BAC
MODULO DIGITAL

Corpoica
El documento fuente se encuentra en
La Biblioteca Agropecuaria de Colombia

ELEMENTOS BIBLIOGRAFICOS

AUTOR (ES): Clavijo, E.C. de
TITULO: Comparación de técnicas para obtención y cultivos de macrófagos bovinos Trabajo especial
LUGAR DE PUBLICACION: Bogotá (Colombia)
EDITORIAL: Univ. Nacional de Colombia/Instituto Colombiano Agropecuario
AÑO DE PUBLICACION: 1983
PAGINAS: 24 p.

INTRODUCCION

Uno de los componentes más activos en las fases inductivas y efectoras de la respuesta inmune es el macrófago. Su papel en la primera línea de defensa celular inespecífica, no sólo se reduce a los mecanismos relacionados con el proceso de fagocitosis y eliminación de partículas extrañas, sino que está íntimamente involucrado en el procesamiento y presentación adecuados de antígenos a los linfocitos T. Los complejos eventos moleculares desencadenados por esta interrelación aún no están bien entendidos pero parecen jugar un papel importante en la iniciación de las respuestas celular y de anticuerpos, así como en la liberación de factores solubles, las linfokinas.

El propósito del presente trabajo es el de facilitar el estudio de estados patológicos, posiblemente asociados con la incapacidad de actividad fagocítica o citotóxica, mediante la normalización de metologías de remosión y purificación de las células fagocíticas mononucleares en la especie bovina.

Por lo anterior, se decidió comparar entre fuentes de obtención (sangre periférica, glándula mamaria) con el objeto de asegurar funcionalidad y alta productividad celular, así como evaluar los sistemas más eficientes de purificación, en función de adherencia al vidrio, a geles de dextran y a microportadores celulares. De igual forma, se estudiaron las características de cultivo y el comportamiento fagocítico en razón de iniciar el establecimiento de pautas y normalización

de metodologías en apoyo de futuros trabajos en el estudio del estado inmune celular de enfermedades bacterianas, virales o parasitarias.

REVISION DE LITERATURA

El desempeño del macrófago como elemento del sistema fagocítico mononuclear (32) en asocio íntimo con los componentes celulares y humorales de la respuesta inmune, determina la profundización en el estudio de sus características morfológicas y de sus propiedades funcionales, en relación con el estado general del individuo. Existen numerosos reportes en la literatura que hacen referencia a las propiedades morfológicas, fisiológicas y de purificación de macrófagos, pero desafortunadamente la mayoría deriva sus experiencias de animales de laboratorio en los que el número de células y sus fuentes son limitados (10, 13, 14, 21). En estas especies, los macrófagos pueden ser obtenidos fácilmente de las cavidades serosas (peritoneo, saco pleural) pero también pueden aislarse de pulmón, hígado, bazo nódulos linfáticos,timo y sinovia (30) .

La aplicación de agentes estimulantes, tales como el tioglicolato, aceite mineral o glicógeno (6, 11), para aumentar la concentración de células a diferentes niveles, tiene el inconveniente de influenciar sustancialmente muchas funciones de las células y por lo tanto no son aplicables si el objetivo perseguido es el estudio del comportamiento de las mismas.

Las descripciones del trabajo en purificación de las poblaciones de macrófagos en especies mayores, bovinos, porcinos, equinos (5, 6, 7,8,12) ha demostrado que pueden ser aislados de diversas fuentes, entre las que se encuentran sangre periférica (4, 12, 16, 24), glándula mamaria (6, 7), médula ósea (1) alveolos,bronquios y fosas nasales (23, 29). Las variaciones en la descripción de las propiedades celulares inter e intraespecies y en diferentes órganos, aún probados bajo igual método, podría obedecer a la heterogeneidad morfológica y funcional y a la especialización de las poblaciones de acuerdo a su localización (13) .

Tanto las fuentes, como las metodologías de remosión y purificación de las células de la serie monocítica a partir de poblaciones mixtas en bovinos, reportan diversos grados de rendimiento funcionalidad ycomportamiento celulares, que fluctúan entre concentraciones de 1×10^4 células/ ml (12) a 3×10^5/ ml (6, 24), correspondientes a un rango igualmente amplio, 2-59% (4, 19), en los porcentajes de fagocitosis.

La base de los procedimientos de separación de macrófagos más comunmente empleados, es su capacidad de adherencia al vidrio (10, 12, 16, 17), posiblemente debida a la alta interacción electrostática entre la superficie y la membrana celular (27). Aplicando el mismo principio, se han utilizado otras superficies con el objeto de proporcionar mayor y mejor área, sobre la cual puedan adherirse los macrófagos. Es así como se han empleado columnas de perlas de vidrio (28), de fibras de nylon o lana (4) o elaboradas con geles polimeros del dextrán,

tales como Sephadex G-10 (4, 28) DEAE-sephadex A-50 y Cytodex (20), los cuales proveen una amplia relación área/volúmen, y adecuadas densidad y propiedades ópticas. Si bien existen referencias de aislamientos mediante la adherencia a tubos o placas de plástico (17, 19), ocasionalmente se presentan fenómenos de toxicidad, lo cual limita seriamente su empleo como práctica de rutina.

Debido a que algunas de estas técnicas también remueven sub-poblaciones de linfocitos T y B adherentes (19, 22, 28) se intenta aislar a los macrófagos en términos de su función fagocítica, particularmente por la ingestión de polvo de hierro, para la posterior extracción por gradiente de centrifugación o por la aplicación de un campo magnético dentro del cultivo (28); sin embargo, este procedimiento frecuentemente proporciona un bajo rendimiento celular. Alternativamente, se elige un procedimiento de identificación de los fagocitos mononucleares por la ingestión de esferas de latex (15, 18, 19) y el posterior reconocimiento microscópico de las células activamente fagocíticas. De igual forma se pueden identificar por medio de técnicas histoquímicas que indican los grados de actividad enzimática, tales como los de fosfatasa alcalina, B-glucoronidasa, deshidrogenasa málica, esterasa y aminopeptidasas (30).

Metodologías aún más depuradas describen los procesos asociados con la actividad fagocítica y estudian las respuestas a estímulos específicos. Tal es el caso de la respuesta quemiluminiscente, cuyo principio es la

medición de los derivados de alta energía del oxígeno (H_2O, O^-_2, OH), liberados durante la fagocitosis cuya presencia es detectada por la oxidación, acompañada de emisión de luz, del 5-amino, 2,3, dehidro-1, 4-phtalazinedione (luminol) (9). El empleo, menos generalizado, de anticuerpos monoclonales en la identificación y aislamiento de monocitos y granulocitos ha sido reportado en humanos y animales de laboratorio (31) .

El seguimiento de la capacidad fagocítica y las mediciones de actividad citotóxica, emplean diversos marcadores de fácil visualización,entre los que se cuentan rojo neutro (5), esferas de latex (15, 18, 19). levaduras y bacterias (17), glóbulos rojos de oveja (10), almidón (10, 28) y tinta india (14), aplicados luego de purificar parcial o totalmente las poblaciones.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se emplearon tres bovinos machos de raza holstein, entre los seis a siete meses de edad, como donantes de sangre periférica y tres hembras adultas en el período final de lactancia, como donadoras de células de glándula mamaria.

SUSPENSIONES DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA

Muestras de sangre heparinizada (25 U/ml) obtenidas por punción yugular, se dispusieron en tubos cónicos y se centrifugaron a 400 x g durante 15 minutos. La separación de linfocitos a partir de la capa de

blancos colectada en el paso anterior se efectuó por la técnica de gradiente en Ficoll-Hypaque (3), diluyéndola 1:2 en solución amortiguadora de fosfatos salina (AFS). Una vez efectuado el gradiente por centrifugación a 400 x g durante 40 minutos, la interfase de linfocitos fue aspirada cuidadosamente. Los eritrocitos se removieron por tratamiento con solución hemolítica de Gey (10) y los linfocitos fueron lavados tres veces con solución de Hank sin Ca^{++} ni Mg^{++} .

Una vez efectuado el recuento celular, por exclusión con Tripán Azul al 1%, se llevó la concentración a 1 x 10^6 células/ml, con medio 199 adicionado de un 20% de suero fetal bovino (199-SFB).

AISLAMIENTO DE MACROFAGOS A PARTIR DE GLANDULA MAMARIA

Empleando una cánula estéril, se inyectaron 50 ml de solución AFS, en el cuarto mamario anterior izquierdo, previamente desinfectado con etanol al 70%, seguido de masaje suave para obtener adecuada concentración celular. La suspensión recuperada se sometió a centrifugación a 250 x g durante 20 minutos para eliminar leche y grasa, y el paquete celular se reconstituyó y se lavó tres veces con solución de Hank, llevándose a concentración de 1 x 10^6 células/ml con medio 199-SFB.

TECNICAS DE PURIFICACION Y CULTIVO

Para obtener la población purificada de monocitos, las suspensiones obtenidas de sangre periférica y de glándula mamaria,se colocaron en

contacto con los microportadores: Cytodex 1, Sephadex G-25 y con cajas y perlas de vidrio. Los geles del dextrán * reconstituídos y tratados según instrucciones de la casa productora, fueron dispuestos en beakers de 10 ml y en cajas de Petri (150 mm) siliconizadas, en cantidades de 50 mg/ml de 199-SFB e incubados a 37°C durante 20 minutos. Concentraciones de 1 x 10^6 células/ml fueron aplicadas sobre cada uno de los geles y llevadas a 37°C y 5% de CO_2 durante dos horas, al cabo de las cuales se eliminaron los sobrenadantes y las células no adheridas por dos lavados con medio 199. Muestras de geles con células adheridas fueron llevadas a incubación durante 48 horas. Las células se recuperaron de los microportadores por tripsinización durante cinco minutos a 37°C y el efecto fue neutralizado con medio 199-SFB. Luego de tres lavados para eliminar la tripsina, se efectuaron recuentos celulares en cámara de Neubauer determinándose las concentraciones adecuadas para el seguimiento de funcionalidad.

La purificación de las células mediante el empleo de perlas de vidrio (3 mm), dispuestas en jeringas plásticas de 10 ml. y en cajas de Petri, se llevó a cabo, aplicando concentraciones entre 2-3 x 10^6 células/ml, en condiciones, tiempo de adherencia y tripsinización semejantes a los descritos para los geles de dextran.

Para determinar condiciones de cultivo y estudio de morfología y viabilidad, se permitió adherencia de las suspensiones celulares

---

* Pharmacia Fine Chemicals A B. Box 175. S-75104 Uppsala 1, Sweden.

durante dos horas en cajas de Petri y cámaras de cultivo Lab-teck * . Las células adherentes, se llevaron a incubación a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 horas, tiempo en el cual se extrajo un 50% del medio de cultivo y se reemplazó por medio sin metabolizar. Los cultivos fueron observados diariamente y luego fijados en metanol absoluto durante 5 minutos fueron coloreados con hematoxilina-eosina.

Una vez efectuados los recuentos de los macrófagos purificados,se estudió su capacidad fagocítica, enfrentándolos por espacio de 2-3 horas a 37°C a carbonil-hierro (4 mg por 1.2 x 10^5 células/ml) y a Rojo Neutro (1 ml, dilución 1:10.000 por 1 x 10^5 células/ml) y se determinó microscópicametne el porcentaje de células activamente fagocíticas.

RESULTADOS

Las metodologías de purificación fueron evaluadas en términos de funcionalidad y rendimiento, tanto de las fuentes de obtención, como de los procedimientos de separación de los macrófagos mononucleares.

Los recuentos totales a partir de sangre periférica luego del gradiente de densidad, tuvieron fluctuaciones, debidas a la formación de aglomerados, pero la morfología y la composición diferencial, correspondieron a las normales en sangre periférica. Los tipos celulares obtenidos a partir de glándula mamaria, incluyeron gran proporción de neutrófilos y células somáticas además de las células mononucleares lo cual elevó el total de los recuentos en los lavados intramamarios.

---

* Miles Laboratories Inc. 30 W 475, North Aurora, Naperville, Il. 60540, USA.

La proporción de monocitos en sangre periférica (Tablas 1,2 y 3) y de macrófagos de glándula mamaria (Tablas 4, 5 y 6) en cada uno de los cinco experimentos, variaron de acuerdo al tiempo (3-48 horas) de recolección de las células por tripsinización y al método de aislamiento aplicado.

La evaluación del rendimiento celular a partir de las dos fuentes de aislamiento, se determinó promediando las concentraciones de células fagocíticas mononucleares obtenidas por individuo a través de las cinco repeticiones. Así mismo se determinó la eficiencia de los métodos de aislamiento en términos del porcentaje de células adherentes obtenidas post-tripsinización (Figuras 1,2,3 y 4).

El empleo de Cytodex, se limitó a dos repeticiones, con valores promedio en concentraciones de células adherentes de $11,2 \times 10^5$ células/ml en sangre periférica y de $11,3 \times 10^5$ células/ml a partir de glándula.

Con el fín de apreciar la correspondencia entre el rendimiento de los sistemas de purificación y la concentración celular total y diferencial, realizados en un Coulter Counter digital y en extensión y coloración de Wright respectivamente, se tomaron muestras sanguíneas a los animales identificados con los números 53, 65 y 11 y se compararon con las suspensiones de monocitos logrados en la cuarta repetición luego de adherencia a las diferentes superficies portadoras (Tabla 7).

Las células adheridas a cajas de Petri (Figura 5) y en cámaras Labteck y cultivadas con cambio de medio 50% metabolizado, mostra-

ron a las 48 horas, morfología epitelioide y se mantuvieron formando pequeñas islas, durante 12 días, al cabo de los cuales se presentó desprendimiento. Similarmente, se permitió la adherencia en las restantes superficies portadoras sobre las cuales las células se mantuvieron adheridas durante 48 horas. Las coloraciones de las microcámaras mostraron grandes células multinucleadas y en las poblaciones aisladas de glándula mamaria se presentó adherencia de células somáticas.

También se ensayó un lavado intraalveolar, luego del sacrificio de un ternero de seis meses de edad, encontrándose células adherentes de gran tamaño con marcadas proyecciones citoplasmáticas hacia las 48 horas de cultivo en medio 50% metabolizado.

Los promedios de actividad fagocítica evaluados por la proporción de células con partículas de hierro ingeridas, estuvieron entre el 4-7%, mientras que el promedio de ingestión de Rojo Neutro alcanzó un 9-12%. Al aumentar la concentración del colorante a un 0.05%, los porcentajes de células activamente fagocíticas, tuvieron una marcada elevación (Tabla 8).

Una vez terminado el tiempo de ingestión y el estudio de los porcentajes de células macrofágicas, las células sobrevivieron 24 horas al cabo de las cuales se observó pinocitosis y pérdida de la actividad fagocítica.

TABLA 1. PORCENTAJES DE MONOCITOS AISLADOS A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA

(ANIMAL Nª 65)

Experimento Nª	Recuento total de leucocitos ($x10^5$ células/ml)	Tiempo de adherencia (horas)	Porcentaje obtenido por método de aislamiento		
			Sephadex G-10	Sephadex G-25	Petri
1	34	48	0.88	15	27
		3	0.58	24	29
2	48	48	0.41	10	33
		3	0.79	23	36
3	119.2	48	1.17	8.5	11
		3	2.37	3.2	21
4	66.8	48	0.29	15.7	20
		3	4.04	14.37	23
5	140	48	7.14	10.2	21
		3	ND	ND	ND

ND : No Determinado

TABLA 2. PORCENTAJES DE MONOCITOS AISLADOS A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA (Animal Nª 53)

Experimento Nª	Recuento total de leucocitos ($X10^5$ células/ml)	Tiempo de adherencia (horas)	Porcentaje obtenido por método de aislamiento		
			Sephadex G-10	Sephadex G-25	Petri
1	30	48	0	0.7	16.6
		3	0	0.7	23.3
2	42	48	0.24	0.6	25
		3	0.24	0.71	29
3	85.2	48	0	6.7	17.8
		3	0	4.9	17.2
4	74.8	48	0.26	6.4	13.8
		3	0.53	6.8	14.7
5	69.6	48	0.28	5.6	17.6
		3	ND	ND	ND

ND : No Determinado

TABLA 3. PORCENTAJE DE MONOCITOS AISLADOS A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA (Animal Nº 11)

Experimento Nº	Recuento total de leucocitos ($X10^5$ células/ml)	Tiempo de adherencia (horas)	Porcentajes obtenidos por método de aislamiento		
			Sephadex G-10	Sephadex G-25	Petri
		48	0	0.6	16.5
1	20	3	0	2.15	21
		48	0	1.1	12.42
2	33	3	0	2.2	11.8
		48	0	0.53	19.9
3	45.3	3	0	0.66	27
		48	0.59	2.8	20
4	50.4	3	0	2.06	18.7
		48	0.43	5.8	7.6
5	160.	3	ND	ND	ND

ND: No determinado

TABLA 4. PORCENTAJE DE MACROFAGOS AISLADOS A PARTIR DE GLANDULA MAMARIA (Animal Nº 10)

Experimento Nº	Recuento total de leucocitos ($X10^5$ células/ml)	Tiempo de adherencia (horas)	Porcentajes obtenidos método de aislamiento	
			Sephadex g-25	Petri
1	14.2	48	0.7	1.4
		3	1.6	2.9
2	13.3	48	0.9	1.4
		3	1.1	1.5
3	18.03	48	1.2	1.1
		3	2.3	2.3
4	24	48	0.7	1.7
		3	0.8	1.8
5	26	48	1.1	1.5
		3	1.8	3.1

TABLA 5. PORCENTAJES DE MACROFAGOS AISLADOS A PARTIR DE GLANDULA MAMARIA (Animal Nª 02)

Experimento Nª	Recuento total de células ($X10^6$/ml)	Tiempo de adherencia (horas	Porcentajes obtenidos por método de aislamiento	
			Sephadex G-25	Petri
1	0.53	48	1.8	19.4
		3	16.7	27.
2	10.1	48	1.4	1.8
		3	2.3	2.5
3	10.2	48	1.8	2.0
		3	1.7	2.8
4	3.2	48	6.2	3.2
		3	6.2	4.0
5	18.4	48	0.5	2.1
		3	2.2	1.9

TALBLA 6. PORCENTAJE DE MACROFAGOS AISLADOS A PARTIR DE GLANDULA MAMARIA (Animal 21)

Experimento Nª	Recuento total de células ($X10^6$/ml)	Tiempo de adherencia	Porcentajes obtenidos por método de aislamiento	
			Sephadex G-25	Petri
1	0.84	48	11	12
		3	10	20
2	4.8	48	2.3	2.5
		3	2.8	4.2
3	12	48	0.9	1.1
		3	1.1	1.8
4	3	48	5	5
		3	5	7.6
5	14	48	1.02	0.8
		3	1.3	2.3

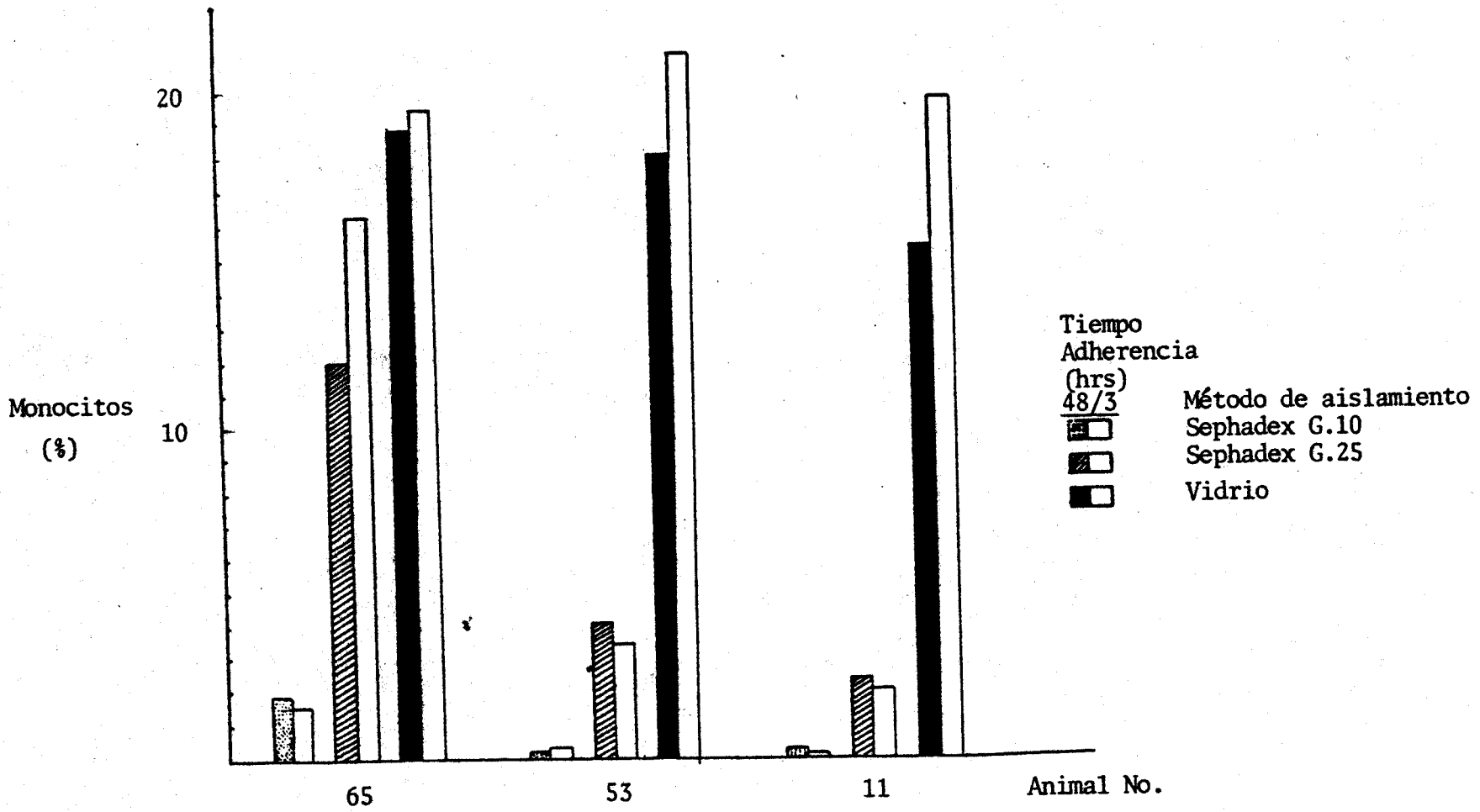

FIGURA 1 Porcentaje de monocitos por método de aislamiento obtenidos a partir de sangre periférica

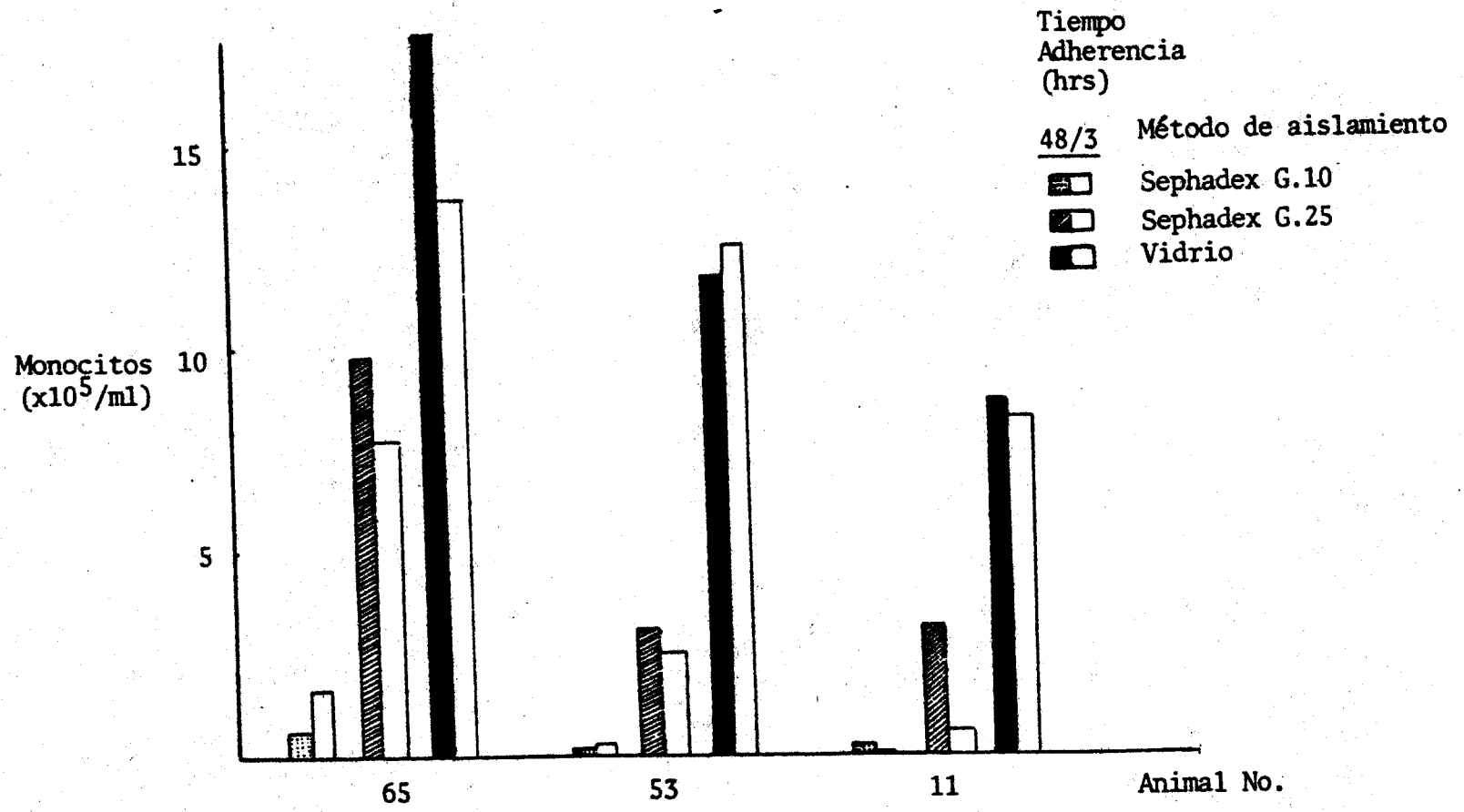

FIGURA 2 Promedio de monocitos entre individuos, obtenidos por los diferentes métodos de aislamiento a partir de sangre periférica

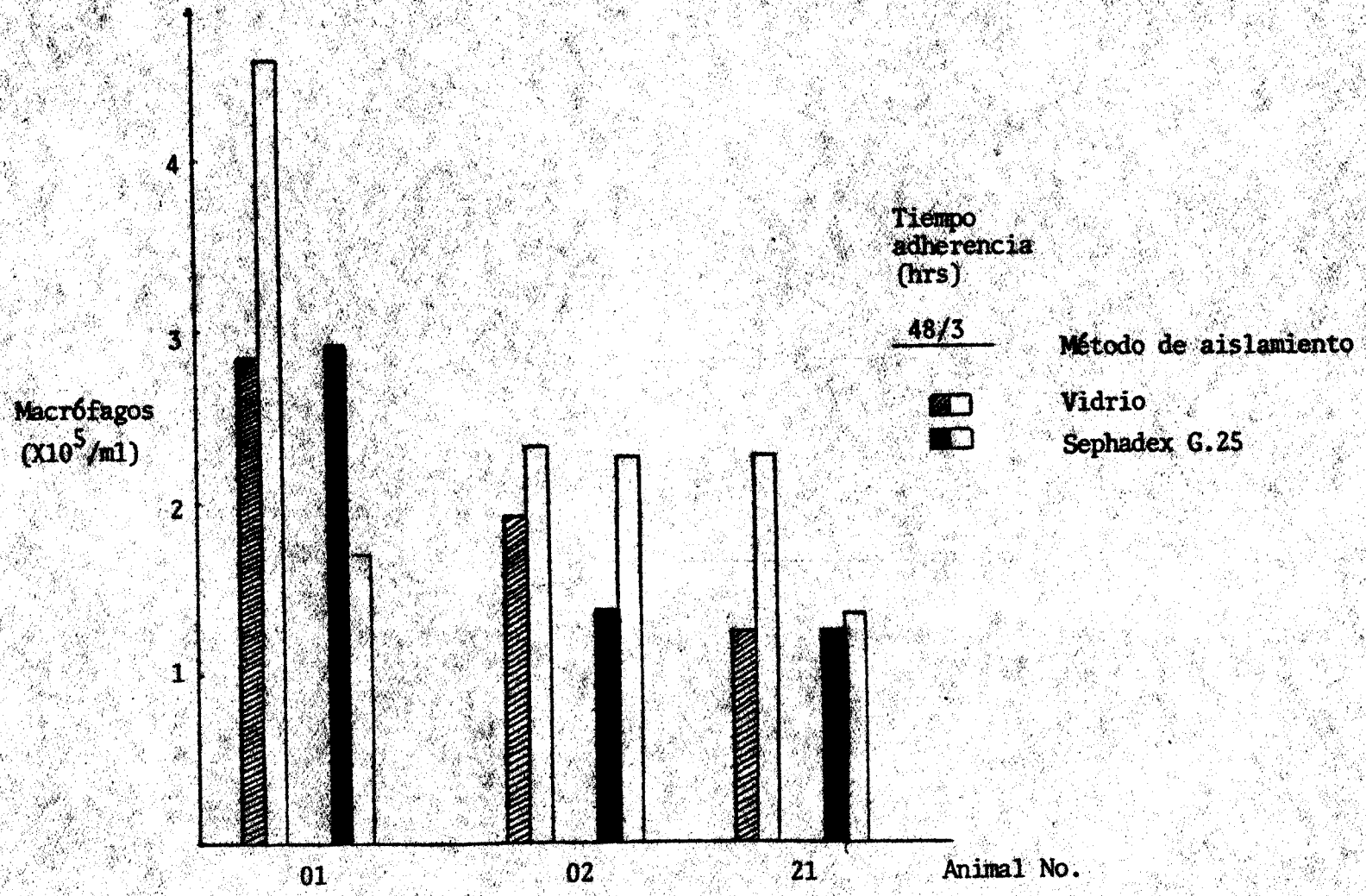

FIGURA 3 Promedio de macrófagos entre individuos obtenidos por los diferentes métodos de aislamiento a partir de glándula mamaria

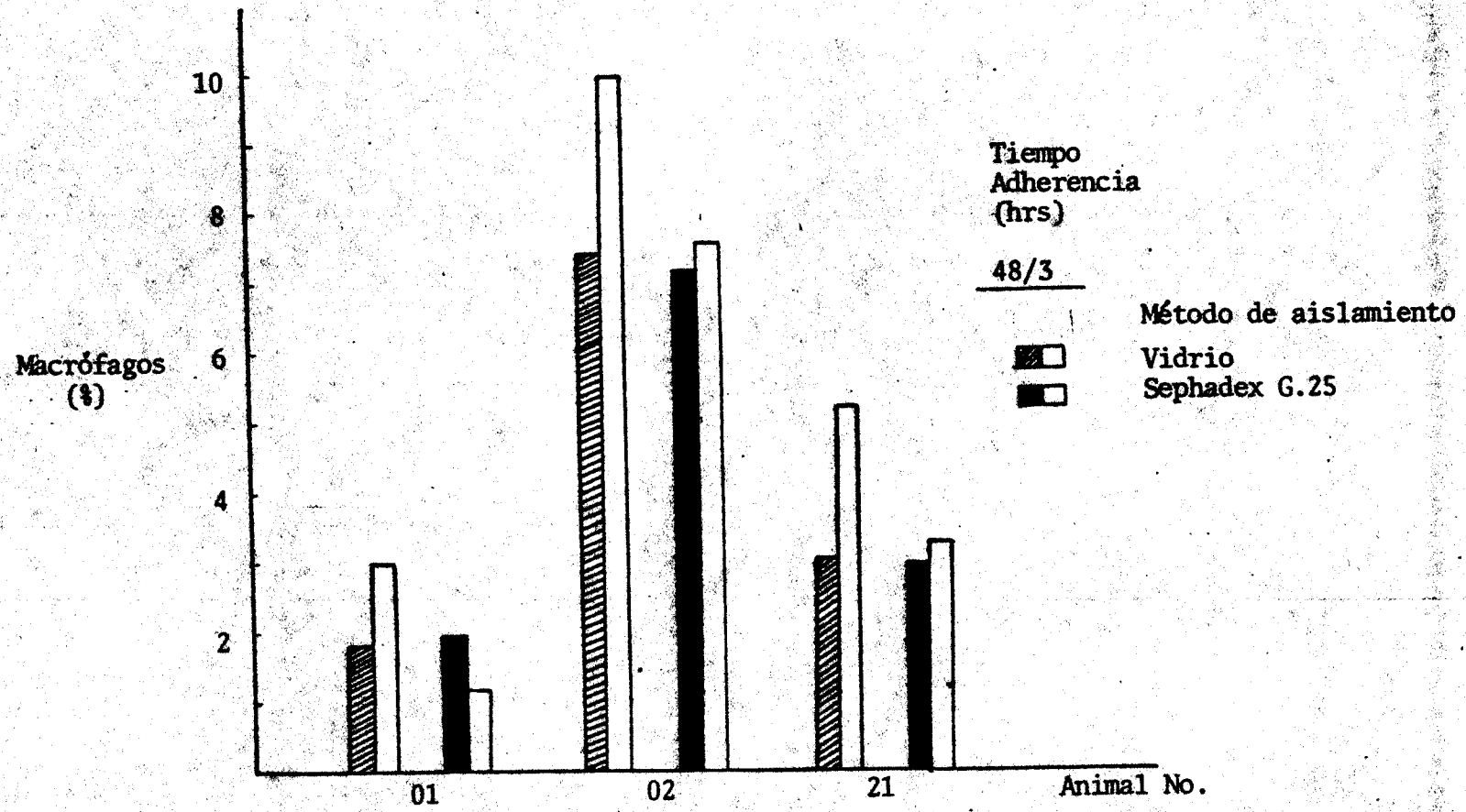

FIGURA 4 Porcentaje de macrófagos por método de aislamiento obtenidos a partir de glándula mamaria.

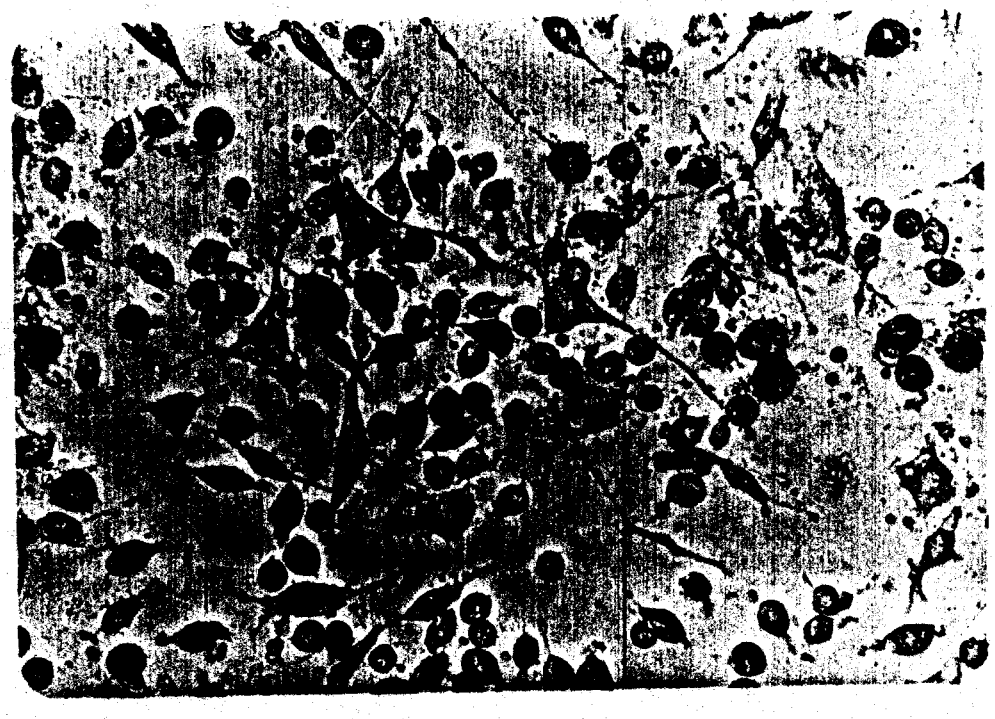

Figura 5. Macrófagos obtenidos a partir de sangre periférica luego de 48 horas de cultivo sobre vidrio. 400 X .

TABLA 7. COMPARACION ENTRE RECUENTOS DE SANGRE TOTAL Y LUEGO DE PURIFICACION*

Animal Nº	Recuento total Coulter-Counter		Recuento total Post-gradiente	
	$X10^6$ células/ml	Porcentaje monocitos	$X10^6$ células/ml esperado	$X10^6$ células/ml obtenido
53	7.7	5	3.7	7.48
11	6.4	4	2.2	5.04
65	9.3	9	6.1	6.68

* Evaluación efectuada en la cuarta repetición.

La concentración esperada de células se dedujo de los porcentajes de monocitos hallados en el recuento diferencial en los extendidos de sangre periférica.

TABLA 8. PORCENTAJES DE CELULAS ACTIVAMENTE FAGOCITICAS EVALUADAS POR LA INGESTION DE UN 0.05% DE ROJO NEUTRO.

Fuente	Animal Nº	Fagocitos activos (%)
Sangre Periférica	65	53
	53	62
	11	74
Glándula mamaria	01	55
	02	68
	21	67

Promedios obtenidos en las repeticiones cuarta y quinta a partir de las dos fuentes.

DISCUSION

La característica de distribución del sistema fagocítico mononuclear a través de muchos tejidos del huésped, permite realizar análisis comparativos de las metodologías de obtención para lograr el mayor rendimiento y funcionalidad celular que permitan el estudio de su función " in vivo " .

Los reportes de aislamiento de fagocitos mononucleares a partir de sangre periférica y de glándula mamaria, describen metodologías relativamente sencillas con alta productividad, alcanzando valores hasta de 10-30% determinados por ingestión de latex (18,19) en sangre y de un 90-99% de pureza de la población aislada por adherencia a superficies tales como vidrio (4, 18, 28) y geles de dextran (28). La comparación entre fuentes de obtención, realizadas en el presente estudio, comprueban la eficiencia en la productividad celular total, no obstante encontrarse diferencias entre individuos, situación compatible con el estado propio del animal. Sin embargo, el rendimiento celular tuvo limitación inicialmente por la tendencia de las células a la formación de aglomerados durante el proceso de lavado, o a la adherencia a las paredes de los tubos plásticos luego de centrifugación,posiblemente debido a la agregación plaquetaria con la consiguiente activación de factores de coagulación durante el proceso. Al respecto, se ha reportado que la presencia de plaquetas produce adherencia inespecífica de todos los tipos celulares a las superficies, impidiendo el establecimiento del cultivo de macrófagos (24). Dado que la presencia de Ca ++ y Mg ++ favorece la agregación de las plaquetas las suspensiones celulares fueron

lavadas con medios exentos de estos iones; sin embargo, el empleo inicial de la solución hemolítica de Gey, cuyos componentes incluyen cloruros de calcio y magnesio, pudo propiciar la formación de tales acúmulos. Por lo anterior, se decidió eliminar la utilización de la solución de Gey, evitando al máximo la contaminación con glóbulos rojos, incrementando los lavados con medio de Hank, además de emplear material cuyas superficies fueran perfectamente uniformes, obteniendo resultados satisfactorios. Todas las precauciones tomadas para obviar la presencia de eritrocitos obedece al hecho de su posible influencia en la activación inespecífica de fagocitosis e impedimento de adherencia de los macrófagos (30). Si bien la contaminación con glóbulos rojos puede ocasionarse por errores mecánicos los cambios de densidad asociados a diversas alteraciones patológicas (25); que deben tenerse en cuenta, determinarían su ascenso dentro del gradiente, ubicándose dentro de la banda de linfocitos y fagocitos.

La purificación de los macrófagos de glándula mamaria, se encontró limitada, cuando se observaron simultáneamente adheridas, células somáticas,sobre las superficies en prueba. La presencia de células contaminantes parece reducir significativamente el área de adherencia de los macrófagos, con el gasto adicional de los nutrientes destinados al establecimiento de los mismos. Obviamente, ésta situación no es recomendable cuando se estudian los sistemas apropiados para la obtención y cultivo de macrófagos debido a que la influencia que puedan tener dichas células se escaparía al control del observador.

En relación con el estudio de la correspondencia entre rendimiento por método de purificación y concentraciones total y diferencial, en el extendido de sangre periférica (Tabla 3), es de anotar que la sobreconcentración en monocitos pudo obedecer, ya sea a la metodología de extracción, como a la posible contaminación con sub-poblaciones linfocitarias adherentes tipos T y B (19, 26, 28). Esta observación confirma la importancia del seguimiento fagocítico como pauta de diferenciación, ya que los linfocitos carecen de dicha capacidad.

En cuanto a la observación de diferencia en la proporción de células obtenidas post-tripsinización, luego de incubaciones por 3 y 48 horas, se explica, por la reducción en la viabilidad inicial, ocasionada por la presencia adicional de células no adherentes en metabolismo activo y de detritos celulares que producirían estimulación adicional, deprimiendo posiblemente la capacidad adherente de los fagocitos mononucleares.

La capacidad diferencial de adherencia, sobre los geles de dextrán y sobre las esferas de vidrio, se basa esencialmente en la concentración de cargas sobre sus superficies (20). El bajo rendimiento producido a partir de las esferas de vidrio parece explicarse por su irregularidad y la escasa oportunidad de contacto que tienen las suspensiones, condición que se obviaría si se lograra aplicar movimiento a las esferas, pero el exceso de velocidad requerida para lograr agitación,

sería incompatible con el crecimiento celular. Si bien inicialmente se intentó aumentar la posibilidad de contacto entre las células y las superficies de las esferas al disponerlas en jeringas de plástico, los recuentos post-tripsinización rindieron escasas o nulas concentraciones celulares, por lo cual se decidió disponerlas en cajas de Petri, lográndose en ocasiones resultados aceptables (Figuras 1 y 2) .

Debida a la escasa producción lograda en los ensayos iniciales, sobre el Sephadex G-10, se estudió el comportamiento del Sephadex G-25, obserándose un aumento considerable. Las diferencias en diámetro de las esferas (G-10: 40-120 u, G-25:100-300u), y la distribución de sus poros, explicarían este comportamiento, ya que la uniformidad y el área de la superficie, probaron ser determinantes en la eficiencia del microportador celular.

La superficie proporcionada por las cajas de Petri para la purificación de macrófagos en las dos fuentes, demostró ser comparativamente más eficiente que las obtenidas a partir de los geles del dextrán. Dado que la manipulación dificultó la recoleccion de las células post-tripsinización, es recomendable distribuir alicuotas de las suspensiones celulares en tubos Leighton con laminilla cuyas superficies son igualmente eficientes (12, 15) y reducen los riesgos de contaminación y de alcalinización de los medios durante su manejo, además de facilitar el establecimiento del cultivo, en razón de disminuir los procesos y tiempos de adaptación del medio de crecimiento. Igualmente, los intentos de cultivo de las células macrofágicas sobre los diferentes portadores,

demostraron que el comportamiento del vidrio es más productivo. La reducción del área en las cámaras Lab-teck de microcultivo, comprobó la facilidad en la adaptación del medio por parte de las células para su establecimiento. La aparición de células multinucleadas y con mayor desarrollo citoplasmático, puede ser un indicativo de la actividad celular, tanto en la capacidad fagocítica de los núcleos de células muertas, como del desarrollo de activacion evidenciado por el aumento del citoplasma durante la adherencia, cuyo efecto en sí mismo es estimulante (2) .

El empleo del Cytodex como método de aislamiento, resultó óptimo en eficiencia en la adherencia, mas no en la diseminación ni en el mantenimiento de formas epitelioides, como las observadas sobre vidrio y sobre Sephadex G-25. Dado que la aplicación de las suspensiones a purificar, carecieron de los sistemas de agitación especificados por la casa productora para optimizar el rendimiento (20), es posible que la mayoría de la población, tendiera a sedimentar en las capas inferiores del gel, impidiéndose la llegada de nutrientes a las células. Siguiendo los reportes de la versatilidad del Cytodex como microportador de cultivos de macrófagos de sangre periférica y peritoneales, tanto humanos como murinos (20, 22) se debe asegurar un adecuado intercambio de gases con el medio de cultivo empleando equipo que suministre agitación suave que no produzca rompimiento de las esferas, ni sedimentación del microportador o desprendimiento celular, y desarrollar y estudiar las condiciones requeridas para su adaptación en el aislamiento y cultivo de macrófagos bovinos.

AGROPECUARIA COLOMBIA

El estudio de la capacidad fagocítica de las células aisladas requiere profundización, dado que el incremento en los valores porcentuales de fagocitosis, al aumentar la concentración del Rojo Neutro puede estar indicando estimulación a nivel de membranas del fagocito. Titulación de concentraciones celulares variadas, contra diluciones progresivas del colorante, reportarían las condiciones óptimas de presentación del marcador, eliminando el riesgo de estimulación de fondo.

El empleo de carbonil-hierro como método de depuración de macrófagos de suspensiones de linfocitos, puede ser efectiva, aunque en general la productividad celular es baja (28). Adicionalmente, su empleo en el seguimiento de ingestión es muy laborioso debido a que las partículas forman agregados que por su tamaño, el macrófago parece incapaz de fagocitar.

En general, la determinación de fagocitosis por el conteo de células que ingieren marcadores solubles (Rojo Neutro, Tinta India etc.), es un método relativamente simple, de fácil visualización y bajo costo,sin embargo, una vez que se han ingerido,las celulas sobreviven por breves perfodos y por lo tanto no se puede evaluar el grado de estimulación temprana, que la adherencia y el contacto con tales elementos, produzcan sobre los fagocitos. Por la misma razón, la identificación de macrófagos por enfrentamiento directo, sobre la suspensión de células pre-purificadas, con partítulas de latex o similares, solo daría indicativos del número de células activas, pero su aislamiento

para posteriores estudios no sería realizable por la estimulación previa.

De estas observaciones se deduce, que la determinación de la funcionalidad fagocítica celular in-vitro, sería un buen indicativo en el estudio de su relacion in-vivo, cuando se efectúe inmediatamente a su extracción y purificación con la ventaja adicional de establecer pautas que orienten el seguimiento del comportamiento fagocítico luego del cultivo de los macrófagos, para lograr analizar la influencia que puedan tener, el tiempo de incubación, las partículas ingeridas y los metabolitos acumulados durante el cultivo.

Partiendo del establecimiento de metodologías de obtención y purificación de las células fagocíticas mononucleares, es posible determinar el estudio de entidades virales, bacterianas o parasitarias, y teniendo en cuenta los fenómenos de generalización o locales asociados con éstas, elegir las fuentes de obtención, realmente involucradas, en razón de llegar a la profundización de fenómenos verdaderamente conclusivos, con base en la reactividad y comportamiento de los macrófagos en la defensa de tipo celular del individuo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La sangre periférica como fuente de obtención de monocitos, presentó óptimo rendimiento, es recomendable valorar su elección cuando se tengan en cuenta fenómenos asociados a generalización, más que a los implicados en repuestas locales.

El rendimiento celular obtenido a partir de glándula mamaria, en términos de manejo y respuesta fagocítica, fué igualmente aceptable, pero las mecánicas de extracción y de purificación deben mejorarse con el objeto de evitar contaminaciones que impidan el análisis de la población macrofágica de interés.

Asumiendo la existencia de diferencias en densidad, entre las células somáticas contaminantes en la adherencia, y los macrófagos presentes en glándula mamaria, la aplicación de un gradiente posterior al tiempo de adherencia, sería el método de aislar a la población fagocítica de su posible influencia, aún cuando se correria el riesgo de disminuir la concentración de los fagocitos durante el proceso.

En cuanto a los sistemas de purificación, el vidrio como superficie portadora es la de mejor rendimiento, no obstante se podría maximizar reduciendo las áreas hasta el punto en el cual, las células se adapten y adecuen el medio de cultivo de la manera más eficiente, como es el caso de los tubos Leighton con laminilla y las microcámaras de cultivo Lab-Teck.

Dada la eficiencia reportada del Cytodex como microportador en el aislamiento de macrófagos humanos y murinos, se hace necesario profundizar en el estudio de su aplicación en la especie bovina, adaptando la mecánica del cultivo a las posibles necesidades diferenciales de las células en esta especie.

Reconociendo la influencia de elementos extraños sobre el comportamiento de la población purificada de células, el seguimiento de la actividad fagocítica podría efectuarse posterior al tiempo de incubación requerido para la adherencia, con el objeto de eliminar una posible activación o neutralización de la fagocitosis por acción de la tripsina.

El estudio de la capacidad fagocítica en relación con posible estados patológicos del individuo deberá hacerse inmediato a la purificación de los macrófagos con el fin de eliminar la influencia externa que puedan tener los elementos ingeridos o los metabolitos acumulados durante el cultivo que conduzcan a resultados falsamente conclusivos.

Es necesario ampliar el estudio del comportamiento de los fagocitos mononucleares frente a diversos elementos particulados o solubles, en diferentes concentraciones y presentaciones, para evaluar adecuadamente la activación que el proceso de ingestión produzca sobre dichas poblaciones.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

REFERENCIAS

1. AL-IZZI, S.A.; MAXIE, M.G.; VALLI, V.E. Proliferative, morphologic, and cytochemical characteristics of bovine bone marrow macrophage colonies in liquid culture. AM, J. Vet. Res. V. 43, No. 10, p. 1868-1872. 1982 .

2. BELLER, D.I.; HO, K. Regulation of macrophage populations. J. Immunol. V. 129, No.3, p. 971-976. 1982 .

3. BOYUN, A. Method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl, p. 77. 1966.

4. CAMPOS, M.; ROSSI, R.C.; LAWMAN, J.P. Natural cell-mediated cytotoxicity of bovine mononuclear cells against virus-infected cells. Infect. Immun. V. 36, No. 3, p. 1054-1059. 1982.

5. CHARLEY, B.; LECLER, C.; PETIT, E.; CLIEDID, L. In-vitro effects of lipopolysaccharides and mycobacterial cell wall components on swine alveolar macrophages. Res. Vet. Sci. v. 34, p. 212-217, 1983 .

6. DESIDERIO, J.V.; CAMPBELL, S.G. Bovine mammary gland macrophages: Isolation, morphologic features, and cytophilic immunoglobulins. Am.J. Vet. Res. v. 11, No. 10, p. 1583-1590, 1980.

7. DESIDERIO, J.V.; CAMPBELL, S.G. Bovine mammary gland macrophages: Effects of colostral components on phagocytosis. Am. J. Vet. Res. v. 41, No. 10, p. 1600-1602, 1980.

8. DYER, R.M.; LEID, R.W. Surface receptor for Ig-G and complement on equine alveolar macrophages. Inflammation, v. 7, No. 2, p. 183-195, 1983.

9. _____, Chemiluminescence response of equine alveolar macrophages during stimulation with latex beads, or IgG-opsonized sheep red blood cells. Inflammation, v. 7, No.2, p. 169-182, 1983.

10. ECKHARD, A.F.; REINHARD, G. A rapid new method of measuring phagocytosis and cytotoxicity in macrophage tissue culture. J. Immunol. Meth. v. 47, p. 259-262, 1981.

11. ELLNER, J.J.; ROSENTHAL, A.S. Quantitative and immunological aspects of the handling of 2-4 dinitrophenol guinea pig albumin by macrophages. J. Immunol. v. 115, p. 1563-1569, 1975.

12. FITZGEORGE, R.B.; SOLOTOROVSKY, M. The behaviour of Brucella abortus within macrophages separated from blood of normal and immune cattle by adherence to glass. British J. Exp. Phat. v. 58, No. 5, p. 522-528, 1977.

13. HOLT, P.G.; WARNER, L.A.; PAPADIMITROU, J.M. Alveolar macrophages: Functional heterogeneity within macrophage populations from rat lung. Australian J. Exp. Biol. Med. Sci. V. 60, p. 607-618, 1982.

14. HOSONO, M.; KATSURA, Y. The use of phagocytic peritoneal exudate cells as targets for the estimation of cytotoxic T cell activity. J. Immunol. Meth. v. 50, p. 289-297, 1982.

15. HU, S.W.; MUSCOPLAT, C.C. Lidocaine: effect on phagocytosis and purification of monocytes in bovine peripheral blood. Am. J. Vet. Res. V. 41, No. 3, p. 447-449, 1980.

16. LETCHWORTH III, G.J.; CARMICHAEL, L.E. Production of interferon by bovine peripheral blood monocytes infected with bovid Herpes virus 2. Vet. Microbiol. v. 8, p. 69-80, 1983.

17. MASHIBA, H.; MATSUNAGA, K. Augmentation of antitumor activities in hamster macrophages by yeast cell walls treated with lymphokines in-vitro. Cancer Letters. v. 19, p. 33-39, 1983.

18. ONOZAKI, K. Role of lymphokines in regulation of macrophage differentiation. Cell. Immunol. v. 76, p. 129-136, 1983.

19. PAUL, P.S.; SENOGLES, D.R.; MUSCOPLAT, C.C. Enumeration of T. cells, B. cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle. Clin. Exp. Immunol. v. 35, p. 306-316, 1979.

20. PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Sweden. Microcarrier cell culture, Principles & Methods. Separation News. Dec. 1981.

21. REISSSER, D.; JEANNIN, J.F. Activation antitumorale des macrophages péritonéaux des rats par le muramyl dipeptide in-vitro. Acad. Sci. Paris. v. 295, p. 485-488, 1982.

22. REN, E.C. Macrophage depletion using Cytodex. J. Immunol. Meth. v. 49, p. 105-111, 1982.

23. ROBERTS, D.H.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G.; BUSHNELL, S. Detection of Bovine leukosis virus in bronchoalveolar lung washingsand nasal secretions. Vet. Record. v. 111, p. 501-503, 1982.

24. ROSSI, C.R.; KIESEL, G.K. Bovine peripheral blood monocyte cultures: Growth characteristics and cellular receptors for immunoglobulin G. and complement. Am. J. Vet. Res. v.38, No. 5, p. 559-563, 1977.

25. SCHALM, O.W. ; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. Veterinary Hematology. Ed. Lea and Febiger. C. 9, p. 405-463, 1975.

26. SCHULTZ, R.D. Assays of cellular immunity. JAVWA. v. 181. No. 10, p. 1169-1176, 1982.

27. SOBERMAN, R.J.; KARNOVSKY, M.L. Biochemical properties of activated macrophages. In, Lymphokines. vol. 3. Edgar Pick. Ed. Academic Press, p. 11-31, 1981.

28. THOMAS, R.J.; DEAN, J.H.; RICHARDSON, G.L. Depletion of manocytes from human peripheral blood mononuclear leukocytes. J. Immunol. Meth. v. 32, p 11-29, 1980.

29. TOTH, T.H.; HESSE, R.A. Replication of five bovine respiratory viruses in cultured bovine alveolar macrophages. Achives of Virology v. 75, p. 219-224, 1983.

30. WEIR, D.M. Phagocytosis in-vitro. In, Cellular Immunology. Handbook of Experimental Immunology. Vol. 2. Ed. Blackwell Scientific Publication. Oxf. C. 24. 1973.

31. WRIGHT, S.D. Identification of the C_3b receptor of monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. Biol. Sci. v. 80, No. 18, 1983

32. WURLAT, D. F.; COHN, A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. v. 128, p. 415-433, 1968.

EMBRAPA AGROPECUÁRIA