

## COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES CELULARES DO COLOSTRO SUÍNO ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Ricardo Augusto Neves Forner<sup>1</sup> e Ana Paula Almeida Bastos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC, ricardoformer@gmail.com.

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves.

**Palavras-chave:** imunidade celular, imunidade passiva, células somáticas, leiteão.

### INTRODUÇÃO

O colostro constitui um fluido secretado pela glândula mamária durante as últimas semanas de gestação e nos primeiros dias pós-parto, rico em proteínas e componentes bioativos, representando uma grande fonte de energia para o leiteão recém-nascido e participando no desenvolvimento da imunocompetência da prole (1,2,3,7). As secreções mamárias de todas as espécies contém vários tipos celulares, sendo predominantes no colostro as células polimorfonucleares e em menor proporção, linfócitos, macrófagos e células epiteliais (6,8,9). A relação entre o colostro suíno e seus componentes celulares, contudo, é essencialmente desconhecida e conseqüentemente, o potencial de sua imunidade celular também não é claro. A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite a avaliação de diversas características de partículas, em geral células. Nesse contexto, objetivou-se comparar quatro técnicas de purificação e separação dos componentes celulares do colostro para posterior submissão ao teste de citometria de fluxo visando a padronização de um teste para avaliação da celularidade, principalmente linfócitos, do colostro suíno.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas quatro (04) amostras de 20 ml colostro em tubos *Falcon* estéreis provenientes de quatro matrizes suínas (Topgen®) de segunda ordem de parição, através de ordenha manual, devidamente identificadas (A, B, C e D) e acondicionadas em recipiente isotérmico até processamento. No laboratório cada amostra foi dividida igualmente em quatro alíquotas sendo estas divididas nos seguintes grupos experimentais: 1) Colostro diluído na proporção 1:3 em tampão fosfato-salino (PBS) contendo soro fetal bovino (5); 2) Colostro contendo gradiente Ficoll Hypaque (densidade 1:09) (5); 3) Colostro diluído na proporção 1:5 em PBS contendo EDTA (4); 4) Colostro puro (controle). Todas as amostras foram centrifugadas à 600G por 15 minutos à temperatura ambiente para obtenção do pellet. Em seguida, a citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo Accuri® (Becton Dickinson) e as fluorescências dos anticorpos foram detectadas nos canais FL1 (nm 530/30) para FITC, e FL2 (nm 585/42) para PE. Foram analisados 50.000 eventos na seleção (*gate*) de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral - FSC e SSC). Os dados foram analisados com o *software Accuri C6 plus* (Becton Dickinson).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de eventos (Tabela 1) dentro do *gate* (P1) dos testes foi de 47.266 (94,53%) no grupo 1, 45.895 (91,79%) no grupo 2, 44.904 (89,81%) no grupo 3 e 27.880 (55,76%) no grupo controle, demonstrando que as 3 técnicas testadas foram eficientes na separação dos linfócitos do colostro puro. O FSC-P1 e o SSC-P1 (Tabela 1) médios no grupo 1 foram 108.388,21 e 19.802,50, no grupo 2 de 111.943,72 e 18.417,07, no grupo 3 de 114.673,94 e 19.314,04, enquanto que no grupo controle foram de 138.802,07 e 28.650,69 respectivamente, demonstrando que no grupo controle foram selecionadas no P1 além de linfócitos, células de maior tamanho e complexidade como macrófagos e neutrófilos. Não existem relatos bibliográficos que comparam estes métodos de separação para o colostro suíno, porém todas demonstraram diferentes graus de efetividade na obtenção da porção celular do colostro, em particular a técnica 1 (Figura 1) demonstrou um maior número de células no *gate* e conseqüentemente menor ruído, o que facilita a visualização. LE JAN (1994) afirma que preparações não purificadas de células colostrais não são adequadas para identificação e caracterização de linfócitos por citometria de fluxo, entretanto em seu estudo, a melhor visualização ocorreu nas células obtidas por gradiente de separação (Ficoll-Hypaque) quando estas foram marcadas com anticorpos; o presente estudo não envolveu a imunofenotipagem das células colostrais, uma vez que objetivou-se a padronização da obtenção da porção celular somente, todavia a efetividade destes métodos associados à imunofenotipagem serão considerados em estudos futuros.

### CONCLUSÕES

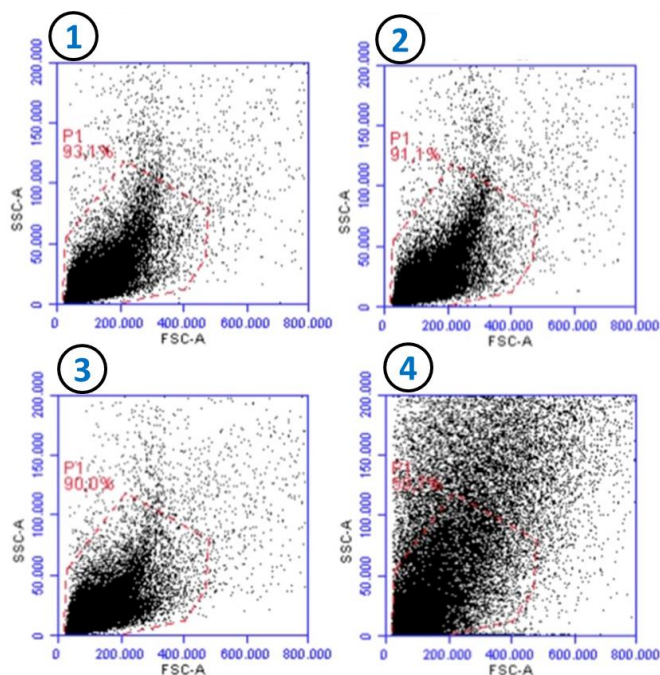
As três técnicas avaliadas neste estudo demonstram-se efetivas na obtenção da porção celular do colostro suíno, em particular a separação com PBS e soro fetal bovino demonstrou melhor visualização à citometria de fluxo, entretanto, estudos futuros incluindo à imunofenotipagem destas células devem ser considerados para melhor padronizar a obtenção de células do colostro suínos para caracterização por citometria de fluxo.

### REFERÊNCIAS

1. BIANCHI, A.T.; SCHOLTEN, J.W.; MOONEN LEUSEN, B.H.; BOERSMA, W.J. Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. **Dev Comp Immunol**, v.23, p.511–20, 1999.
2. DANIELSEN, M. et al. An in vivo characterization of colostrum protein uptake in porcine gut during early lactation. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 101-109, 2011.
3. FARMER, C. et al. Colostrum production in swine: from the mammary glands to the piglets. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, p. 1-16, 2006.
4. HLAVOVA, K; et al. The phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum suggest these are central/effector memory cells. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 477-482, 2014.
5. LE JAN, C. A study by flow cytometry of lymphocytes in sow colostrum. **Research in veterinary science**, v. 57, n. 3, p. 300-304, 1994.
6. MAGNUSSON, U.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S. A simple, rapid method for differential cell counts in porcine mammary secretions. **Vet Rec**. v.129, p.485–90, 1991.
7. QUESNEL, H. et al. Colostrum intake: Influence on piglet performance and factors of variation. **Livestock Science**, v. 146, n. 2, p. 105-114, 2012.
8. WAGSTROM, E. A. et al. Immune components in porcine mammary secretions. **Viral Immunology**, v. 13, n. 3, p. 383-397, 2000.
9. WILLIAMS, P. P. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 1993.

**Tabela 1.** Média do número de eventos no *gate* (P1) e seus respectivos FSC e SSC médios nos diferentes métodos de separação da porção celular do colostro suíno.

GRUPO	P1	FSC P1	SSC P1
1	47.266	108.388,21	19.802,50
2	45.895	111.943,72	18.417,07
3	44.904	114.673,94	19.314,04
4	27.880	138.802,07	28.650,69



**Figura 1.** Histogramas da citometria de fluxo dos diferentes métodos de separação das células mononucleares do colostro suíno.