

EVALUACIÓN DEL BIOENSAYO DE MTT PARA DETERMINAR LA PROLIFERACIÓN *in vitro* DE LINFOCITOS DE BOVINO FRESCOS Y CONGELADOS*

Carlos Ramón Bautista Garfias**
Elizabeth Acosta García**
Icela Ivonne Toledo García***

Abstract

Four experiments were carried out to evaluate the *in vitro* proliferation (expressed as stimulation index, SI) of fresh and/or frozen bovine lymphocytes to Concanavaline A (Con A) and/or *Anaplasma marginale* antigen using the MTT bioassay. In the first experiment, the SI of lymphocytes from three adult bovines in response to Con A was determined during six consecutive weeks using the MTT assay which showed reproducible results during this time. The SI oscillated between 1.7 and 3.8. In the second one, the lymphocytes from two adult bovines were frozen at -70°C during six weeks, and their viability was evaluated weekly. Mean viability changed from 99.5% (week 0) to 89% in week five, and dropped to 59% in the sixth one. In the third experiment, the SI of fresh and frozen (three weeks) lymphocytes from three adult bovines in response to Con A was evaluated using the MTT bioassay; the mean SI was of 2 and of 1.5 for fresh and frozen lymphocytes, respectively. In the fourth experiment, the proliferation of lymphocytes from one adult animal recovered from *A. marginale* infection, and those from one non infected adult bovine were tested against an *A. marginale* antigen determined by the MTT assay, and the H^3 -thymidine uptake test. The SI obtained was similar; 1.7 for the MTT and 1.5 for the H^3 -thymidine uptake. Results suggest that the MTT bioassay and frozen cells can be used as alternatives in the *in vitro* bovine lymphocyte proliferation test.

Key words: BOVINE LYMPHOCYTES, MTT BIOASSAY, *in vitro* LYMPHOCYTE PROLIFERATION

Resumen

Se llevaron a cabo cuatro experimentos para evaluar la proliferación *in vitro* (expresada como índice de estimulación, IE) de linfocitos de bovino, frescos y congelados, a concanavalina A (Con A) o antígeno de *Anaplasma marginale*, usando el bioensayo de MTT. En el primero, el IE de linfocitos de tres bovinos adultos en respuesta a Con A fue determinado durante seis semanas consecutivas usando el ensayo de MTT que mostró resultados reproducibles; el IE osciló entre 1.7 y 3.8. En el segundo, los linfocitos de dos bovinos adultos fueron congelados a -70°C durante seis semanas y su viabilidad fue evaluada semanalmente. La viabilidad promedio cambió de 99.5% (semana 0) a 89% en la semana cinco y disminuyó a 59% en la semana seis. En el tercero, el IE de linfocitos, frescos y congelados (tres semanas) de tres animales adultos, en respuesta a Con A, fue determinado usando el bioensayo de MTT; el IE promedio fue de 2 y de 1.5 para los linfocitos frescos y congelados, respectivamente. En el cuarto, la proliferación de linfocitos de un animal adulto recuperado de la infección con *A. marginale* y los de otro bovino adulto no infectado fueron probados contra un antígeno de *A. marginale* y determinada por medio

Recibido el 4 de marzo de 1999 y aceptado el 24 de enero del 2000.

* Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto Conacyt-SAGAR, número K0009-P9702.

** Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, km 11.5, carretera Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

***Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

de las pruebas de MTT y de incorporación de timidina- H^3 . El IE obtenido fue similar, 1.7 para MTT y 1.5 para Timidina- H^3 . Los resultados sugieren que el bioensayo de MTT y células congeladas pueden utilizarse como alternativas en la prueba de proliferación de linfocitos de bovino *in vitro*.

Palabras clave: LINFOCITOS DE BOVINO, BIOENSAYO DE MTT, PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS.

Introducción

El ensayo de proliferación de linfocitos o linfoproliferación (ELP) *in vitro* en respuesta a un mitógeno o a un antígeno específico, es uno de los métodos utilizados rutinariamente en medicina veterinaria para evaluar la inmunidad mediada por células en diversas especies de animales domésticos¹, incluyendo a los bovinos^{2,3}. Por lo regular, en este ensayo se utilizan linfocitos frescos y la técnica para determinar la proliferación celular es la incorporación de un isótopo radiactivo, generalmente la timidina tritiada (H^3)^{2,4,6}. Sin embargo, en muchas ocasiones es difícil llevar a cabo el ELP con linfocitos frescos cuando se colectan muestras de muchos animales en condiciones de campo; asimismo, esta técnica es muy sensible cuando se utilizan isótopos radiactivos pero tiene la desventaja de que éstos contaminan el ambiente, además se requiere de equipo costoso, de instalaciones particulares y de un permiso especial, para el caso de México, del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) con el propósito de manipular material radiactivo.

Por otra parte, la técnica colorimétrica rápida que emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT), que es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazan púrpura⁷⁻⁹, se ha utilizado en una variedad de ensayos que incluyen la cuantificación de linfocinas⁸, citotoxicidad, proliferación^{7,10,11} y activación celular^{9,12}.

Con base en su utilidad con linfocitos de humano y de ratón se propone, como hipótesis, que el ensayo colorimétrico de MTT es apropiado para evaluar la proliferación *in vitro* de linfocitos de bovino, frescos y congelados, en respuesta a un mitógeno o a un antígeno específico. En este sentido los objetivos del presente estudio fueron: 1) Evaluar el método de MTT con linfocitos frescos de bovino, 2) determinar la viabilidad de linfocitos de bovino congelados por seis semanas a $-70^{\circ}C$, 3) comparar el método de MTT con linfocitos de bovino frescos y congelados, 4) evaluar los métodos de MTT y de incorporación de timidina tritiada (H^3) en el ELP con linfocitos de un bovino inmune (a *Anaplasma marginale*) y de uno normal no infectado en presencia de un antígeno específico.

Material y métodos

Para alcanzar los objetivos propuestos, se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes. En el primero, se colectaron los linfocitos de sangre periférica (LSP) de tres bovinos adultos de 18-24 meses de edad, semanalmente durante seis semanas consecutivas para llevar a cabo el ensayo de linfoproliferación (ELP, expresado como índice de estimulación, IE) que fue evaluado por medio del método colorimétrico de MTT. En el segundo, los linfocitos de dos animales Holstein adultos de 18-24 meses de edad fueron congelados a $-70^{\circ}C$ y se determinó su viabilidad en las semanas 0 (linfocitos frescos), 1, 2, 3, 4, 5 y 6. El tercero se llevó a cabo con base en los resultados de los experimentos 1 y 2. En éste se evaluó el ELP con linfocitos, frescos y congelados durante tres semanas, de tres bovinos adultos de 18-20 meses de edad utilizando Con A y el bioensayo de MTT. En el cuarto, el ELP se efectuó con linfocitos de dos bovinos adultos: uno recuperado de la infección con *Anaplasma marginale* y otro normal no infectado (ambos de 18 meses de edad). De cada animal una serie de linfocitos se expuso a antígeno de *A. marginale*, otra a Con A y una más a un antígeno de membranas de eritrocitos normales no infectados. El IE se determinó por medio de los métodos colorimétrico de MTT y de incorporación de timidina H^3 .

Obtención de linfocitos de sangre periférica (LSP)

Para el ELP los LSP fueron colectados en tubos Vacutainer^{MR} conteniendo heparina; posteriormente, en condiciones de esterilidad, a 5 ml de solución salina balanceada de Hank (SSBH, sin

Ca⁺⁺ y Mg⁺) contenidos en una jeringa de 10 ml se le adicionaron y mezclaron 5 ml de la muestra sanguínea (v/v), luego los 10 ml de la mezcla se depositaron cuidadosamente en un tubo cónico estéril de centrífuga conteniendo 5 ml de una solución con un gradiente de densidad de 1.077 proporcionado por una mezcla de metrizoato de sodio al 9.6% (p/v) y ficol al 5.6% (p/v) * y se centrifugó a 800 g a 10° C durante 20 min, al término de los cuales se colectaron los linfocitos de la interfase y se transfirieron a otro tubo estéril conteniendo 10 ml de SSBH; a continuación se centrifugó a 450 g a 20°C durante 10 min, descartando después el sobrenadante, esta operación se repitió dos veces más.

Congelación de linfocitos

El método de congelación consistió en una modificación del de Gale *et al.*³: después de separar los LSP, éstos fueron suspendidos en 0.1 ml de RPMI1640 a una concentración de 6×10^7 células/ml y colocados en un criotubo, inmediatamente se les adicionó 90% (0.9 ml) de suero fetal bovino (SFB) y 10% (0.1 ml) de dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se congelaron a -70° C en vez de N₂ líquido. Para descongelar, las células se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min y luego se centrifugaron a 800 g durante 10 min a 10°C; después se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en RPMI1640, ajustando las células a la concentración deseada.

Ensayo de linfoproliferación (ELP)

Se siguió el método de Gasbarre *et al.*² con modificaciones. Brevemente, una vez que los LSP fueron obtenidos, éstos fueron suspendidos en 0.1 ml de RPMI1640* suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina (200 UI/ml), estreptomycin (200 µg/ml), HEPES (2.38 g/l), 2-mercaptoetanol (50 µM), bicarbonato de sodio (27 mM) y 10% de suero fetal bovino. En microplacas de fondo plano de 96 pozos **, para cada animal se sembraron por triplicado (5×10^5 linfocitos frescos/pozo o 1×10^6 linfocitos descongelados/pozo de acuerdo con Gale *et al.*³) con una viabilidad > 90%. Ésta se determinó adicionando azul de tripano al 0.4% a la suspensión de linfocitos que posteriormente fueron contados en una cámara de Neubauer. El número de linfocitos vivos se dividió entre el número total de linfocitos y luego se multiplicó por 100. Posteriormente, dependiendo del experimento, a una serie de linfocitos se le añadió concanavalina A* (10 g/pozo) y a otra no (experimentos uno y tres); además (experimento cuatro) otra serie fue expuesta a antígeno de *Anaplasma marginale* (20 g/pozo)** y una más a antígeno de membranas de eritrocitos normales no infectados de bovino (20 g /pozo). Luego las placas fueron incubadas durante siete días en una estufa conteniendo una atmósfera humidificada de 5% CO₂, 5% N₂ y 90% aire. La concentración óptima de Con A fue determinada previamente probando 2.5, 5, 10, 20 y 40 g del mitógeno/pozo con la cantidad de linfocitos frescos anteriormente señalada.

Método colorimétrico de MTT

Se utilizó el método descrito por Mosmann⁷: Después de haber incubado los LSP, a cada pozo de la placa se le añadieron 20 µl de MTT (5 mg/ ml de RPMI1640)/pozo y se incubó en la misma estufa durante 60 min más; posteriormente las placas fueron centrifugadas a 800 g durante 10 min a 10°C y se descartó el sobrenadante. Luego se adicionaron 300 µl de DMSO/pozo, para hacer liposolubles las células, y se efectuó la lectura de la placa en un lector de ELISA *** a una densidad óptica (DO) de 570 nm. Los resultados fueron registrados para determinar el índice de estimulación (IE) dividiendo la D.O. de los linfocitos expuestos a la Con A, antígeno de *A. marginale* o al antígeno de eritrocitos normales entre la DO de los linfocitos no expuestos. Se consideró como positivo un IE igual o mayor a 1.5 ¹³.

* Lymphoprep^{MR}, Nycomed, Noruega.

* Sigma, Missouri, Estados Unidos de América.

** Nunc, Dinamarca.

* Con A, Sigma, Missouri, Estados Unidos de América.

** Proporciónado por M.A. García Ortiz, CENID-PAVET, INIFAP-SAGAR.

*** Multiskan II, Finlandia.

Incorporación de timidina tritiada (H^3)*

Se llevó a cabo de acuerdo a Gale *et al.*³ A los seis días de incubación de los LSP, a cada pozo se le adicionó metil-timidina H^3 * en 25 μ l de PBS conteniendo 0.026 MBq (18 h antes de la cosecha de las células). Posteriormente, los linfocitos fueron colectados sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF-A) y se contó inmediatamente la incorporación de la timidina H^3 después de añadir 3 ml de líquido de centelleo (PPO-tolueno, 0.4%) a cada vial de vidrio (una muestra/vial). Las muestras luego se analizaron en un contador de centelleo y la proliferación celular inducida, se expresó como cuentas por minuto (cpm) (3). El IE se determinó dividiendo las cpm de los linfocitos expuestos a la Con A, antígeno de *A. marginale* o al antígeno de eritrocitos normales entre las cpm de los linfocitos no expuestos. Se consideró como positivo un IE igual o mayor a 1.5¹³.

Al terminar el estudio, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza conforme al diseño empleado. Las diferencias estadísticas al 5% o al 1% entre tratamientos, se compararon con la prueba de Tukey¹⁴.

Resultados

En el experimento 1, el promedio del índice de estimulación, determinado por el bioensayo de MTT, se mantuvo por arriba de 1.5, considerado como positivo, durante las seis semanas. Los valores promedio más bajo y más alto se observaron en las semanas dos (1.7) y cuatro (3.8), respectivamente, con un promedio general de 2.6. El IE de la semana cuatro presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a los IE de las semanas cero, uno, dos y tres (Cuadro 1).

En el experimento 2, el porcentaje de viabilidad celular durante las primeras cinco semanas de congelación fue semejante al de los linfocitos frescos (semana 0); sin embargo, ocurrió una disminución significativa de éste ($P < 0.01$) en la semana seis (Cuadro 2).

En el experimento 3, al comparar el IE de linfocitos, frescos y congelados (tres semanas) de los mismos animales, expuestos a Con A, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

En el experimento 4 no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en cuanto a los IE obtenidos con linfocitos de bovino inmune o normal expuestos a un antígeno de *A. marginale* y determinados por los métodos de MTT y de timidina H^3 (Cuadro 4). Cabe señalar que los IE obtenidos con antígeno de eritrocitos normales de bovino fueron de 0.8 y 0.6 para el animal inmune y de 0.9 y 0.7 para el no inmune, con MTT y con timidina H^3 , respectivamente (datos no mostrados).

Discusión

Los datos obtenidos en el experimento 1, indican que el ensayo de incorporación de MTT en células viables de bovino se comporta de manera similar a lo que ocurre con células de otros mamíferos^{7, 9, 10}, además de ser relativamente fácil de efectuar y de proporcionar resultados rápidos y consistentes. Con respecto a la diferencia observada en la semana cuatro, en la que ocurrió el mayor índice de estimulación en los tres animales (Cuadro 1), probablemente se debió a que en esa semana en particular, se abrió un nuevo tanque con la mezcla de gases que proporcionó una mayor cantidad de éstos con respecto a las otras semanas, favoreciendo así la proliferación celular. Cabe señalar que los índices de estimulación obtenidos en todas las semanas fueron superiores a 1.5 que se consideran como positivos¹³. Además debe tomarse en cuenta que la respuesta inmune normal de los bovinos varía a diferentes tiempos¹⁵ y de que existe una variación marcada en la respuesta blastogénica normal *in vitro* de los linfocitos de bovino en respuesta a un mitógeno¹⁶.

* 185 GBq-nmol, Amersham, Inglaterra.

Los resultados del experimento 2 indican que la viabilidad de los linfocitos de bovino mantenidos a -70°C disminuye 11% después de cinco semanas, sin que se aprecie diferencia significativa con respecto a la viabilidad de los linfocitos frescos; sin embargo, esta última baja hasta 41% en la sexta semana de congelación. Los resultados sugieren que la viabilidad de los linfocitos congelados a -70°C hasta durante cinco semanas es aceptable.

Los datos del experimento 3, llevado a cabo con base en los resultados de los ensayos dos y tres, indican que la proliferación (expresada como índice de estimulación) de linfocitos de bovino, frescos y congelados durante tres semanas a -70°C , en respuesta a un mitógeno y determinada por medio de la incorporación de MTT, es similar. Arbitrariamente se decidió utilizar linfocitos congelados a -70°C por tres semanas, considerando que la viabilidad celular todavía es adecuada (sin llegar al límite de cinco semanas en congelación) y de que es un tiempo aceptable para colectar muchas muestras sanguíneas en el campo, separar los linfocitos, congelarlos y finalmente llevar a cabo el ensayo de linfoproliferación en el laboratorio. En otros estudios, se ha informado que la blastogénesis *in vitro* de linfocitos de bazo de bovino, frescos y congelados en nitrógeno líquido, es comparable³.

En el experimento 4 se observó que los resultados de la determinación de la proliferación de linfocitos (expresada como índice de estimulación) de un bovino inmune a *A. marginale*, por medio de las técnicas colorimétrica de MTT y de incorporación de Timidina H³, son similares, pero con la ventaja de que la primera es más rápida y de que no requiere del uso de radioisótopos, ni de equipo costoso como la segunda.

Con base en los resultados anteriores, se concluye que el método de incorporación de MTT es adecuado para usarse en la determinación de la proliferación de linfocitos de bovino, frescos o congelados hasta por tres semanas a -70°C .

Se sugiere, por lo tanto, utilizar dicha técnica como una alternativa, relativamente económica y de fácil ejecución, con el propósito de evaluar la proliferación de linfocitos de bovino en diferentes enfermedades, en respuesta a antígenos específicos.

Referencias

1. Kristensen F, Kristensen B, Lazary S. The lymphocytes stimulation test in veterinary immunology. *Vet Immunol Immunopathol* 1982;3:203-277.
2. Gasbarre LC, Romanowski RD, Douvres FW. Suppression of antigen- and mitogen-induced proliferation of bovine lymphocytes by excretory-secretory products of *Oesophagostomum radiatum*. *Inf Immun* 1985;48:540-545.
3. Gale KR, Gartside MG, Dimmock CM, Zarkzewski H, Leatch G. Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. *Parasitol Res* 1996;82:551-562.
4. Bautista CR, Garrido M. Efecto mitogénico de los antígenos somático y de excreciones/secreciones de *Fasciola hepatica* adulta en linfocitos normales de ratón BALB/c. *Téc Pecu Méx* 1995;33:25-28.
5. Gottshall SL, Hansen PJ. Enhancement of mitogen-induced lymphocyte proliferation in sheep. *Zentralbl Veterinärmed (B)* 1994;41:541-547.
6. Kostro K, Wiktorowicz K. Comparative studies on *in vitro* mitogen-induced proliferation of peripheral blood lymphocytes in dog and breeding fox. *Acta Vet Hung* 1992;40:39-45.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
8. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth lymphokines. *J Immunol Methods* 1984;70:257-268.
9. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986;94:57-63.
10. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *J Immunol Methods* 1990;131:165-172.
11. Visconti A, Minervini F, Lucivero G, Gambatesa V. Cytotoxic and immunotoxic effects of *Fusarium* mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia* 1991;113:181-186.
12. Minervini F, Lucivero G, Visconti A, Botalico C. Immunomodulatory effects of fusarochromanones TDP-1 and TDP-2. *Nat Toxins* 1992;1:15-18.
13. Morilla A. Transformación blastoide o incorporación de timidina tritiada. En: Morilla A, Bautista GCR, editores. *Manual de inmunología*. México (DF): Diana, 1986:351-361.
14. Snedecor WG, Cochran GW. *Statistical methods*. 6th ed. Ames (IO): The Iowa State University Press, 1971.
15. Mzee RM, Braend M. Seasonal variation of bovine anti-J in the tropics. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1979;10:137-140.
16. Ojo-Amaize EA, Guidry AJ, Paape M, Mayer HK. *In vitro* depression of bovine lymphocyte function by treatment of cultured bovine lymphocytes with physiologic concentrations of hydrocortisone. *Am J Vet Res* 1988;49:851-855.

Cuadro 1

ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS DE TRES BOVINOS EXPUESTOS A CON A DURANTE SEIS SEMANAS CONSECUTIVAS, DETERMINADO POR MEDIO DEL BIOENSAYO DE MTT

Bovino número	Semana						Promedio
	0	1	2	3	4	5	
1	2.6	1.7	1.8	1.7	3.6	2.2	2.3 ± 0.7
2	2.0	2.9	2.1	2.9	4.0	3.0	2.8 ± 0.7
3	2.1	3.0	1.3	1.3	3.9	3.9	2.7 ± 1.0
Promedio	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.7	1.7 ± 0.4	2.8 ± 1.1	3.8 ± 0.2*	2.5 ± 0.5	2.6

* P < 0.05 con respecto de las semanas 0, 1, 2 y 3

Cuadro 2

PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LINFOCITOS DE BOVINO CONGELADOS A -70 C Y DESCONGELADOS DESPUÉS DE VARIAS SEMANAS*

Bovino número	Semana						
	0	1	2	3	4	5	6
1	99	95	100	85	96	89	63
2	100	100	94	92	91	89	55
Promedio	99.5 ± 0.7 ^a	97.5 ± 3.5 ^a	97.0 ± 4.2 ^a	88.5 ± 4.9 ^a	93.5 ± 3.5 ^a	89 ± 0 ^a	59 ± 5.6 ^b

* Valores con distinta literal indican diferencia estadística (P < 0.01).

Cuadro 3

COMPARACIÓN DEL ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN LINFOCITOS DE BOVINO, FRESCOS Y CONGELADOS POR TRES SEMANAS, EXPUESTOS A CON A, DETERMINADO POR MEDIO DEL BIOENSAYO DE MTT*

<i>Bovino número</i>	<i>Linfocitos</i>	
	<i>Frescos</i>	<i>Congelados</i>
1	1.2	2.0
2	2.1	1.5
3	2.7	1.1
Promedio	2.0 ± 0.75	1.5 ± 0.45

* No se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre linfocitos frescos y congelados

Cuadro 4

ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS DE BOVINO EXPUESTOS A UN ANTÍGENO DE *Anaplasma marginale* DETERMINADO POR UN ENSAYO COLORIMÉTRICO (MTT) Y UNO RADIATIVO (TIMIDINA H^3)*

<i>Condición del bovino</i>	<i>Ensayo</i>	
	<i>MTT</i>	<i>Timidina tritiada (H^3)</i>
Inmune	1.7	1.5
No inmune	1.0	1.0

* El índice de estimulación con antígeno de eritrocitos normales fue de 0.8 y 0.6 para el inmune y de 0.9 y 0.7 para el no inmune con MTT y timidina H^3 , respectivamente.