

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LA ESPECIE BOVINA

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

MANUEL ANDRÉS MORONI RODRÍGUEZ

VALDIVIA – CHILE

2002

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Hugo Folch V.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Fernando Wittwer M.

Dr. Rafael Burgos A.

FECHA DE APROBACIÓN:

16 de octubre del 2002.

ÍNDICE.

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN	32
7. BIBLIOGRAFÍA	35
8. ANEXOS	38

1. RESUMEN.

El sistema inmune cuenta con múltiples poblaciones y subpoblaciones linfocitarias, las cuales participan en la respuesta inmune de diferentes formas. Estas subpoblaciones linfocitarias permanecen relativamente estables durante la vida del animal. En los rumiantes la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta^+$ representa un caso especial, ya que disminuye a medida que el animal envejece. Existe bastante información acerca de la variación de diferentes subpoblaciones de linfocitos en animales con diferentes patologías, principalmente en enfermedades infecciosas, que indican cuál es la población de linfocitos que está actuando en la defensa del animal o cual población esta siendo afectada por el patógeno causante de la infección.

En el presente trabajo se analizaron los porcentajes de diferentes subpoblaciones de linfocitos circulantes en bovinos sin alteraciones clínicas. Para el efecto se usaron animales de tres rangos de edad: animales jóvenes (15 a 30 días), púberes (6 a 9 meses) y animales adultos (4 a 8 años). Los linfocitos fueron aislados mediante un gradiente de densidad discontinuo de Ficoll-Hypaque, descrito para sangre humana y adaptando por nosotros a la sangre del bovino. Para identificar cada población y subpoblación de linfocitos bovinos se estandarizó una técnica de inmunocitoquímica para cada uno de los anticuerpos específicos usados, con lo que se pudo obtener bajo el microscopio de luz los porcentajes promedio de cada subpoblación en estudio.

Los resultados muestran que existen variaciones en algunas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias a lo largo de la edad. Por ejemplo los linfocitos T ($CD3^+$) presentan una disminución en la pubertad respecto a los otros rangos de edad, esto podría deberse a variaciones hormonales durante la pubertad, y en los linfocitos B (IgG^+) que al contrario de los linfocitos T ($CD3^+$), aumentan en los animales de esta misma edad. Los linfocitos T $CD8^+$ mantuvieron su porcentaje relativo sin variación a las edades estudiadas, mientras que los linfocitos T $CD4^+$ mostraron un pequeño aumento en los animales adultos. La población de linfocitos T $\gamma\delta^+$ mostró una disminución notable a medida que avanza la edad. El significado de este particular cambio en esta subpoblación linfocitaria aún no es bien comprendido.

Dada la escasa dispersión obtenida en el presente, podemos afirmar que la técnica empleada y los valores obtenidos para las diferentes subpoblaciones linfocitarias del bovino podrían ser de gran utilidad para el futuro y tal vez ser considerados como valores locales de referencia en el caso de estudios de bovinos afectados por alguna patología ó para investigaciones posteriores interesadas en alguna subpoblación en particular.

Palabras claves: Subpoblaciones linfocitarias, CD3, CD4, CD8, $\gamma\delta$, IgG, bovinos.

2. SUMMARY.

The immune system displays several populations and subpopulations of lymphocytes, that participate in different forms in the immune response. These subpopulations are relatively stable during the animal's life. The ruminants, in this respect are a special case, since the $\gamma\delta^+$ T lymphocyte's subpopulation decreases with aging. There is some information about changes of one or more subpopulations of lymphocytes under pathological conditions, mainly infections, indicating which type of lymphocytes are activated or which population has been affected by the pathogen.

In this study, the percentage more relevant subtypes of T cells ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ and $\gamma\delta^+$) as well as on B cells (IgG^+), was determined at different ages in normal bovines, whether they undergo age-related changes. In order to accomplish this objective peripheral blood samples were obtained from healthy animals, belonging to three age ranges: newborns (15-30 days-old), puberty (6-9 months-old) and adults (4-8 years-old). The lymphocytes were isolated by a Ficoll-Hypaque discontinuous density gradient, modified for bovine blood. To identify the different types of lymphocytes, an immunocytochemical method, using specific antibodies for each bovine subpopulation of lymphocytes was standardized. The percentage of the different subpopulations of lymphocytes was determined under a light microscopy.

The results shown that variations in some lymphocyte subpopulations age related exist. For example the T cells population exhibits a significant decrease during puberty, in contrast to the (IgG^+) B cells display an increase in the same age. This situation might derive from hormonal changes taking place during puberty. No change was observed in the percentages of $CD8^+$ T lymphocytes, $CD4^+$ T lymphocytes, showed increased levels during adulthood, and the $\gamma\delta^+$ T cells subpopulation display the expected profile for ruminants, a strong decrease with aging. The meaning of this particular change is not well understood at the present.

Taking in account the scarce dispersion, obtained here for the different bovine lymphocyte's subpopulations, these results may be a useful reference tool for future related work, or a basic knowledge for future investigations in any particular lymphocyte subtype.

Keywords: Lymphocyte subpopulations, CD3, CD4, CD8, $\gamma\delta$, IgG, bovines.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. EL SISTEMA LINFOIDE.

El sistema inmune, tanto el innato o natural como el específico o adquirido, cuenta con varios órganos que dan origen a diferentes poblaciones de células que cooperan en la defensa y protección del organismo, es el caso de los granulocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los agranulocitos mononucleares (monocitos y linfocitos) (Dellmann, 1993). De estos últimos destacan los linfocitos, los cuales juegan el papel de mayor importancia en la generación de la respuesta inmune específica.

3.1.1. Origen de las células linfoides.

Las células del sistema inmune tienen su origen en los órganos linfoides, que se dividen en dos tipos:

a.- Los órganos linfoides primarios (médula ósea, timo y la “bursa de Fabricio” (sólo en aves)), tienen por función la producción y diferenciación de los linfocitos.

b.- Los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas como son las tonsilas y las placas de Peyer), tienen por función la estimulación antigénica de los linfocitos, por lo que participan directamente en la respuesta inmune (Dellmann, 1993; Palomo y col. 1998; Folch y col. 2000).

Como principal órgano linfoide primario se destaca la médula ósea que da origen a toda la línea hematopoyética. La médula ósea contiene a las células troncales o células madres, las cuales son pluripotenciales y pueden dar origen a toda la línea de células sanguíneas. A medida que aumenta la edad del animal la médula ósea roja es reemplazada por médula amarilla quedando restringida al esternón, vértebras, costillas, huesos del cráneo, pelvis y epífisis de los huesos largos (Dellmann, 1993). El otro órgano primario es el timo, que se ubica en el espacio mediastínico torácico anterior por sobre los grandes vasos del corazón, extendiéndose en el caso de los rumiantes hacia la región del cuello. En el recién nacido presenta gran tamaño, y va disminuyendo a medida que se acerca la pubertad quedando en el adulto solo remanentes de este órgano (Shively, 1993; Gershwin y col. 1995). Durante la gestación el timo recibe linfocitos inmaduros derivados de la médula ósea (células pre-T), los cuales proliferan y maduran a linfocitos T, sufriendo al mismo tiempo un proceso de selección donde la mayoría muere por apoptosis dentro del timo; la población sobreviviente (un 25% en caso de los bovinos) migra posteriormente a la periferia para colonizar los órganos linfoides secundarios (Tizard, 1998). Un órgano linfoide primario propio de las aves es la “bursa de Fabricio”, esta tiene una forma sacular y se ubica en la porción dorsal y terminal de la cloaca. Su función es permitir la maduración, diferenciación y selección de las células inmaduras pre-B que provienen de la médula ósea que pasarán a ser linfocitos B. El 95 al 99% de los linfocitos de la “bursa” mueren por apoptosis, y el resto es liberado a la circulación para que colonicen los órganos linfoides secundarios (Tizard, 1998).

Su rol fue descrito por Glick y col. en 1956, permitiendo de esta forma contar con un modelo en que se demostró que la maduración de los linfocitos B y de los linfocitos T eran totalmente separados (Glick y col. 1956).

Las placas de Peyer son clasificadas como órganos linfoides secundarios. En el caso de los rumiantes se han diferenciado dos tipos de placas, las placas de Peyer yeyunales y las placas de Peyer ileocecales (Tizard, 1998). Las placas yeyunales permanecen durante toda la vida del animal y en su interior tienen linfocitos B (alrededor de un 70%) y linfocitos T (alrededor de un 30%), lo que las clasificaría como un órgano linfoide secundario (Tizard, 1998); por el contrario, las placas de Peyer ileocecales alcanzan su mayor tamaño antes del nacimiento para posteriormente desaparecer. Estas placas de Peyer ileocecales reciben desde la médula ósea linfocitos pre-B, que aquí se diferencian, maduran y sufren un proceso de selección similar al observado en la ‘bursa de Fabricio’, después de esto las células sobrevivientes salen a la periferia para poblar órganos linfoides secundarios (Dellmann, 1993). Debido a las características antes mencionadas las placas de Peyer ileocecales se clasifican como órganos linfoides primarios (Tizard, 1998). Diferencias similares entre las placas de Peyer también se observan en el cerdo (Parkhouse, 1996).

En cuanto a los órganos linfoides secundarios, tenemos en primer termino al bazo que se ubica adyacente a la pared abdominal izquierda. El parénquima del bazo está dividido en dos componentes: a) la pulpa roja donde ocurre el almacenamiento de glóbulos rojos y b) la pulpa blanca que posee áreas B y áreas T donde ocurre la respuesta inmune. Este órgano tiene varias funciones: filtración de la sangre; eliminación de antígenos (bacterias, hongos, parásitos o virus); destrucción de glóbulos rojos envejecidos; almacenamiento de eritrocitos y plaquetas y en animales adultos la linfopoyesis. En segundo término están los nódulos linfáticos que se encuentran en un número variable y en zonas estratégicas en que convergen los vasos linfáticos de determinadas regiones del organismo. Su función es la filtración de la linfa, la captura de antígenos y como son órganos linfáticos secundarios producir la respuesta inmune. En tercer lugar están las tonsilas que son tejidos linfoides asociados a la mucosa de la región faríngea. Debido a su ubicación toman contacto con antígenos que ingresan por la vía aérea u oral. Con respecto a la población de linfocitos que la forman entre un 40 a 50% son células B y el resto células T (Palomo y col. 1998).

3.1.2. Células del tejido linfoide.

Desde el punto de vista inmunológico las células más importantes del tejido linfoide son los linfocitos, pequeñas células de forma redonda cuyo tamaño fluctúa entre 7 y 15 micras de diámetro, dependiendo de su estado de activación. Su núcleo redondo, con cromatina muy condensada; el citoplasma supera por muy poco al núcleo apareciendo como una delgada capa casi imperceptible si se observa al microscopio óptico. Los linfocitos circulantes varían en porcentaje con respecto a los leucocitos totales según la especie: caninos entre un 12 a 30%, felinos entre un 20 a 55%, porcinos entre un 39 a 62%, equinos entre un 15 a 50%, caprinos entre un 50 a 70%, ovinos entre un 40 a 75% y bovinos entre un 45 a 75% (Feldman y col. 2000), en ratones y ratas el porcentaje está entre un 60 a 70% (Dellmann, 1993). Los linfocitos tienen su origen en la médula ósea hematopoyética, pero maduran y proliferan en los distintos órganos linfoides para dar origen a dos subpoblaciones: los linfocitos B y los

linfocitos T. En los mamíferos la maduración de los linfocitos B ocurre en la médula ósea; en los rumiantes y posiblemente en el cerdo existen evidencias que también ocurre en las placas de Peyer ileocecales (Tizard, 1998); en las aves el principal sitio de maduración para este tipo celular es la ‘bursa de Fabricio’. Los linfocitos B varían según la especie, Tabla 1:

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos B en sangre periférica en algunas especies de animales domésticos (Tizard, 1992).

Especie	Linfocitos B (%)
Bovino	20 – 40
Ovino	15 – 35
Equino	20
Porcino	26 – 38
Canino	23 – 30
Felino	26 – 35

Los linfocitos B poseen en su superficie receptores de antígenos, denominados BCR (receptor de células B), cuyo componente principal es la inmunoglobulina (Ig) de membrana. Existen cinco clases o isotipos de Ig de membrana, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Cada linfocito B posee entre 200.000 y 500.000 BCR en su superficie que le permite tomar contacto con el antígeno (Tizard, 1998). El BCR a diferencia del TCR (receptor de células T), puede captar antígenos nativos libres y no requiere de procesamiento previo (Tizard, 1998). Los linfocitos B cumplen dos funciones, primero capturar los antígenos libres, sin necesidad de una presentación previa, para endocitarlos y posteriormente transformarlos en péptidos que son presentados junto a antígenos del complejo de histocompatibilidad clase II a los linfocitos T; y segundo, deben activarse y multiplicarse, para que algunas de estas células queden como células B de memoria y otras se diferencian a células plasmáticas las cuales comienzan a producir anticuerpos, dando origen a la respuesta inmune humoral (Folch y col. 2000).

Los linfocitos T tienen como sitio de maduración y diferenciación el timo y desde allí colonizan los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T pueden corresponder hasta un 80% del total de linfocitos circulantes en la sangre periférica (Tizard, 1998), pero varían según las especies, como lo muestra la Tabla 2:

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos T del total de linfocitos en sangre periférica en algunas especies de animales domésticos (Tizard, 1992).

Especie	Linfocitos T (%)
Bovino	40 – 70
Ovino	28 – 80
Equino	38 – 66
Porcino	45 – 57
Canino	70
Felino	50 – 55

Para activarse en forma específica los linfocitos T tienen en su superficie el TCR (receptor de células T) que le permiten tomar contacto con el antígeno cuando éste es presentado unido al antígeno de histocompatibilidad. Se han identificado dos tipos de TCR, que dan origen a dos subpoblaciones de linfocitos T, que se diferencian por los tipos de cadena polipeptídica que poseen, alfa-beta ($\alpha\beta$) ó gama-delta ($\gamma\delta$). Cada linfocito T posee en su superficie entre 10.000 a 20.000 TCR (Tizard, 1998). El porcentaje relativo de ambas subpoblaciones de células T existentes: $\alpha\beta^+$ y $\gamma\delta^+$ varía según la especie, Tabla 3:

Tabla 3. Diferencias entre subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de algunas especies según el TCR (Tizard, 1998).

Especie	Subpoblación de linfocitos T	
	% TCR $\alpha\beta^+$	% TCR $\gamma\delta^+$
Bovino	5 – 30	45 – 50
Ovino	5 – 30	22 – 68
Porcino	14 – 34	31 – 39
Ratón	85 – 95	5 – 15

En la especie humana, ratones y en la mayoría de los no rumiantes, el 90 a 99% de los linfocitos T tienen en su superficie receptores TCR $\alpha\beta$ (Tizard, 1998). En el hombre los linfocitos T con TCR $\gamma\delta^+$ representan un bajo porcentaje del total de linfocitos T, a diferencia de los rumiantes en que linfocitos T con TCR $\gamma\delta^+$ pueden alcanzar hasta un 60% (Tizard, 1998). La población de linfocitos T $\gamma\delta^+$ es un importante componente para la defensa contra bacterias y protozoos (Kirkham, 1996). Se ha descrito que presentan actividad citolítica inespecífica contra células tumorales (Palomo y col. 1998) y que interactúan con otros linfocitos como es el caso de la interacción de estas células con los linfocitos B contribuyendo a la respuesta inmune en varias patologías, así se ha descrito que la población de linfocitos T $\gamma\delta^+$ aumenta en pacientes con infección micobacteriana y otras enfermedades pulmonares agudas. Se describe adicionalmente que tienen un rol de gran importancia en la protección primaria (Hayday, 2000).

Además del TCR los linfocitos T cuentan con otras moléculas accesorias de superficie, entre ellas las denominadas CD ("cluster designation" o grupo de diferenciación). Se conocen alrededor de 200 CD por lo que a cada una de ellas se le asigna un número. Cada linfocito tiene muchas moléculas CD en su membrana, que pueden usarse como marcadores de su rol fisiológico y que también permite su identificación, mediante el uso de anticuerpos específicos (Folch y col. 2000). Son tres los marcadores de mayor importancia, CD3, CD4 y CD8. El CD3, presente en todos los linfocitos T, está formado por 5 glucoproteínas diferentes y se presenta siempre asociado al TCR, ya sea TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$. Su función es transferir señales desde el sitio de unión antigénico del TCR al interior del linfocito (Roitt y col. 1994; Tizard, 1998; Palomo y col. 1998).

Una subpoblación de linfocitos $CD3^+$ posee en su membrana la molécula CD4, molécula característica de las poblaciones de linfocitos T helper y linfocitos T de

hipersensibilidad retardada. La molécula CD4 actúa en reconocimiento de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II en la superficie de células presentadoras de antígenos. Como consecuencia de este reconocimiento complementario se produce la activación y proliferación de los linfocitos T helper, con síntesis y secreción de citoquinas que aumentan la respuesta inmune tanto humoral como celular (Palomo y col. 1998). La molécula CD4 ancla e inmoviliza a la célula presentadora del antígeno al linfocito T helper, para que la transmisión de señales sea más eficaz entre ellas (Tizard, 1998).

Los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ varían según la especie, en la especie humana el 65% de los linfocitos T son linfocitos T CD4⁺, en algunos animales este porcentaje es de solo 28%, por ejemplo en rumiantes adultos varía entre un 20 a 30%. Ver Tabla 4:

Tabla 4. Población de linfocitos T CD4⁺ en algunas especies de animales domésticos (Tizard, 1998).

Especie	% linfocitos T CD4 ⁺
Bovino	8 – 31
Ovino	8 – 22
Porcino	23 – 43
Equino	56
Canino	27 – 33
Felino	19 – 49

La molécula CD8 está presente en la población de linfocitos T citotóxicos y linfocitos T supresores. La molécula CD8 tiene afinidad por los antígenos de histocompatibilidad clase I (Palomo y col. 1998), por lo que su presencia potencia la estimulación de los linfocitos citotóxicos y supresores (Palomo y col. 1998). El linfocito T CD8⁺ es capaz de reconocer antígenos de carácter endógeno en la superficie de la célula presentadora, produciendo la destrucción de las células propias alteradas, como las que han sido infectadas por virus, protozoos, bacterias y las cancerosas (Tizard, 1998; Harty y col. 2000). Estudios recientes muestran que las células T CD8⁺ juegan un rol fundamental en la respuesta contra bacterias intracelulares (Harty y Bevan, 1999). Los linfocitos T CD8⁺ varían según la especie, ver Tabla 5:

Tabla 5. Población de linfocitos T CD8⁺ en algunas especies de animales domésticos (Tizard, 1998).

Especie	% linfocitos T CD8 ⁺
Bovino	10 – 30
Ovino	4 – 22
Porcino	17 – 39
Equino	20 – 37
Canino	17 – 18
Felino	6 – 39

La información señalada anteriormente revela que existen variaciones porcentuales en las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T y B inter e intra-especie, siendo función de la técnica aplicada y de las condiciones del estudio.

La poca información en bovinos sobre la variación de las subpoblaciones linfocitarias en relación con la edad nos llevó a plantear el objetivo de establecer el porcentaje de cada una de las subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ y $\gamma\delta^+$) y de la población de linfocitos B (IgG^+), y su variación a través de la edad.

Objetivos específicos:

1.- Estandarizar la técnica de separación de células mononucleares a partir de sangre periférica de bovino.

2.- Estandarizar una técnica de inmunocitoquímica que permita individualizar los distintos tipos celulares.

3.- Estudiar y cuantificar, mediante inmunocitoquímica, el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre circulante de bovinos, sin alteraciones clínicas evidentes, de tres rangos de edad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. ANIMALES.

En el presente estudio, se utilizaron en una primera etapa 20 bovinos elegidos al azar del Hospital Veterinario y del predio Santa Rosa de la Universidad Austral, para montar y estandarizar las técnicas que debieron usarse. En la segunda etapa para determinar los porcentajes de las diferentes subpoblaciones se usaron 30 bovinos, que fueron facilitados por predios de la Universidad Austral de Chile y predios privados con un manejo comparable, siendo estos actualmente predios libres de brucelosis, leucosis y tuberculosis. Estos bovinos se clasificaron en tres grupos de 10 animales cada uno, separados por rango de edad. El grupo 1 estuvo constituido por animales cuya edad fluctúa entre los 15 a 30 días, el grupo 2 corresponde a animales de entre 6 a 9 meses de edad y el grupo 3 a animales de 4 a 8 años de edad.

4.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES.

Para obtener los linfocitos se utilizó un gradiente de densidad discontinuo de Ficoll-Hypaque, mediante una técnica basada en el protocolo propuesto por Pharmacia LKB Biotechnology Inc. para la sangre humana. Este método se modificó y adaptó para la sangre del bovino. Para llevar a cabo este procedimiento a cada animal se le extrajo una muestra de sangre por punción de la vena yugular, la que se recibió en un tubo con anticoagulante (se probó con heparina y citrato de sodio). Cada muestra recién obtenida fue sometida a una centrifugación de 900 g (2300 rpm) por 20 minutos, obteniéndose tres fases, plasma, glóbulos blancos y glóbulos rojos. La fracción rica en glóbulos blancos, se trasladó a otro tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur donde los leucocitos y glóbulos rojos contaminantes fueron resuspendidos en PBS-citrato. En otro tubo se colocó la solución de Ficoll-Hypaque con una densidad de 1,077, sobre ésta se dejó caer suavemente, deslizando por las paredes del tubo, la suspensión de glóbulos blancos evitando que se mezclen y manteniendo siempre el tubo en posición vertical; la gradiente se llevó a centrifugación por 30 minutos a 900 g (2300 rpm). De esta forma se logró una separación en cuatro fases, plasma más PBS-citrato, una nube constituida principalmente por células mononucleares, solución de Ficoll-Hypaque y en el fondo del tubo los glóbulos rojos y granulocitos. Con una pipeta Pasteur se extrajo la nube de células mononucleares que se diluyó en PBS-citrato hasta completar 10 ml, luego se centrifugó a 1100 g (2500 rpm) por 10 minutos para limpiar la muestra de linfocitos de restos de Ficoll-Hypaque y plasma que permanecían en el sobrenadante. El sedimento de linfocitos que se formó posterior a la centrifugación quedó en el fondo del tubo, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS-citrato. La suspensión de células se sometió a un segundo lavado igual al descrito anteriormente. Los linfocitos se resuspendieron en 6 ml de PBS-citrato y se contaron en la cámara de Neubauer, siendo posteriormente ajustados a una concentración de 5×10^6 células por ml.

4.3. ANTICUERPOS.

4.3.1. Anticuerpos primarios.

- a) Anti-CD3 de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc.).
 Línea celular: MM1A.
 Especificidad: CD3.
 Isotipo: IgG₁.
- b) Anti-CD4 de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc.).
 Línea celular: IL-A11.
 Especificidad: CD4.
 Isotipo: IgG_{2a}.
- c) Anti-CD8 de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc.).
 Línea celular: BAT82A.
 Especificidad: CD8 beta.
 Isotipo: IgG₁.
- d) Anti- $\gamma\delta$ de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc.).
 Línea celular: CACT63A.
 Especificidad: A2/ reactividad predominante con células T $\gamma\delta$.
 Isotipo: IgG₁.
- e) Anti-IgG de bovino marcado con peroxidasa, anticuerpo policlonal producido en conejo (SIGMA).
- f) IgG1 de ratón, anticuerpo monoclonal, control negativo (DAKO).
 Línea celular: DAK-GO1.
 Especificidad: enzima glucosa oxidasa del *Aspergillus niger*, que no está presente en ningún tejido mamífero.
 Isotipo: IgG₁, kappa.

4.3.2 Anticuerpo secundario.

Anti-IgG de ratón marcado con biotina que viene en el kit marcador universal (DAKO LSAB®2 System, Peroxidase).

4.4. TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA.

A partir de las suspensiones de células mononucleares recién obtenidas, se hicieron preparados colocando una gota de 10 ul. de la suspensión sobre un portaobjeto xilanizado con APES, la cual se deja secar a temperatura ambiente.

Para lograr el marcado de las distintas subpoblaciones de linfocitos se utilizó la técnica del marcado de estreptoavidina-biotina (LSAB). Para esto las muestras de linfocitos fueron incubadas con el primer anticuerpo utilizando tres diluciones (1:25, 1:50 y 1:100) por tres tiempos diferentes i) 37°C por 1 hora, ii) a temperatura ambiente por 3 horas y iii) a 4°C por toda la noche. Finalizadas las incubaciones se procedió a lavar 3 veces las muestras con PBS mantenido a temperatura ambiente.

Cuando se utilizó como primer anticuerpo anti-IgG marcado con peroxidasa se reveló inmediatamente con el sustrato aminoetilcarbazol (AEC), que produce un depósito rojo que puede visualizarse en el microscopio óptico.

Cuando se usaron los demás anticuerpos se procedió a incubar a distintos tiempos (10 min., 30 min. y 1 hr.) con un segundo anticuerpo biotinilado (DAKO LSAB®2 System, Peroxidase). Terminada esta incubación se agregó el complejo estreptoavidina-peroxidasa (DAKO LSAB®2 System, Peroxidase). En este caso también se probaron tres tiempos (10 min., 30 min. y 1 hr.), concluido esto se procedió a revelar con AEC por 5 minutos y posteriormente las muestras se montaron usando un medio acuoso (Faramount, DAKO).

En todos los casos se utilizaron dos tipos de controles negativos, i) incubación sin primer anticuerpo, el que fue reemplazado por PBS, y ii) usando un anticuerpo de igual isotipo que el primer anticuerpo pero de especificidad no relacionada (IgG1 de ratón, control negativo).

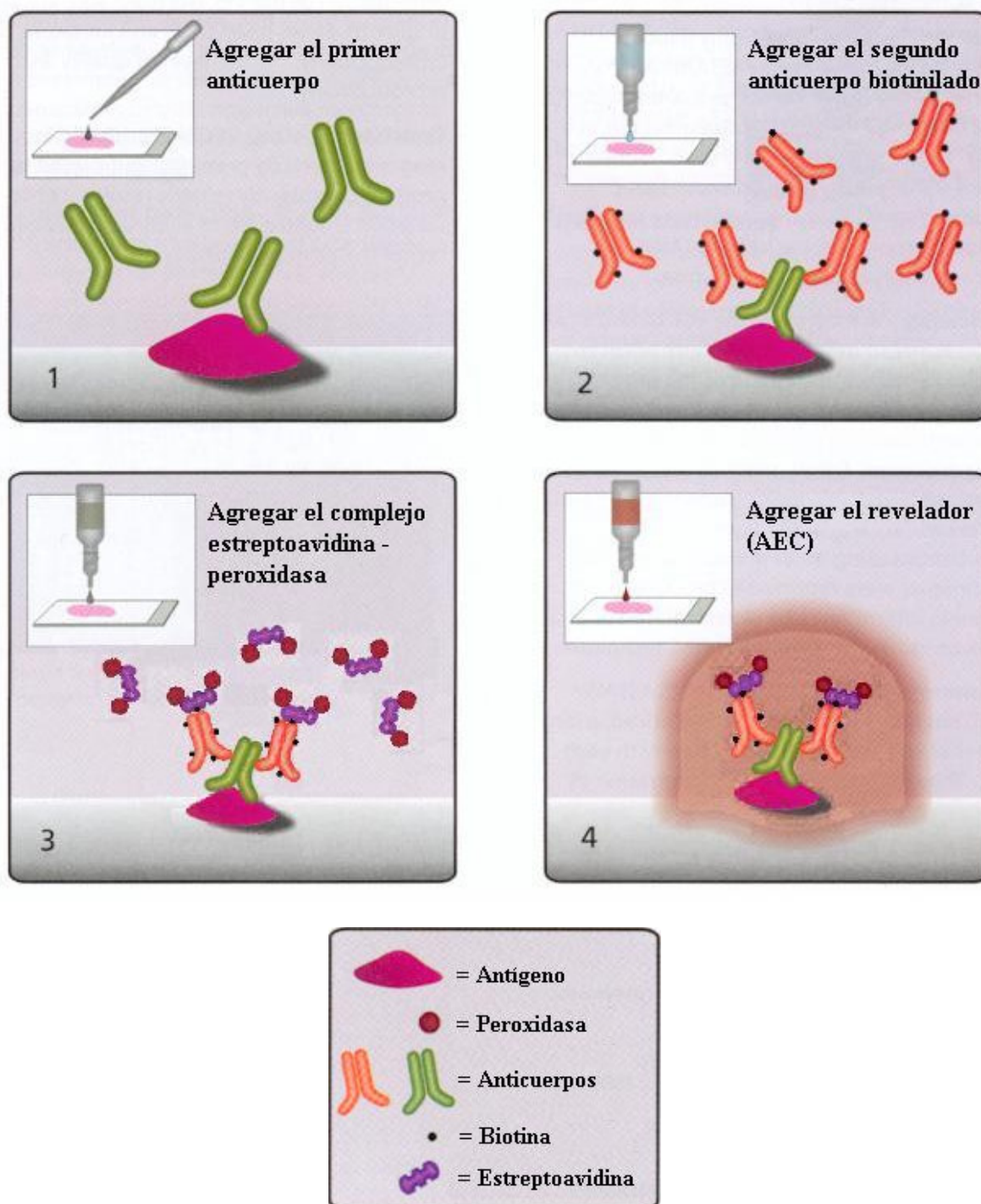
4.5. CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

El recuento de cada una de las subpoblaciones linfocitarias se realizó por separado y en un microscopio óptico, con aumento de (1000X) y con aceite de inmersión, ayudado por un contador manual. En cada preparación se observaron 20 campos visuales elegidos al azar. En cada uno de ellos se anotó el número total de células presentes y el número de células marcadas que corresponde a la subpoblación en estudio, obteniendo por un lado la suma total de células presentes y por otro, la suma total de células marcadas. En cada determinación se cuantificaron en promedio un total de 600 células mononucleares. Con los datos antes obtenidos se procedió a calcular por simple regla de tres el porcentaje de células marcadas correspondiente a la subpoblación en estudio.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ensayos estadísticos, confección de tablas y gráficos, los que permitieron presentar los valores y visualizar las variaciones. Para saber si esta variación es significativa entre los tres grupos dentro de una misma

subpoblación, los datos se analizaron a través de los métodos estadísticos Kruskal-Wallis y prueba *U* de Mann-Whitney del programa computacional Epi Info 2000, versión 1.1.1. En todos los casos se usó un nivel de significación (P) de 95%.

Fig. 1. Esquema resumen de la técnica inmunocitoquímica LSAB.



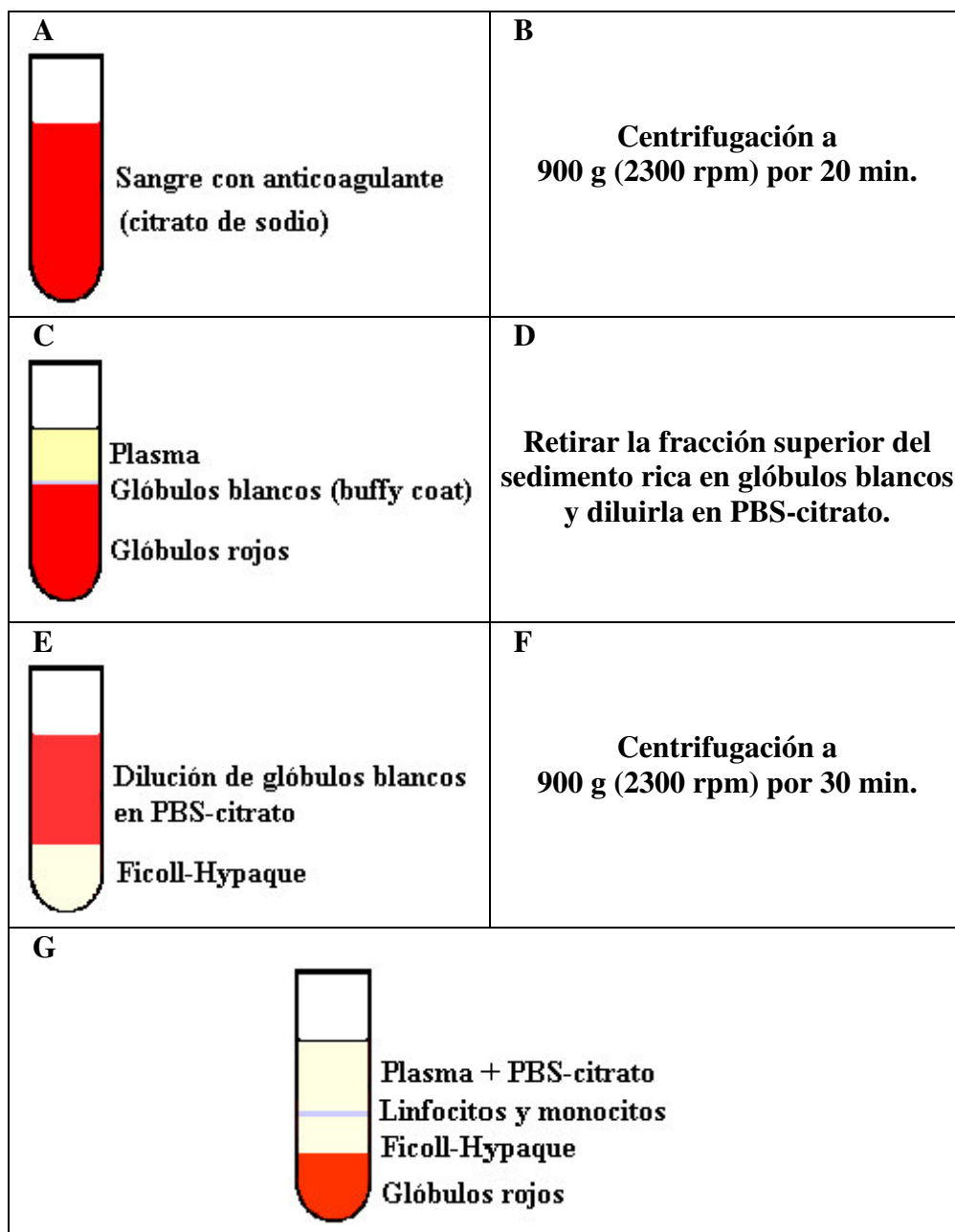
5. RESULTADOS.

5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BOVINO.

La separación de las células mononucleares se realizó tomando como base la técnica propuesta por Pharmacia LKB Biotechnology Inc. U.S.A., a la cual se le efectuó algunos cambios como es el caso del anticoagulante usado, optando por citrato de sodio al 3,8% en una relación de 1:10 con respecto a la sangre (Fig. 2A), en vez de heparina, esto se hizo para evitar la formación de coágulos de fibrina que acompañaban a los leucocitos, lo cual resultaba imposible de disgregar e impedía la extracción de dichas células ó llevaba a una gran pérdida de éstas. Otro problema asociado a esta técnica es que no se lograba obtener una buena separación de las células mononucleares si se colocaba sobre la solución de Ficoll-Hypaque la sangre entera de bovino diluida en buffer, por lo que se requirió de una primera centrifugación de la muestra (Fig. 2B) logrando con esto obtener el “buffy coat”, junto con glóbulos rojos contaminantes (Fig. 2C), esta mezcla celular se diluyó en PBS-citrato hasta un volumen de 6 ml. (Fig. 2D), para posteriormente colocarla sobre 3 ml. de Ficoll-Hypaque (Fig. 2E) y someterla a centrifugación (Fig. 2F). Con estas modificaciones se logró una muy buena separación de las fases (Fig. 2G).

Una vez estandarizada esta técnica se logró realizar sin problemas la separación de las células mononucleares y el posterior aislado de éstas en cada una de las muestras de sangre de bovino usadas en las determinaciones que aquí se describen. En la figura 2 pueden verse esquematizados los pasos usados en la separación de las células mononucleares del bovino.

Fig. 2. Esquema resumen del método de obtención de linfocitos usando Ficoll–Hypaque, adaptado para la sangre bovina. Se muestra hasta la etapa en que se obtiene la nube de linfocitos.



5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA INMUNOCITOQUÍMICA.

5.2.1. Estandarización de la dilución del primer anticuerpo.

Cada anticuerpo primario se estandarizó por separado utilizando tres diluciones diferentes, 1:25; 1:50 y 1:100. Cada una de estas diluciones a su vez se incubaron a diferentes tiempos y temperaturas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Estandarización de las concentraciones de los anticuerpos primarios, en función del tiempo y temperatura de incubación.

Dilución anticuerpo	Incubación		CD3		CD4		CD8		IgG		$\gamma\delta$	
	Tpo (hr)	T° (°C)	IMR	Pp	IMR	Pp	IMR	Pp	IMR	Pp	IMR	Pp
1:25	1	37	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
	3-4	Amb.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
	12	4	+++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
1:50	1	37	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++	-	+
	3-4	Amb.	+++	++	+++	++	+++	-	+++	++	-	+
	12	4	++	+	++	+	++	-	++	+	-	+
1:100	1	37	+++	+	+++	+	++	-	+++	+	-	+
	3-4	Amb.	+++	-	+++	-	++	-	+++	-	-	-
	12	4	++	-	++	-	+	-	++	-	+	-

Intensidad de la inmunorreactividad (IMR): (-) ausencia; (+) leve; (++) moderada; (+++) intensa.

Precipitado (Pp): (+) presencia; (-) ausencia.

Amb: temperatura ambiental.

El análisis al microscopio óptico permitió determinar a qué dilución se observó la mejor marca en las células frente a un anticuerpo específico. En las diluciones baja (1:25 ó 1:50) se observó una intensa inmunorreacción en las células, acompañada de la formación de grandes precipitados con la misma coloración de la reacción específica antígeno-anticuerpo. La mejor dilución para la mayoría de los anticuerpos fue 1:100; en este caso la reacción era muy intensa y muy limpia y no se observaba precipitación de la solución de revelado. Por esta razón, en la Tabla 6, se marca con línea roja la dilución del anticuerpo considerada óptima, como también el tiempo y la temperatura más adecuada de incubación.

En el caso del anticuerpo anti- $\gamma\delta$ no hubo inmunorreacción con ninguna de las diluciones del anticuerpo ni con las incubaciones propuestas mostradas en la Tabla 6. Sin embargo, la dilución 1:100 incubada por 12 hrs. a 4 C° mostró una muy leve marca, lo que nos hizo pensar que sería bueno realizar una nueva incubación manteniendo la dilución del anticuerpo y la temperatura, pero prolongando el tiempo de incubación. Se probaron los siguientes tiempos: 12 hrs., 24 hrs. y 48 hrs. Los resultados se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7. Estandarización del anticuerpo anti- $\gamma\delta$, en función del tiempo y temperatura de incubación.

Dilución anticuerpo	Incubación		$\gamma\delta$	
	Tpo (hr)	T° (°C)	IMR	Pp
1:100	12	4	+	-
	24	4	+++	-
	48	4	+++	-

El análisis de la inmunorreactividad al microscopio óptico volvió a mostrar que a las 12 hrs. de incubación la marca en las células era muy leve. En cambio, a las 24 y 48 hrs. la inmunorreactividad era intensa y sin presencia de precipitado. Se consideró óptimo la incubación durante 24 hrs y no a 48 hrs para resguardarnos de la posible contaminación y deshidratación de la muestra, lo cual posiblemente nos llevaría a la formación de precipitados. Por esta razón, en la Tabla 7, se destacó con línea roja las condiciones escogidas para este anticuerpo.

5.2.2. Estandarización del tiempo de incubación del segundo anticuerpo y del complejo estreptoavidina-peroxidasa.

La incubación se realizó en cámara húmeda a temperatura ambiente, se probaron tres tiempos, 10 minutos, 30 minutos y 1 hora.

El tiempo para estas incubaciones no produjo variación en los resultados, ya que no se observaron diferencias en el marcado de las células. El tiempo que se usó fue el propuesto en el kit de determinación, 10 minutos para cada incubación.

5.3. INMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO LA TÉCNICA DEL MARCADO DE LA ESTREPTOAVIDINA-BIOTINA (LSAB).

Utilizando las condiciones de inmunocitoquímica óptimas previamente estandarizadas (Tabla 6 y 7), se observaron las siguientes subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos B.

5.3.1. Marcado de los linfocitos T y sus subpoblaciones.

a) anticuerpo anti-CD3: Este anticuerpo está dirigido contra las moléculas CD3 presentes en la membrana plasmática de todos los linfocitos T, con lo que se identificó la población total de linfocitos T.

La inmunorreacción en los linfocitos T se ve en su gran mayoría de color rojo intenso (Fig. 3), en la cual puede observarse que la tinción es homogénea, la intensidad del color en algunos casos varió desde un rojo fuerte a un rojo suave, como puede observarse en las Figuras 4 y 5. Las células inmunonegativas fueron apenas perceptibles al microscopio.

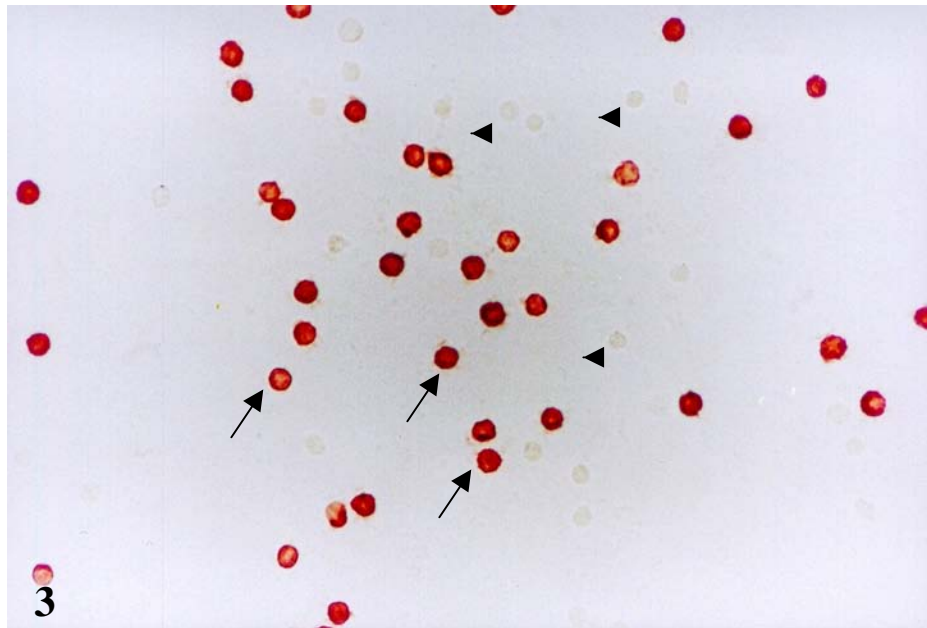
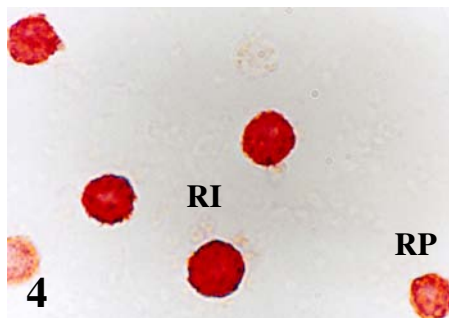


Fig. 3. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-CD3 en una dilución de 1:100 y revelada con AEC. Se muestran linfocitos T CD3⁺ inmunorreactivos (Flechas) y células inmunonegativas (Puntas de flechas) (500x).



Figs. 4-5. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-CD3 en una dilución de 1:100 y revelada con AEC. **Fig. 4.** Se muestran células fuertemente inmunorreactivas de un color rojo intenso (**RI**) y células inmunorreactivas de color rojo palido (**RP**) (2000x). **Fig. 5.** Detalle de célula inmunopositiva (**P**) y célula inmunonegativa (**N**) (2000x).

b) Anticuerpo anti-CD4: Este anticuerpo reacciona específicamente con las moléculas de superficie CD4, que son características de las subpoblaciones de linfocitos T helper y linfocitos T de hipersensibilidad retardada. El análisis inmunocitoquímico muestra a las células positivas de color rojo homogéneo pero de menor intensidad que las anteriores (Fig. 6). Se observan células inmunonegativas en las Figuras 7 y 8.

c) Anticuerpo anti-CD8: Los linfocitos T citotóxicos y supresores presentan en su superficie la molécula CD8, el primer anticuerpo usado en este caso se unirá específicamente a esta molécula de superficie. La inmunorreacción también se observó de color rojo, los linfocitos mostraron una coloración bastante tenue (Fig 9). Se destaca la homogeneidad del marcado al igual que en los casos anteriores (Figs. 10 y 11).

d) Anticuerpo anti- $\gamma\delta$: Este anticuerpo va dirigido contra la molécula "A" que está principalmente en los linfocitos T. El patrón de inmunorreactividad fue variado para este tipo de marcador, observándose la presencia de células de color rojo pálido (Fig. 12), células rojas con presencia de gránulos gruesos ubicados en el contorno celular (Figs. 12 y 13), en cambio otras células presentaron gránulos muy pequeños también ubicados en el contorno celular (Fig. 12). Un tercer tipo celular se destacó por presentar una tinción fuertemente roja y homogénea (Fig. 14) y por último un diferente marcado celular que destaca la presencia de gránulos gruesos distribuidos principalmente en el centro de la célula (Fig. 15). Dada esta gran variedad de inmunorreacción se realizó una prueba control adicional usando un primer anticuerpo de igual isotipo pero de especificidad no relacionada, para demostrar que la inmunorreactividad es específica para este tipo de anticuerpo (comparar Fig. 16 con Fig. 17).

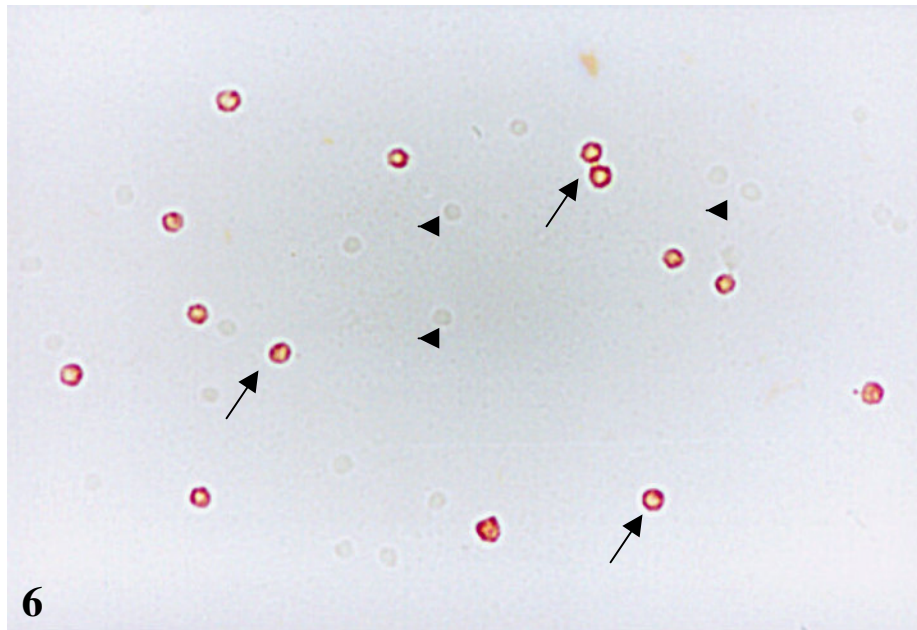
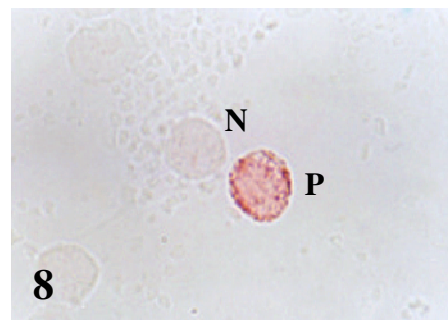


Fig. 6. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-CD4 en una dilución de 1:100 y revelada con AEC. Se muestran linfocitos T CD4⁺ inmunorreactivos (Flechas) y células inmunonegativas (Puntas de flechas) (500x).



Figs. 7-8. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-CD4 en una dilución de 1:100 y revelada con AEC. Se muestran células inmunopositivas (P) y células inmunonegativas (N) (2000x).

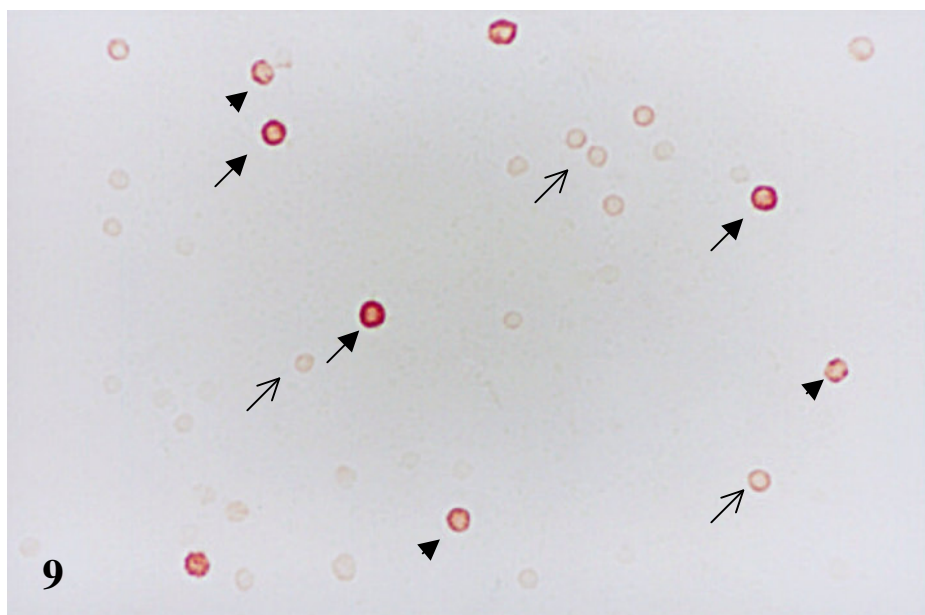
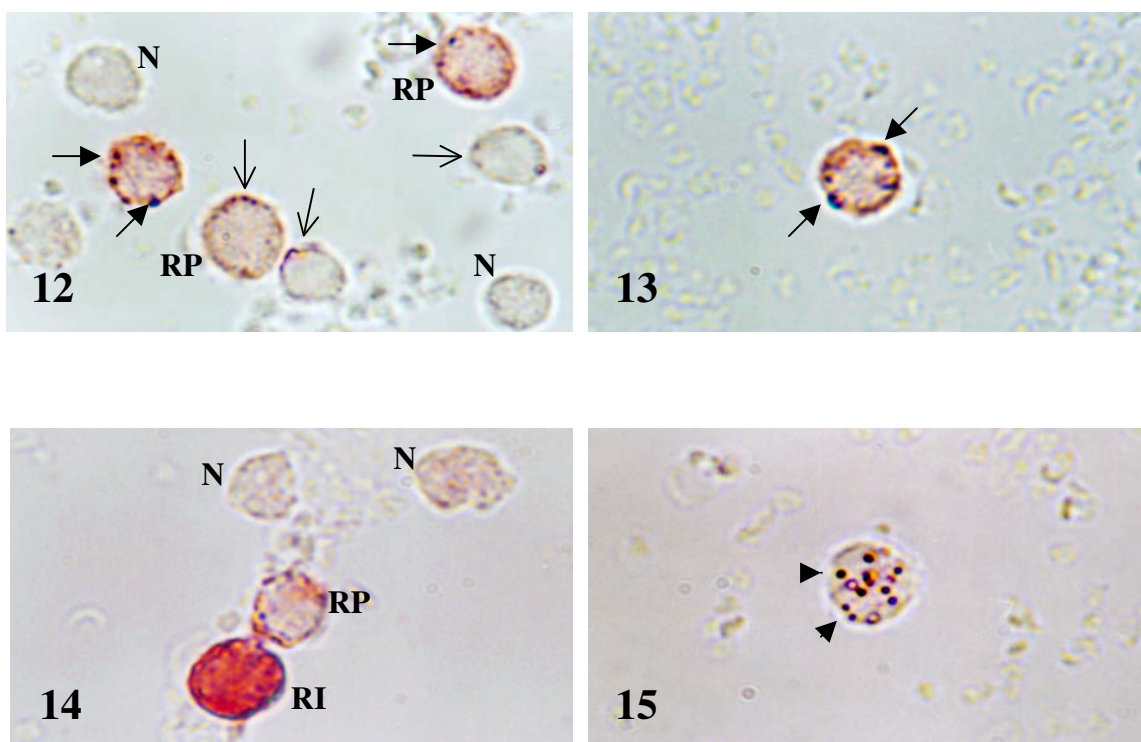


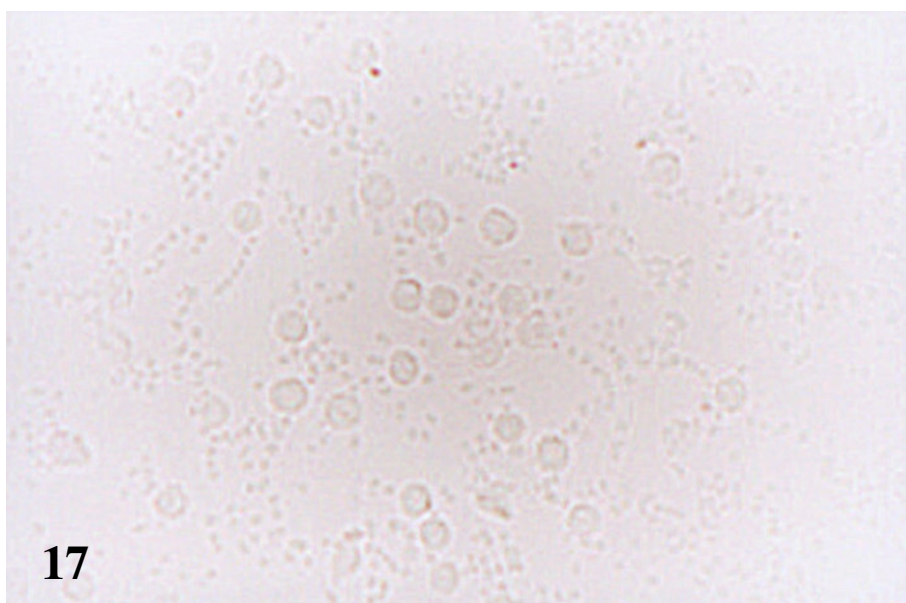
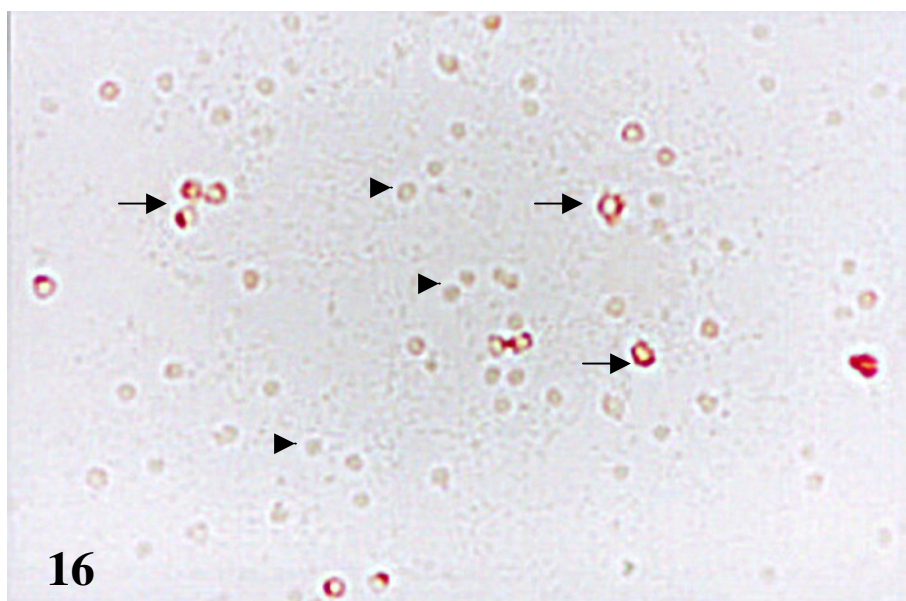
Fig. 9. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-CD8 en una dilución de 1:50 y revelada con AEC. Se muestran linfocitos T CD8⁺ fuertemente inmunorreactivos (Flechas) y células inmunorreactivas mas débiles (Puntas de flechas), también células inmunonegativas (Flechas delgadas) (500x).



Figs. 10-11. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-CD8 en una dilución de 1:50 y revelada con AEC. Se muestran células inmunopositivas (P) y células inmunonegativas (N) (2000x). **Fig. 11.** Detalle de una célula fuertemente inmunorreactiva (Flecha) y débilmente inmunorreactiva (Punta de flecha) (2000x).



Figs. 12-15. Detalle de linfocitos T $\gamma\delta^+$ y células negativas (N). **Figs. 12-13.** Se muestran células inmunopositivas color rojo pálido (**RP**), células rojas con gránulos gruesos en su contorno (Flechas) y células con gránulos pequeños en su contorno (Flechas delgadas) (2000x). **Figs. 14-15.** Se muestra célula inmunopositiva rojo intenso (**RI**) y rojo pálido (**RP**), además células inmunonegativas (N) y detalle de célula inmunopositiva con gránulos gruesos en el centro (Puntas de flechas) (2000x).



Figs. 16-17. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino. **Fig. 16.** Se usó como primer anticuerpo anti- $\gamma\delta$ en una dilución de 1:100 y revelado con AEC. Se muestran células inmunopositivas (Flechas) y células inmunonegativas (Puntas de flechas) (500x). **Fig. 17.** Se usó un primer anticuerpo de igual isotipo pero de especificidad no relacionada en una dilución de 1:100 y revelado con AEC. Se destaca la inexistencia de reacción inespecífica (800x).

5.3.2. Marcaje de los linfocitos B.

a) Anticuerpo anti-IgG: El linfocito B presenta en su superficie inmunoglobulinas de membranas que actúan como receptores, por esta razón se utilizó una anti-IgG para detectar esta población celular. Esta reacción inmunológica quedó demostrada por la coloración roja que tomaron las células (Fig. 18). Se destaca en la mayoría de las células un engrosamiento del contorno celular, dando el aspecto de una célula ciliada (Figs. 19 y 20) también se observaron grupos celulares que presentaron un marcado y una coloración más homogénea (Fig. 21).

5.3.3. Control de las tinciones obtenidas.

Con el fin de estar seguro de la especificidad de la tinción obtenida en cada caso, se usaron controles negativos que se basaron en la omisión de la incubación del primer anticuerpo, siendo éste reemplazado por PBS. Como puede verse en las Figuras 22 y 23 el segundo anticuerpo y el complejo estreptoavidina-peroxidasa usados, no dieron tinciones inespecíficas en las condiciones usadas en el presente trabajo.

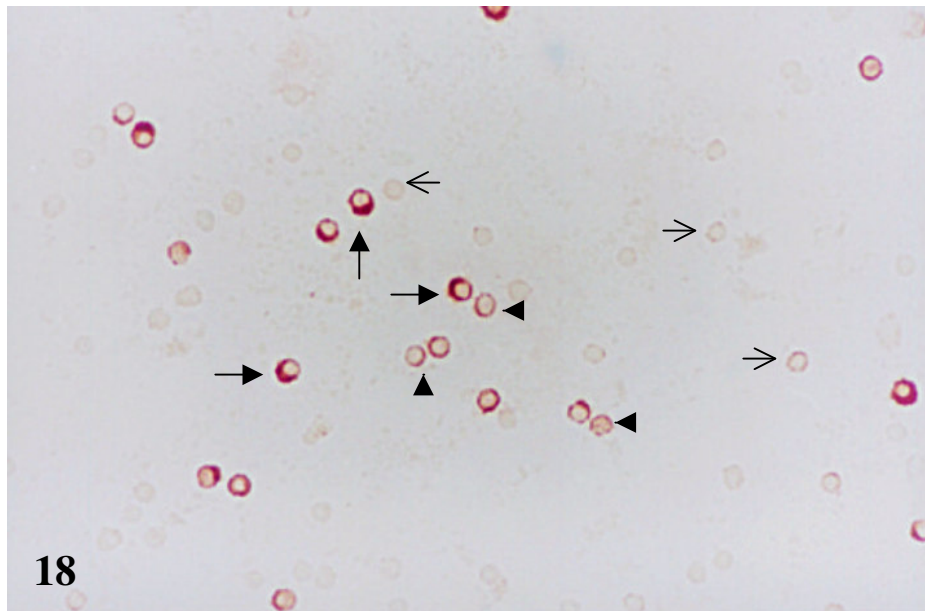


Fig. 18. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino, usando como primer anticuerpo anti-IgG en una dilución de 1:100 y revelada con AEC. Se muestran linfocitos B fuertemente inmunorreactivos con engrosamientos en contorno (Flechas) y células inmunorreactivas mas débiles (Puntas de flechas), también células inmunonegativas (Flechas delgadas) (500x).



Figs. 19-21. Detalles de linfocitos B inmunopositivos, mostrando células con engrosamiento en su contorno dando aspecto de cilios (Flechas), células inmunopositivas con marca y coloración homogénea (Puntas de flechas) y células inmunonegativas (N) (2000x).



Fig. 22. Inmunocitoquímica de aislado de células mononucleares de bovino. Se reemplazó el primer anticuerpo por PBS y se reveló con AEC. Se observan solo células inmunonegativas (500x).

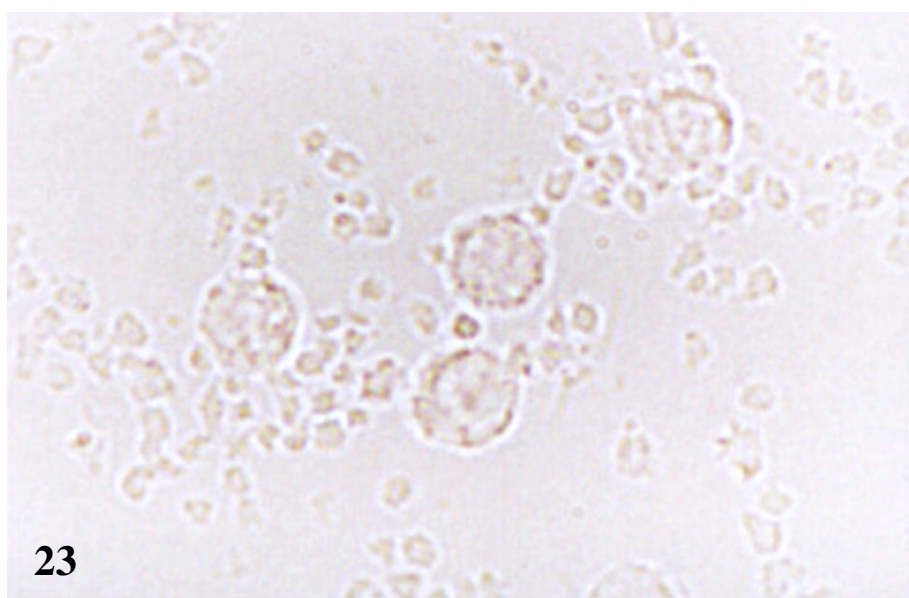


Fig. 23. Detalle de células inmunonegativas mostradas en la Fig.22. Se destaca la ausencia de reacción inespecífica (2000x).

5.4. VARIACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN BOVINOS DE DIFERENTES EDADES.

Sangre periférica de bovinos de tres grupos etareos se usó para determinar la proporción de las distintas subpoblaciones de linfocitos $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $\gamma\delta^+$ e IgG^+ . El grupo 1 está constituido por animales cuyas edades fluctúan entre 15 a 30 días, en el grupo 2 las edades de los animales fluctúan entre 6 a 9 meses y el grupo 3 las edades de los animales varían entre 4 a 8 años.

Los resultados presentados en la Tabla 8 muestran que los linfocitos T $CD3^+$ pueden alcanzar sobre un 70% de las células mononucleares circulantes en algunos bovinos principalmente en los grupos 1 y 3, así mismo se observó una disminución significativa del porcentaje promedio en el grupo 2 con respecto a los otros grupos. La variación a través de la edad de los linfocitos T $CD3^+$ se observa mejor en el Gráfico 1.

Los porcentajes promedio de los linfocitos T $CD4^+$ se observan variables, mostrando diferencias significativas entre los tres grupos (Tabla 9). El Gráfico 2 muestra un pequeño aumento de los linfocitos T $CD4^+$ en el grupo 3.

La subpoblación de linfocitos T $CD8^+$ se mantiene sin cambios en todos los grupos de edad (Gráfico 3).

Los resultados presentados en la Tabla 11 muestra que los linfocitos T $\gamma\delta^+$ alcanzan alrededor de un 60% de las células mononucleares circulantes en los bovinos jóvenes de 15 a 30 días de edad (grupo 1). El porcentaje promedio disminuye fuertemente en los otros grupos de edad (grupo 1 y 3), mostrando diferencias significativas entre los tres grupos (Tabla 11). La marcada disminución de los linfocitos T $\gamma\delta^+$ en la sangre periférica se visualiza notoriamente en el Gráfico 4.

En contraste con los linfocitos T $CD3^+$, el porcentaje promedio de los linfocitos B IgG^+ circulantes aumentan significativamente en el grupo 2 (Gráfico 5). Los grupos 1 y 3 mantienen un nivel similar (Tabla 12).

Tabla 8: Valores porcentuales de linfocitos T CD3⁺ para cada animal y promedio por grupo.

Anti-CD3	Grupos experimentales		
	1: 15-30 días	2: 6-9 meses	3: 4-8 años
Porcentaje Por Animal	61,56	47,89	57,03
	59,19	41,76	67,00
	59,32	47,33	73,02
	75,29	64,28	68,76
	75,59	47,74	72,34
	65,96	50,19	67,67
	73,39	51,41	70,85
	76,12	55,40	73,49
	69,92	56,35	66,18
	71,76	48,38	65,64
% Promedio	68,81 a	51,07 b	68,19 a
Desv. Estándar	6,79	6,24	4,86

Letras diferentes señalan $P < 0,05$.

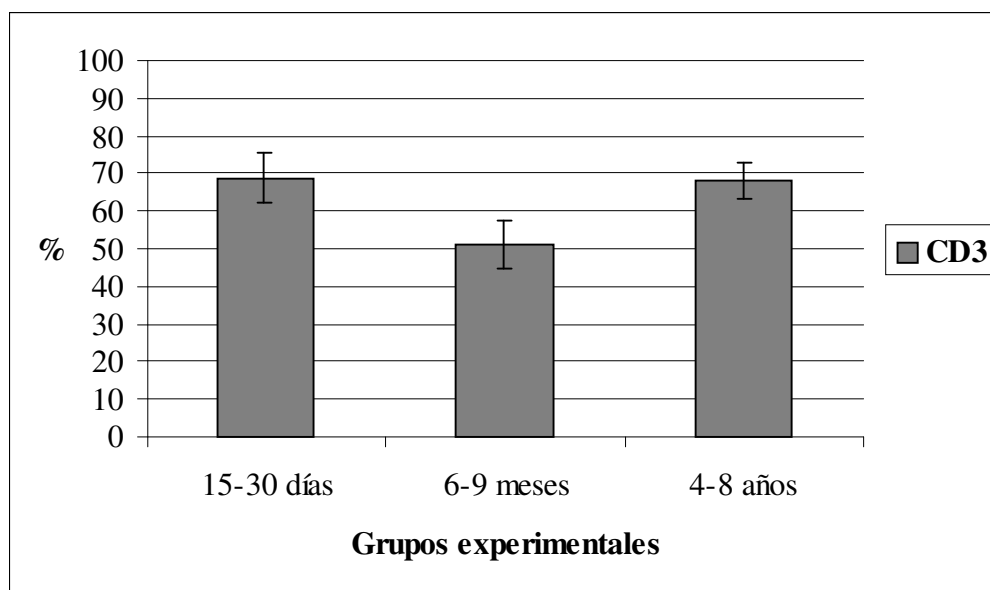


Gráfico 1: Porcentaje promedio (+/- D.E.) de la población de linfocitos T CD3⁺ en bovinos de diferentes edades.

Tabla 9: Valores porcentuales de linfocitos T CD4⁺ para cada animal y promedio por grupo.

Anti-CD4	Grupos experimentales		
	1: 15-30 días	2: 6-9 meses	3: 4-8 años
Porcentaje por animal	24,54	26,32	40,58
	30,36	25,21	40,48
	29,36	18,21	40,44
	41,37	33,11	48,38
	41,29	25,62	39,76
	30,58	29,94	41,09
	35,31	33,75	39,53
	27,00	28,66	41,18
	34,53	28,68	43,77
	29,13	24,56	42,85
% Promedio	32,34 *	27,40 *	41,80 *
Desv. Estándar	5,68	4,52	2,65

* Diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, P<0,05.

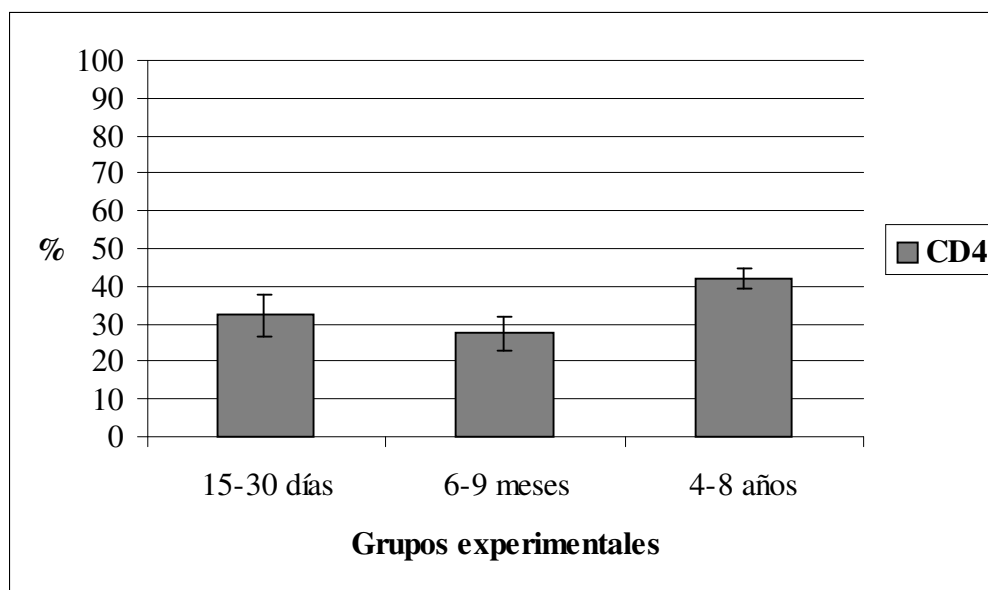


Gráfico 2: Porcentaje promedio (+/- D.E.) de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ en bovinos de diferentes edades.

Tabla 10: Valores porcentuales de linfocitos T CD8⁺ para cada animal y promedio por grupo.

Anti-CD8	Grupos experimentales		
	1: 15-30 días	2: 6-9 meses	3: 4-8 años
Porcentaje por animal	16,93	13,44	10,92
	13,14	11,59	15,90
	13,70	16,01	10,27
	11,72	20,81	13,08
	13,22	14,19	15,47
	15,91	13,69	11,50
	8,89	13,33	17,17
	12,82	14,90	16,07
	14,15	11,43	12,71
	12,25	14,34	16,14
% Promedio	13,27	14,37	13,92
Desv. Estándar	2,21	2,65	2,51

No hay diferencias estadísticamente significativas, $P > 0,05$.

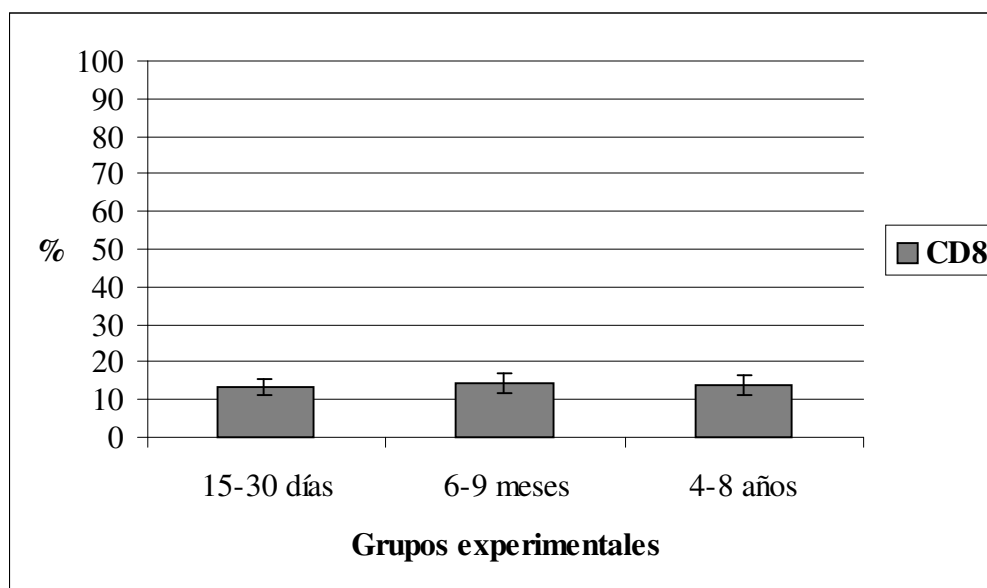


Gráfico 3: Porcentaje promedio (+/- D.E.) de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ en bovinos de diferentes edades.

Tabla 11: Valores porcentuales de linfocitos T $\gamma\delta^+$ para cada animal y promedio por grupo.

Anti- $\gamma\delta$	Grupos experimentales		
	1: 15-30 días	2: 6-9 meses	3: 4-8 años
Porcentaje por animal	51,68	34,05	9,52
	59,33	33,33	11,90
	59,30	35,38	15,78
	56,71	29,32	15,31
	58,13	37,41	8,92
	57,23	36,32	12,61
	57,78	29,50	10,00
	63,53	29,16	11,92
	51,74	34,89	10,73
	59,14	27,25	11,36
% Promedio	57,45 *	32,66 *	11,80 *
Desv. Estándar	3,55	3,54	2,28

* Diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, $P < 0,05$.

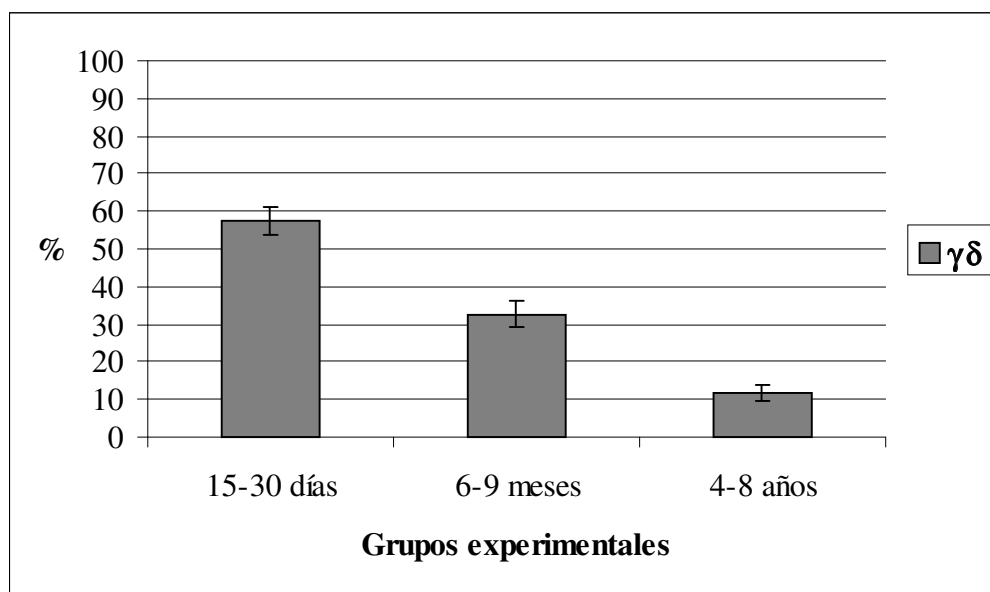


Gráfico 4: Porcentaje promedio (+/- D.E.) de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en bovinos de diferentes edades.

Tabla 12: Valores porcentuales de linfocitos B IgG⁺ para cada animal y promedio por grupo.

Anti-IgG	Grupos experimentales		
	1: 15-30 días	2: 6-9 meses	3: 4-8 años
Porcentaje por animal	21,43	29,79	29,14
	24,45	34,14	23,74
	15,57	27,74	24,65
	20,49	25,34	26,32
	21,71	37,07	21,66
	20,77	34,59	21,37
	19,25	35,30	20,95
	21,46	31,44	23,07
	21,47	42,00	20,61
	24,33	34,75	24,30
% Promedio	21,09 a	33,21 b	23,58 a
Desv. Estándar	2,51	4,81	2,68

Letras diferentes señalan $P < 0,05$.

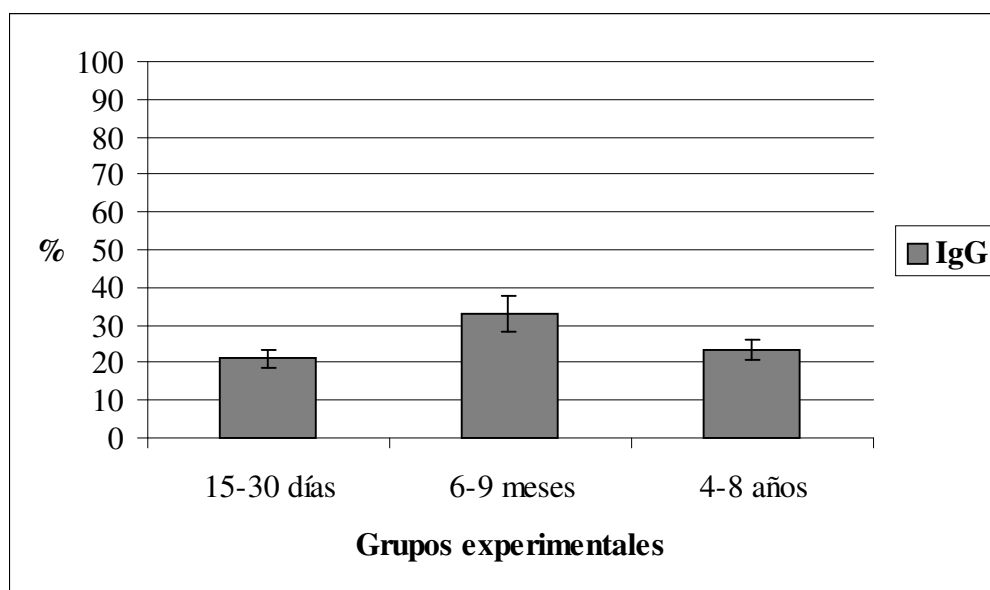


Gráfico 5: Porcentaje promedio (+/- D.E.) de la población de linfocitos B IgG⁺ en bovinos de diferentes edades.

6. DISCUSIÓN.

Los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos en el bovino, obtenidos en el presente trabajo son, en general, comparables a los obtenidos por otros autores (Park y col. 1992; Wyatt y col. 1994) que han usado la citometría de flujo como técnica de determinación. Este trabajo puede afirmar que la inmunocitoquímica a través de la técnica LSAB, permite evaluar las principales poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en el bovino, e incluso, ofrece algunas ventajas sobre la técnica de citometría de flujo habitual, ya que mediante su uso se pueden detectar antígenos citoplasmáticos, los que por citometría de flujo a menudo no son considerados, a menos que se sigan protocolos especiales. Además esta técnica inmunocitoquímica enzimática permite tener por cada molécula de antígeno varias moléculas de peroxidasa, mejorando la detección de la reacción inmunológica. Una característica muy importante de esta técnica es la permanencia en el tiempo, lo que nos permitió realizar posteriormente estudios cuantitativos de las subpoblaciones de linfocitos.

Los resultados del presente estudio mostraron la existencia de variaciones en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos dependiendo de la edad de los animales estudiados.

El porcentaje de la población de linfocitos T circulantes en el bovino de las tres edades muestreadas, obtenida mediante el uso del anticuerpo específico anti-CD3, reveló que los bovinos de 15 a 30 días de edad presentan un 68%, los animales de 6 a 9 meses de edad un 51% y los bovinos adultos de 4 a 8 años de edad un 68%. En general este porcentaje está dentro de los rangos presentados por Tizard (1992) para esta especie (Tabla 2), aunque en ella no se especifica la edad de los animales. La disminución del porcentaje de la población linfocitaria T en los animales púberes acá descrita (Gráfico 1), podría estar relacionada con la variación de los niveles hormonales, puesto que en la pubertad, el hipotálamo produce una mayor liberación de los factores estimulantes de la hipófisis, los que a su vez, estimularían a esta glándula a liberar las hormonas hacia la sangre periférica. Una hormona importante en este sentido es la ACTH, la que actúa sobre la corteza adrenal produciendo la liberación de glucocorticoides. Hay evidencias que los glucocorticoides son agentes inmunosupresores extremadamente potentes, capaces de afectar directamente la función de los linfocitos (Kunicka y col. 1993), produciendo una disminución de la respuesta inmune, fundamentalmente disminuyendo la población de linfocitos T periféricos (Ashwell y col. 2000). Al contrario de la disminución porcentual de los linfocitos T observada en animales púberes, los linfocitos B en este grupo etareo muestran un aumento porcentual con respecto a los bovinos de 15 a 30 días y los bovinos adultos de 4 a 8 años de edad, en general estos valores también caen dentro del rango para la especie mostrados por Tizard (1992) en la Tabla 1. Con los datos con que actualmente se cuenta no es posible elucubrar con base sobre el origen del alza del porcentaje de los linfocitos B observada en los animales púberes con respecto a los otros dos grupos etareos estudiados, esta alza porcentual podría ser una consecuencia de la baja del número real de los linfocitos T circulantes, o un aumento real de

la población B que podría ocurrir como respuesta compensatoria a la pérdida de linfocitos T ó como resultado a prácticas de manejo en estos animales como esquemas de vacunación.

El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ encontrados en bovinos de 15 a 30 días de edad (32%), bovinos de 6 a 9 meses (27%) y bovinos adultos de entre 4 a 8 años de edad (41%) es claramente más alta que lo presentado por Tizard (1998) para la especie bovina (Tabla 4). Lo mismo puede decirse de los resultados obtenidos por Wyatt y col. (1994), quien demostró que terneros neonatos de 1 a 16 días de edad tienen un 12% de linfocitos T CD4⁺, manteniendo este porcentaje en bovinos adultos de 2 a 9 años de edad, lo que no coincide con los resultados obtenidos en nuestra investigación. Con respecto a los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ obtenidos en este trabajo (13 a 14%), están dentro del rango porcentual para el bovino que establece Tizard (1998) (Tabla 5), y además son bastante similares a los presentados por Wyatt y col. (1994), en que para los terneros neonatos (1-16 días de edad) describe un 10% de células T CD8⁺, valor que se eleva a un 13% en bovinos adultos (2-9 años de edad), coincidiendo estas cifras con lo encontrado por nosotros.

Las células CD4⁺ y las CD8⁺ tienen la potencialidad de actuar contra los patógenos intracelulares ya sean bacterianos o virales. Los linfocitos T CD8⁺ ejercen su función ya sea matando a las células infectadas con virus (Kägi y col. 1994; Topham y col. 1997) y/o liberando citoquinas pro-inflamatorias y antivirales (Ramsay y col. 1993; Ramshaw y col. 1997). Los linfocitos T CD4⁺ son de importancia primaria en la resistencia a bacterias y virus intracelulares del bovino, lo que ha quedado claramente demostrada en el caso de animales infectados con el virus de la estomatitis vesicular (Andersen y col. 1999). Además se debe tener en cuenta la importancia de la razón entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺ ya que esta proporción se utiliza en diversas situaciones clínicas para determinar la función linfocitaria, por ejemplo en terneros infectados con el virus de inmunodeficiencia bovina (BIV), se ha detectado una caída significativa pero transitoria de la razón CD4/CD8 comparada con los terneros controles, debido a la disminución de los linfocitos CD4⁺ y al incremento de los linfocitos CD8⁺ (Zhang y col. 1997).

Los rumiantes presentan, con respecto a la especie humana y murina, una característica especial debido a la alta cantidad de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en su sangre periférica, población que se sabe disminuye a medida que avanza la edad. Con respecto a estos linfocitos T $\gamma\delta^+$, en el presente trabajo se utilizó para detectarla, un anticuerpo dirigido contra una molécula de activación llamada "A" que está asociada a la población T $\gamma\delta^+$ en esta especie (Parsons y col. 1993). En los experimentos en que se ha medido el antígeno A en la superficie de la célula (por citometría de flujo), por el hecho de efectuarse esta sin permeabilizar la célula, este antígeno no es detectado cuando las células están en reposo y solo después de 48 horas de activación con concanavalina A (Con A), un mitógeno T inespecífico, este se hace evidente en la membrana (Davis y col. 1996). Los resultados obtenidos con el método inmunocitoquímico, demuestra que el antígeno está siempre presente en el citoplasma de los linfocitos T $\gamma\delta^+$, el que posiblemente al activarse es llevado a la superficie externa de la membrana celular. Este antígeno estaría según lo observado en el presente trabajo en gránulos citoplasmáticos que se distribuyen de diferente forma y tamaño dentro de la célula.

La población de linfocitos T $\gamma\delta^+$ detectada en este trabajo fue de 57% en bovinos de 15 a 30 días de edad, en bovinos de 6 a 9 meses fue de 32% y en los bovinos adultos de entre 4 a 8 años de edad fue de un 11%. La literatura ha reportado que la concentración de linfocitos T $\gamma\delta^+$ es alta en la sangre periférica de rumiantes jóvenes afirmando que en ovinos puede alcanzar un 60% de la sangre periférica, bajar a un 35% al año de edad y a valores de 5 a 10% en adultos de 5 a 8 años de edad (Hein y Mackay, 1991). En bovinos se ha demostrado que los linfocitos T $\gamma\delta^+$ representan un 25 a 50% en la sangre periférica (Walcherck y Jutila, 1994), describiéndose incluso que en terneros recién nacidos la cifra llegaría hasta 80% (Tizard, 1998). Otro autor describe que en bovinos jóvenes el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta^+$ podría ser sobre 50% (Daubenberger y col. 1999), lo que concuerda con el 57% obtenido por nosotros; afirmándose que este porcentaje iría disminuyendo a medida que avanza la edad para ser menor a 10% en bovinos adultos (Wyatt y col. 1994). El trabajo de Wyatt y col. (1994) en que se midió la subpoblación T $\gamma\delta^+$, arrojó para los bovinos neonatos (1-16 días de edad) un promedio de 40%, para bovinos de 5 meses a 1 año de edad, el porcentaje promedio de las células T $\gamma\delta^+$ fue de 30%, y los bovinos adultos (2-9 años de edad) mostraron un porcentaje de un 12%, resultados que son muy coincidentes con los valores acá reportados.

La importancia de la subpoblación T $\gamma\delta^+$ en la especie bovina no es bien conocida, se sabe que juega un rol importante frente a infecciones, por ejemplo, se ha descrito que vacas con mastitis causadas por estafilococos y estreptococos se caracterizan por un incremento en el número de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en la sangre periférica (Soltys y Quinn, 1999). En relación al elevado porcentaje de estas células en los rumiantes jóvenes, se ha especulado que podrían representar una ventaja adaptativa frente a las infecciones en los neonatos de estas especies, que por la estructura de la placenta no reciben de la madre durante la vida intrauterina, mecanismos de defensa contra la flora microbiana circundante (Hein y Mackay, 1991).

El presente trabajo permite concluir que:

1.- La técnica del gradiente de densidad discontinuo de Ficoll-Hypaque, para la separación de células mononucleares, puede ser empleada en sangre de bovino.

2.- La estandarización de la inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra los antígenos de superficie de las subpoblaciones de linfocitos permite diferenciar con claridad los distintos tipos de linfocitos.

3.- En el bovino, solo algunas poblaciones linfocitarias varían a través de la edad

4.- Durante la pubertad, los bovinos presentan una pequeña disminución porcentual en la población de linfocitos T CD3⁺ en la sangre periférica; en cambio los linfocitos B (IgG⁺) están aumentados.

5.- Los linfocitos T CD8⁺ en el bovino no varían con respecto a la edad.

6.- La población de linfocitos T $\gamma\delta^+$ en el bovino disminuye con la edad.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- ANDERSEN, C., T. JENSEN, A. NANSEN, O. MARKER, A. RANDRUP. 1999. CD4⁺ T cell-mediated protection against a lethal outcome of systemic infection with vesicular stomatitis virus requires CD40 ligand expression, but not IFN- γ or IL-4. *Int. Immunol.* 11: 2035-2042.
- ASHWELL, J., F. LU, M. VACCHIO. 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 309-345.
- DAUBENBERGER, C., E. TARACHA, L. GAIDULIS, W. DAVIS, D. McKEEVER. 1999. Bovine $\gamma\delta$ T-cell responses to the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *Infect. Immun.* 67: 2241-2249.
- DAVIS, W.C., J. NAESSENS, W.C. BROWN, J.A. ELLIS, M.J. HAMILTON, G.H. CANTOR, J.I.R. BARBOSA, W. FERENS, G.A. BOHACH. 1996. Analysis of monoclonal antibodies reactive with molecules upregulated or expressed only on activated lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52: 301-311.
- DELLMANN, H. D., 1993. Histología Veterinaria. 2ª ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- FELDMAN, B., J. ZINKL, N. JAIN. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Copyright by Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- FOLCH, H., P. ESQUIVEL, M. ASTORQUIZA, M. BARRÍA, V. LEYAN. 2000. Fundamentos Generales de la Inmunología. Instituto de Inmunología. Universidad Austral. Valdivia. Chile.
- GERSHWIN, L., S. KRAKOWKA, R. OLSEN. 1995. Immunology and Immunopathology of Domestic Animals. 2ª ed. Mosby Year Book Inc. St. Louis, MO. U.S.A.
- GLICK, G., T. CHANG, R. JAAP. 1956. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poult. Sci.* 35: 224-225.
- HARTY, J., M. BEVAN. 1999. Responses of CD8⁺ T cells to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 89-93.
- HARTY, J., A. TVINNEREIM, D. WHITE. 2000. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 275-308.

- HAYDAY, A. C., 2000. $\gamma\delta$ Cells: A right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 975-1026.
- HEIN, W., C. MACKAY. 1991. Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today.* 12: 30-34.
- KÄGI, D., B. LEDERMANN, K. BÜRKI, P. SEILER, B. ODERMATT, K. OLSEN, E. PODACK, R. ZINKERNAGEL, H. HENGARTNER. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 369: 31-37.
- KIRKHAM, P. 1996. Disponible en www.iah.bbsrc.ac.uk/reports/1996/Imun_mec.html
- KUNICKA, J., M. TALLE, G. DENHARDT, M. BROWN, L. PRINCE, G. GOLDSTEIN. 1993. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell. Immunol.* 149: 39-49.
- PALOMO, I., A. FERREIRA, C. SEPÚLVEDA, M. ROSEMBLATT, U. VERGARA. 1998. Fundamentos de Inmunología. Editorial Universidad de Talca, Chile.
- PARK, Y., L. FOX, M. HAMILTON, W. DAVIS. 1992. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.* 75: 998-1006.
- PARKHOUSE, M. 1996. Disponible en www.iah.bbsrc.ac.uk/reports/1996/Imun_mec.html
- PARSONS, K.R., G. CROCKER, P. SOPP, C.J. HOWARD. 1993. Identification of monoclonal antibodies specific for the $\gamma\delta$ TCR. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 39: 161-167.
- RAMSAY, A., J. RUBY, I. RAMSHAW. 1993. A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunol. Today.* 14: 155-157.
- RAMSHAW, I., A. RAMSAY, G. KARUPIAH, M. ROLPH, S. MAHALINGAM, J. RUBY. 1997. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol. Rev.* 159: 119-135.
- ROITT, I., J. BROSTOFF, D. MALE. 1994. Inmunología. 3ª ed. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Masson-Salvat medicina, Barcelona, España.
- SHIVELY, M. J. 1993. Anatomía Veterinaria, Básica, Comparativa y Clínica. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F.

- SOLTYS, J., M. QUINN. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: Analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect. Immun.* 67: 6293-6302.
- TIZARD, I. 1992. Veterinary Immunology. 4^a ed. Copyright by W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.
- TIZARD, I. 1998. Inmunología Veterinaria. 5^a ed. McGraw-Hill Interamericana editores, S.A. de C.V. México, D.F.
- TOPHAM, D., R. TRIPP, P. DOHERTY. 1997. CD8⁺ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J. Immunol.* 159: 5197-5200.
- WALCHECK, B., M. JUTILA. 1994. Bovine gamma delta T cells express high levels of functional peripheral lymph node homing receptor (L-selectin). *Int. Immunol.* 6: 81-91.
- WYATT, C., C. MADRUGA, C. CLUFF, S. PARISH, M. HAMILTON, W. GOFF, W. C. DAVIS. 1994. Differential distribution of $\gamma\delta$ T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40: 187-199.
- ZHANG, S., C. WOOD, W. XUE, S. KRUKENBERG, Q. CHEN, H. MINOCHA. 1997. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4: 232-235.

8. ANEXOS.

8.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FICOLL-HYPAQUE (DENSIDAD 1,077 G/ML).

- 5,7 gramos de Ficoll (SIGMA).
- 18 ml. de la solución Hypaque (diatrizoato de meglumina 60%) (ABBOTT).
- c.s.p. 100 ml. de agua destilada.

8.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES BUFFER.

a) Buffer fosfato salino (PBS) 5x.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (MERCK) 7,4 grs.
- KH_2PO_4 (MERCK) 2,15 grs.
- NaCl (MERCK) 36,10 grs.
- c.s.p. 1000 ml. de agua destilada.

c) PBS-citrato 10x.

- NaCl (MERCK) 20 grs.
- KCl (MERCK) 0,5 grs.
- Na_2HPO_4 (MERCK) 2,88 grs.
- KH_2PO_4 (MERCK) 0,5 grs.
- Citrato de sodio (MERCK) 10 grs.
- c.s.p. 250 ml. de agua destilada.

8.3. PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS XILANIZADOS CON APES (3-AMINOPROPYLTRIETHOXY-SILANE).

- Preparar APES 2% en acetona.
- 98 ml. acetona + 2 ml. APES (SIGMA).
- Sumergir portaobjetos en la solución de APES-acetona por 10 segundos.
- Lavar 2 veces con agua destilada por 1 minuto.
- Dejar secar en estufa a 37 °C.