

COMPARACIÓN DE LA LINFOPROLIFERACIÓN Y CULTIVO CELULAR MEDIANTE EL BIOENSAYO COLORIMÉTRICO DE (MTT) EN CERDOS PELÓN MEXICANO Y F1 YORKSHIRE X LANDRACE.

Guerrero-Quiroz LA ^{*1}, Taylor-Preciado JJ², Galindo-García J¹, Avila-Figueroa D³, Sánchez-Chiprés DR¹,
Roa-Vidal JJ³, Ayala-Valdovinos MA¹, Moreno-Martínez J³, Merlos-Barajas TM¹.

¹Instituto de Biotecnología Animal, ²Departamento de Producción Animal, Departamento de Medicina Veterinaria ³CUCBA, Universidad de Guadalajara.

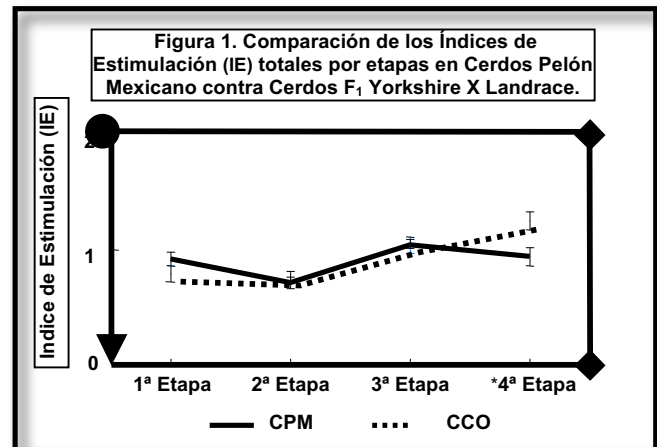
lguerre@cucba.udg.mx

Introducción. Los linfocitos “T” desempeñan un papel central en la respuesta Inmune específica contra diversos patógenos.⁸ La transformación blastoide es usada como medición estándar de la respuesta linfocitaria de los linfocitos “T” mediante un coeficiente referido denominado índice de estimulación (IE).² Para la determinación colorimétrica de la síntesis de ADN celular se utiliza la sal de tetrazolium (MTT) que al ser clivada por las mitocondrias activas, vira del color amarillo a un producto (formazán) soluble en HCl-isopropanol que es de color azul y puede ser detectado en un lector de Elisa a 570nm.⁴ Este ensayo provee un método simple para detectar células vivas creciendo, sin el uso de la radiactividad.⁴ El objetivo del presente estudio fue comparar la respuesta Inmune Celular de Cerdos Pelón Mexicano (CPM) y Cerdos F₁ Yorkshire x Landrace (CCO) a través de la proliferación de Linfocitos “T” mediante el cultivo celular usando de la sal de tetrazolium (MTT) en cuatro etapas diferentes: 1. Antes del destete, 2. Después del destete, 3. Después de la vacunación y 4. Maduración Inmunológica a los 28, 32, 45 y 60 días de edad respectivamente.

Material y Métodos. Se analizaron 12 muestras de plasma de CPM (6 hembras y 6 machos) y 12 de CCO por etapas. Por medio del ensayo de linfoproliferación y con la aplicación del estímulo mitogénico de fitohemaglutinina (PHA) con las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL, se caracterizó, el estado funcional de linfocitos “T” en sangre periférica de los cerdos con la aplicación en el cultivo celular de la sal de tetrazolium (MTT) método descrito por Mosmann,⁴ Los lechones se alimentaron de sus madres durante un período de 30 días, después se realizó el destete y se les proporcionó alimento peletizado a libre acceso durante las siguientes tres semanas con 21% de proteína, los animales machos fueron castrados y vacunados a los 40 días de nacidos con la vacuna triple (Bordetella, erisipela y pasteurella). En el análisis estadístico se realizó un análisis de Prueba de “t” para dos muestras suponiendo varianzas iguales, las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas significativas. Los resultados se graficaron conforme a la media y error estándar.

Resultados. Se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza sólo con la aplicación de PHA 10 donde los Cerdos Pelón Mexicano en la etapa 1 obtuvieron mayores Índices de estimulación que los Cerdos F₁ Yorkshire X Landrace con $p < 0.01$ y menores Índices de estimulación en la etapa 4 con $p < 0.005$. Sin embargo, los Índices de estimulación mayores fueron obtenidos con la aplicación de PHA 5, seguidos por la aplicación de PHA 20, no encontrándose diferencias significativas en el análisis de varianza entre ellos en ninguna de las etapas.

Con referencia al Índice de Estimulación (IE) solo se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza en la etapa 4 donde los Cerdos F₁ Yorkshire X Landrace obtuvieron mayores promedios con $p < 0.01$ (Fig 1).



4ª Etapa CPM vs. *CCO *promedios mayores

Anova significativo con $p < 0.01$.

Discusión. Los reportes que se tienen sobre la dosis óptima en el humano, es de PHA 10³, en este estudio se encontró que la dosis óptima fue de 5µg/mL datos que coinciden con los encontrados por Green et al., 2002¹ y Peters and Veerkamp, 1982⁵, ya que el cerdo es un mamífero al igual que el humano y quizá proceden de un tronco común a escala evolutiva⁷, por lo que se piensa que la PHA actúa en los linfocitos porcinos de modo similar que en el ratón y en el humano, uniéndose a los receptores N-acetil-D-galactosamina presente en las células “T”. Por otro lado las diferencias encontradas en la cuarta etapa con la aplicación de PHA 10 sugieren que los Cerdos F₁ Yorkshire X Landrace desarrollan una mayor capacidad de defensa en esta etapa, existiendo un incremento importante de células, probablemente producidas por diferentes factores entre los que se encuentran la maduración inmunológica, la exposición de antígenos del ambiente y la disipación de sustancias inmunosupresoras como el cortisol.⁸

Referencias citadas. ¹Green, K.J., et al., 2002. *Journal of Applied Physiology*, **92**: 2390-2395. ²Jakoby, W.B. and Pastan I.H. 1979. *Methods in Enzymology*, pp. 466-477. ³Morgan S.J. and Darling, D.C. 1993. Edit. Acricbia Zaragoza España po.41-45. ⁴Mosmann, T.1983. *J. Immunol Methods*, **65**:55-63. ⁵Peters, G.J. and Veerkamp, J.H. 1982. *Immunology and Immunopathology*, **3**: 295-300. ⁶Robles, A. 1998. *Porcivama* **5**: 59 pp. 12-16. ⁷Roiit, M.I. and Brostoff, J. 1996. *Immunology*. 4ª Edición. Academia Press London. ⁸Saalmüller, A. 1998. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* **17**: (1), 71-73.