de poblaciones con igual varianza.

RESULTADOS

Evaluación de los diferentes métodos

En la Tabla 1 se exponen los resultados obtenidos en las pruebas de linfoproliferación realizadas sobre las muestras de los 12 caninos normales. En ella se indican los promedios y desviaciones estándar de los IE obtenidos en cada uno de los métodos.

Se observa que los valores de IE son diferentes para cada metodología. El análisis estadístico indica que estas diferencias son significativas: Los valores de IE del método de SE- ^3H son significativamente mayores y los valores de IE del método LP-MTT resultan significativamente menores que el valor de IE del método tradicional.

La dispersión de los valores de IE es amplia, con coeficientes de variabilidad (CV) elevados.

Tabla 1: Valores de IE obtenidos para los diferentes métodos de evaluación de la linfoproliferación

Métodos de evaluación (a)	LP- ³ H	SE- ³ H	LP-MTT
Promedio +/- desvío estándar	20,46 +/- 9,64	50,25 +/- 24,18 *	2,38 +/- 0,76 *
Coefficiente de variabilidad	47.11	48.11	31.93

(a) Métodos de evaluación de linfoproliferación: LP-³H: linfocitos purificados-timidina tritiada, SE-³H: sangre entera-timidina tritiada, LP-MTT: linfocitos purificados-ensayo colorimétrico con MTT.

* diferencias significativas $p \leq 0.05$.

Tabla 2: Rango de valores normales de IE para cada método de evaluación de la linfoproliferación *in vitro*

Métodos de evaluación (a)	LP- ³ H	SE- ³ H	LP-MTT
Rango valores normales de IE	34,92 - 6,00	86,52 - 13,93	3,52 - 1,24

(a) Métodos de evaluación de linfoproliferación: LP-³H : linfocitos purificados-timidina tritiada, SE-³H: sangre entera-timidina tritiada, LP-MTT: linfocitos purificados-ensayo colorimétrico con MTT.

Determinación del rango

Los resultados obtenidos en esta experiencia se utilizaron para determinar un rango normal de valores de IE para cada metodología. Los altos valores de desvío estándar (S) observados en las pruebas realizadas no permitió utilizar 2S para el cálculo el rango, debido a que el valor inferior del mismo sería muy próximo a 1, que significa no-proliferación. Es por ello que se estableció como el promedio +/- 1,5 desviaciones estándar.

DISCUSIÓN

La comparación de los resultados muestra que el método de SE-³H tiene sensibilidad suficiente para medir la proliferación de linfocitos caninos, siendo sus valores de IE significativamente mayores que los correspondientes a la técnica clásica. Esta mayor reactividad coincide con el trabajo realizado en caninos por Shifrine et al ²¹. El método de SE-³H, también ha sido estudiado en otras especies animales ^{7, 13, 15}; en felinos, se indican IE mayores que los obtenidos con el método clásico ²².

Se postula que, si bien el uso de sangre entera no permite unificar el número de linfocitos en cultivo para todas las muestras, reproduce mejor las condiciones *in vivo* y, por evitar el gradiente de centrifugación, no provoca pérdida de poblaciones linfocitarias ni de células no linfoides que juegan un papel fundamental en la cooperación celular ^{14, 21}. Por otra parte, se ha estudiado el efecto que otras células sanguíneas presentes en la sangre tienen sobre la proliferación linfocitaria, observándose que los eritrocitos aumentarían la producción de citoquinas y acelerarían la proliferación celular ¹⁰.

El método de LP-MTT mostró menor sensibilidad respecto del método de LP-³H para evaluar la linfoproliferación, con valores de IE significativamente menores. Estos resultados coinciden con el trabajo realizado en caninos por Wagner et al ²⁴. Este método también ha sido utilizado en otras especies animales, con valores de IE que no superan un dígito ^{3, 9, 11}. En porcinos, algunos autores descartan su uso para la medición de la linfoproliferación debido a su baja sensibilidad ²⁰. Esta menor sensibilidad no se debe al uso de una menor concentración de

células utilizadas en el cultivo, dado que las pruebas previas de estandarización arrojaron IE mayores con las condiciones adoptadas. Wagner et al²⁴ explican esta observación por la dificultad de las células en captar el MTT cuando se encuentran en grandes concentraciones.

Dado que ambos métodos de revelado de la proliferación miden diferentes procesos biológicos, se sugiere que la menor sensibilidad detectada en los cultivos de linfocitos, en comparación con otro tipo de células, se debería a que los linfocitos contienen bajo nivel de las deshidrogenasas necesarias para la metabolización del MTT²⁴.

En el presente trabajo se utilizó el IE como expresión de los resultados, pues consideramos que es más representativo que el dato crudo de cpm o de do, pues tiene en cuenta el valor de los controles no estimulados, que en algunos animales es alto.

La dispersión de los valores de IE para los métodos de LP-³H y SE-³H obtenidos en esta experiencia es compatible con los trabajos previos realizados en este mismo laboratorio¹⁹ y los aportados por investigaciones de otros autores^{2,8,16,18,21,24}. Por otro lado, el menor valor de CV para el método de LP-MTT podría indicar que el proceso biológico evaluado por esta metodología resulta más estable.

Sobre la base de los resultados obtenidos se determinó un rango de valores normales de IE para cada metodología (Tabla 2). Todos los animales normales evaluados en la presente experiencia y en nuestros trabajos previos¹⁹ arrojaron valores de IE superiores al límite inferior de los rangos definidos. Tres muestras de caninos recibidas en nuestro laboratorio con sospecha clínica de inmunodeficiencia de tipo celular, dos procesadas por el método de LP-³H y una por el de SE-³H, arrojaron IE menores a 2, valor que está por fuera de los rangos normales establecidos. Consideramos que el estudio de

casos sospechosos de inmunodeficiencia celular permitiría ajustar con mayor precisión un valor de corte, objetivo que se ve dificultado por el bajo número de muestras recibidas, ya sea por baja casuística, falta de difusión de la prueba o el alto costo del estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que, en nuestro laboratorio, el método de SE-³H es un procedimiento sensible para la medición de la proliferación linfocitaria, pues resulta comparable y aún más reactivo que la técnica clásica. Por lo tanto, consideramos que puede reemplazar al uso de linfocitos purificados con la consecuente ventaja operativa y de costos.

La menor sensibilidad mostrada por el método de LP- MTT hace necesario continuar con su evaluación, tanto para su uso en inmunología clínica como experimental. En el primer caso, deben realizarse pruebas en caninos con inmunodeficiencias celulares para determinar si esta menor sensibilidad resulta suficiente para establecer una disfunción linfocitaria. En inmunología experimental, especialidad en la que usualmente se comparan resultados de dos grupos de animales (controles y tratados), se debe evaluar si, aun con bajos valores de IE, puede llegar a demostrarse, si las hubiera, diferencias de linfoproliferación entre grupos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Claudio Pacheco, Director del Área Caniles de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA y al personal del Área Riñón Experimental del Instituto Lanari de la UBA, por su desinteresada colaboración en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) BARTA, O, OYEKAN, P. 1981. Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 4 (2): 209-221.
- 2) BARTA, O; BARTA, V: Lymphocyte transformation test. En: Barta O (ed)- *Monographs in Animal Immunology, Veterinary Clinical Immunology Laboratory*. Bar-Lab, Inc.1993, Chapter B 4, pp B4-1 – B4-17.
- 3) BLAHOVEC, J; SOBEKOVA A. 2001. The optimization of the rapid colorimetric assay for the growth and proliferation of peripheral blood lymphocytes. *Folia Veterinaria* 45 (1): 35-38.
- 4) DENIZOT, F; LANG, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. of Immunological Methods* 89: 271-277.
- 5) FELSBURG, P J.1994 Jul. Overview of the immune system and immunodeficiency diseases. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Practice* 24 (4): 629-653.
- 6) FELSBURG, P J; REILLEY, M T; SINNIGEN, J K.1980. A rapid microtechnique for in vitro stimulation of canine lymphocytes using whole blood. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1: 251-262.
- 7) GREGORY, C R; SILVA, H T; PRATZ, J D, ET AL. 1998. Comparative effects of malononitriloamide analogs of leflunomide on whole blood lymphocyte stimulation in humans, rhesus macaques, cats, dogs and rats. *Transplant Proc.* 30: 1047-1048.
- 8) ISHIKAWA, H; MORI, K; SHIRAHATA, T. 1993. Application of the MTT colorimetric assay to measurement of blastogenesis in canine peripheral lymphocytes. *J. of the Japan Vet. Med. Ass* 46 (3): 241-245.
- 9) IWATA, H; INOUE, T. 1993. The colorimetric assay for swine lymphocyte blastogenesis. *J. Vet. Med. Sci* 55 (4): 697-698.
- 10) KALECHMAN, Y; HERMAN, S; GAFTER, U; SREDNI, B. 1993. Enhancing effects of autologous erythrocytes on human or mouse cytokine secretion and IL-2R expression. *Cell Immunol.* 148 (1) : 114-129.
- 11) KONDO, T; SUGIURA, T; KAMADA, T; IMAGAWA, H. 1996. Colorimetric assay of equine peripheral lymphocyte blastogenesis using MTT. *J. Equine Sci.* 7 (3): 63-66.
- 12) KRAKOWKA, S; RINGLER, S. 1986. Activation specificity of commonly employed mitogens for canine B and T lymphocytes. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 11: 281-289.
- 13) KYLES, A E; GREGORY, C R; CAIGMILL, A.L. August 2000. Comparison of the in vitro antiproliferative effects of five immunosuppressive drugs on lymphocytes in whole blood from cats. *Am. J. Vet. Res* 61 (8):906-909.
- 14) MARGNI, R A. *Inmunología e inmuoquímica*. 5º ed. Ed. Méd. Panamericana. 1996.
- 15) MARQUARD, T J; HEYMER, J; HEINZ, H; DEEGEN, E; ADOLF, G R; LEIBOLD W. 1992. Monitoring of effects induced by recombinant equine interferon-beta 1 in whole blood and separated fractions of peripheral blood of horses. *J. of Veterinary Medicine-Series B.* 5: 327-336.
- 16) MARTÍNEZ-MORENO, A; MORENO T; MARTÍNEZ –MORENO, F J; ACOSTA, I; HERNÁNDEZ, S. 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 48: 209-220.
- 17) MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immunological Methods* 65: 55-63.
- 18) NIMMO, W. 1991. In vitro lymphocyte stimulation by Concanavalina A and with histamina as a co-mitogen in dogs with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 28: 67-80.
- 19) RAMAYO, L; SOBA, M; MUNDO, S. 2003. Prueba de Linfoproliferación para el diagnóstico de Inmunodeficiencias de tipo celular en caninos. *Primeras Jornadas de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA.* 2 y 3 de octubre de 2003. Resumen publicado en *In Vet – Investigación*

- Veterinaria- 5 (1): 130.
- 20) REUBEL, G H; BAUERFEIND, R. 1989. On the suitability of the MTT-assay for the evaluation of mitogenic lymphocyte blastogenesis in swine. J. of Vet. Med.-B-Infectious Dis., Immunology, Food Hygiene , Vet. Public Health. 36 (1): 35-42.
 - 21) SHIFRINE, M; TAYLOR, N; ROSENBLATT, L; WILSON F. 1978. Comparison of whole blood and purified canine lymphocytes in a lymphocyte-stimulation microassay. Am. J. Vet. Res. 39 (4): 687-690.
 - 22) THAM, K M; WILKS, C R; STUDDERT, M J. 1982. Optimal conditions for in vitro blastogenesis of feline peripheral blood lymphocytes. Vet. Immunol. and Immunopathol. 3 (5): 485-498.
 - 23) TIZARD, I. Inmunología Veterinaria. 3º ed. Ed. Interamericana. 1984,
 - 24) WAGNER, U; BURKHARDT, E; FAILING, K. 1999. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. Vet. Immunol. and Immunopatho. 70: 151-159.
 - 25) WERNER, L L. Immunological diseases affecting internal organ systems. En: Ettinger S.J. (ed). Textbook of Veterinary Internal Medicine, vol. II. 2º ed. WB Saunders Co. Chapter 83, 1983, pág. 2158-2185.