



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

OBTENCION Ante Mortem DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE BORREGOS Y SU PARCIAL CARACTERIZACION In Vitro

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JOSE FRANCISCO MORALES ALVAREZ

ASESOR: EMILIO TRIGO TAVERA

Co ASESOR: ALICIA V. MENDEZ GUERRERO



CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LISTA DE CONTENIDO:

	PAG
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVO.....	7
MATERIAL Y METODOS.....	8
-ANIMALES.....	8
-ANESTESIA.....	8
-OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	8
-VIABILIDAD Y CONTEO DE CELULAS.....	9
-CULTIVO DE CELULAS.....	10
-DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEM- BRANA PARA LA FRACCION FC DE IgG SOBRE LA MEMBRANA DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	10
-DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEM- BRANA PARA COMPLEMENTO EN MEMBRANA DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	11
-OBTENCION DE IgG ANTI-ERITROCITO DE CARNERO.....	12
-OBTENCION DE IgM ANTI-ERITROCITO DE CARNERO.....	12
-OBTENCION DE COMPLEMENTO.....	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	25
APENDICE.....	28
LITERATURA CITADA.....	29

LISTA DE CUADROS:

	PAG.
DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CARACTERIZACION PARCIAL DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE OVINOS.....	14
CUADRO 1. DATOS BASALES DE LAVADOS PULMONARES PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE OVINOS.....	19
CUADRO 2. LAVADOS PULMONARES EN BORREGOS PARA LA RECOLECCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	20
CUADRO 3. RECUENTO DIFERENCIAL DE CELULAS RECOLECTADAS MEDIANTE LAVADOS PULMONARES.....	21
CUADRO 4. ADHERENCIA E INTERNALIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO POR MACROFAGOS ALVEOLARES MEDIADA POR IGG.....	22
CUADRO 5. ADHERENCIA E INTERNALIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO POR MACROFAGOS ALVEOLARES MEDIADA POR COMPLEMENTO....	23

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 1. USO DEL LARINGOSCOPIO EN LA INTUBACION ENDOTRAQUEAL PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES..... 15

FIGURA 2. INTUBACION ENDOTRAQUEAL PARA LA OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE OVINOS..... 16

FIGURA 3. POBLACION CELULAR OBTENIDA DE LOS LAVADOS PULMONARES. DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA SOBRE LA SUPERFICIE DE MACROFAGOS ALVEOLARES. FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS DE CARNERO MEDIADA POR OPSONINAS SERICAS..... 24

TITULO: OBTENCION ANTE MORTEM DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE BO- REGOS Y SU PARCIAL CARACTERIZACION IN VITRO.

RESUMEN:

Se desarrolló una técnica de lavado pulmonar para la recolección de macrófagos alveolares (MA) en ovinos vivos. Los animales fueron anestesiados disociativamente con una combinación de xilazina (rompún) y ketamina (ketalar) e intubados endotraquealmente con la ayuda de un laringoscopio. Para realizar los lavados pulmonares, se introdujeron a través de la sonda endotraqueal, alíquotas de una solución salina balanceada suplementada con glu-
cosa. Las células obtenidas fueron adheridas a vidrio y se determinaron re-
ceptores de membrana para la fracción Fc de IgG y para complemento, así co-
mo fagocitosis mediada por éstas opsoninas. El volumen recuperado de la so-
lución de lavado fue del $60 \pm 10\%$. La población promedio de MA fue de $73.5 \pm 7.8\%$ con una viabilidad del $90.8 \pm 5.8\%$. El número total de células re-
colectadas por ml. fue de $8.6 \pm 1.9 \times 10^4$. Se determinaron receptores de mem-
brana para IgG en el $79.6 \pm 14.9\%$ de las células y para complemento en el $49.8 \pm 10.9\%$. En tanto la fagocitosis mediada por IgG fué del $54.6 \pm 15.7\%$ y de $31 \pm 15.1\%$ para complemento.

INTRODUCCION:

El epitelio respiratorio es una de las superficies más extensas del organismo que interactúa directamente con el medio ambiente (Green, 1977). Como ejemplo, se sabe que el pulmón en el humano, aun en reposo se encuentra expuesto aproximadamente a 9 000 litros de aire cada 24 horas (Turner-Warwick, 1980). Por otra parte, el aire contiene en suspensión todo tipo de partículas contaminantes, entre las cuales podemos contar agentes infecciosos, toxinas químicas y partículas minerales.

El depósito de partículas inhaladas sobre el epitelio del aparato respiratorio va a depender del tamaño de éstas partículas; por ejemplo, en el hombre las partículas de 50 a 20 micras se depositan fundamentalmente en la nariz, aquellas de 20 a 10 micras se depositan en tráquea y primeras bifurcaciones bronquiales. En tanto, las que miden entre 10 y 2 micras se depositan en bronquiolos de 1°, 2° y 3^{er} orden. Las partículas que fluctúan entre 2 y 0.5 micras se impactan en el alveolo, siendo por ello las más peligrosas ya que alcanzan directamente las porciones más vulnerables del pulmón como son los bronquiolos terminales y los alveolos, su eliminación o neutralización depende de la actividad de los macrófagos alveolares (MA), los cuales ya cargados de partículas, migran hacia los bronquiolos terminales de donde son depurados por el movimiento ciliar ascendente. Las partículas menores a 0.5 micras no se impactan y salen expiradas. De tal forma, existe una línea limítrofe a nivel del bronquiolo terminal escasamente defendida por cilios por una parte y por macrófagos por la otra. Así, muchos agentes se depositan en ésta región y es por eso que el daño máximo, en las primeras etapas de algunas enfermedades tiende a localizarse en ésta zona (Turner-Warwick, 1980).

El tracto respiratorio se extiende desde la nasofarin-

ge hasta los espacios alveolares, se encuentra recubierto por un epitelio ciliado desde la tráquea hasta los bronquiolos terminales, el cual disminuye gradualmente en espesor. En el sitio de unión de los bronquiolos terminales y los bronquiolos respiratorios (unión bronquialveolar), el epitelio ciliado cambia radicalmente dando lugar a un epitelio de células aplanadas que recubre los espacios aéreos distales. La unión bronquialveolar es el lugar anatómico designado arbitrariamente para dividir las vías respiratorias altas de las bajas, debido a las diferencias estructurales y funcionales que existen antes y después de este sitio (Dellman, 1976; Kaltreider, 1976).

Las partículas inhaladas encuentran una variedad de mecanismos de defensa pulmonar que van desde los clasificados como físicos no inmunológicos, hasta los muy complejos inmunológicos específicos (Turner-Warwick, 1980), los cuales van a prevenir el contacto de las partículas con los tejidos respiratorios vulnerables. El daño a éstos mecanismos de defensa por agentes patógenos puede resultar en enfermedad respiratoria (Green, 1977).

Actualmente se conocen dos clases de macrófagos, los libres y los fijos. Dentro de los macrófagos libres se consideran cuatro tipos de células o subdivisiones; macrófagos del tejido conjuntivo o histiocitos, macrófagos de las serosas, macrófagos de exudados inflamatorios y macrófagos alveolares. Los tres primeros tipos tienen características estructurales y funcionales similares, en cambio los MA poseen numerosos rasgos distintivos (Carr, 1975).

Los MA son más grandes que los macrófagos peritoneales, contienen una cantidad moderada de retículo endoplásmico liso y relativamente escaso retículo endoplásmico rugoso. Además existen numerosos procesos e invaginaciones en su membrana. Contienen numerosas inclusiones o lisosomas con figuras mielínicas o de ferritina en su interior. Ocasionalmente éstas estructuras son pa-

racristalinas. Las mitocondrias generalmente son numerosas (Carr, 1975).

Los macrófagos en general tienen su origen en la médula ósea, siendo sus precursores el monoblasto y promonocito. Ha sido motivo de gran controversia el tratar de dilucidar el origen de los MA, los cuales se localizan en el tejido intersticial de la pared alveolar y libres en el lumen de los alveolos (Carr, 1975).

En estudios recientes se ha sugerido que si bien los MA parecen provenir inicialmente de la médula ósea, más tarde pueden adquirir capacidad para la proliferación local, manteniendo así una población limitada en el pulmón que luego se independiza de la circulación sanguínea (Turner-Warwick, 1980).

La función del MA es muy compleja, ya que fagocita una amplia gama de material inhalado como son bacterias, virus, hongos, protozoarios, así como polvo orgánico e inorgánico (Green, 1977). Por otra parte, también son capaces de fagocitar material que llega a depositarse en los alveolos como son eritrocitos, desechos celulares y complejos antígeno-anticuerpo (Laskin, 1972).

El proceso de fagocitosis se divide en cuatro fases, que incluyen el reconocimiento de partículas por fagocitar, o quimiotaxis, adherencia de la partícula a la membrana, internalización (ingestión) y digestión. En la primera fase de la fagocitosis, la célula primero reconoce agentes microbianos, lo que generalmente es facilitado por sustancias quimiotácticas y opsoninas séricas como IgG y complemento. La segunda etapa es la firme unión entre la partícula y el macrófago. Las partículas a fagocitar generalmente muestran un potencial electrostático negativo en su superficie, por lo que no se produce agregación espontánea con el macrófago. Este potencial es neutralizado con la ayuda de las opsoninas séricas, las cuales además se unen con los receptores específicos para IgG y el complemento sobre la célula

fagocítica (Tizard, 1977; Peterson, 1983; Frank, 1983).

Una vez unida firmemente a la membrana del macrófago, la partícula desencadena en dicha membrana fenómenos locales con los cuales el citoplasma de la célula se desplaza hasta cubrir y rodear la partícula (internalización) formando así el fagosoma. La partícula puede ser destruida cuando se vierten al fagosoma enzimas hidrolíticas almacenadas en los lisosomas de la célula, formándose lo que se conoce como fagolisosoma (digestión). La inactivación o destrucción de la partícula fagocitada depende de su susceptibilidad a las enzimas del lisosoma dentro del fagolisosoma (Tizard, 1977).

En las etapas iniciales de infecciones bacterianas el MA constituye un sistema indispensable de defensa pulmonar (Fox, 1973). Se han desarrollado varios métodos para la recolección de MA y su estudio in vitro, siendo el principal método a través de lavados pulmonares. En el hombre estos lavados se han utilizado en forma extensiva en el tratamiento de enfermedades pulmonares obstructivas, microlitiasis alveolar, neumonías químicas y asma bronquial remitente (Kastello, 1979).

En animales los MA son relativamente difíciles de obtener. En la mayoría de los estudios realizados ha sido necesario sacrificar los animales de experimentación para la recolección de éstas células (Myrvik, 1961; Brain, 1968; Fox, 1973; Williams, 1978; Moolenbeek, 1982). En trabajos aun más recientes se ha logrado la obtención de MA sin tener que sacrificar a los animales y con resultados aparentemente satisfactorios (Mauderly, 1977; Kastello, 1979; Rebar, 1980; Trigo, 1984b).

A la fecha, en la literatura mundial no se encuentran reportes de la colección de MA en ovinos utilizando técnicas ante mortem por lo que se considera necesario desarrollar ésta técnica para evaluar éstas células in vitro. La colección de MA con una técnica ante mortem tiene la ventaja de que se pueden

hacer evaluaciones periódicas de las células colectadas a través de lavados pulmonares en diferentes períodos de vida del animal. Por otra parte, los animales pueden ser expuestos a diferentes partículas inhaladas, lo que permitirá evaluar el efecto de éstas partículas sobre el mecanismo de defensa representado por el MA.

El estudio de MA es considerado de importancia, ya que como se ha hecho mención, ésta célula constituye la primera barrera de defensa del pulmón a nivel alveolar (Fox, 1973). Entre las múltiples evaluaciones que se pueden llevar a cabo en MA de animales y del hombre *in vitro*, se encuentra la detección de receptores de membrana para la fracción Fc de inmunoglobulina 7s (Mellwicz, 1982). El receptor Fc puede ser definido como un sitio en la membrana de la célula que es capaz de adherirse a la porción Fc de IgG. La composición del receptor Fc ha sido investigada y se sabe que el receptor en ocasiones es sensible a tripsina dependiendo de la subclase de receptor (Unkeless, 1977). La interacción entre el receptor y la porción Fc puede resultar en fagocitosis mediada por Fc y puede jugar un papel importante en la interacción macrófago-linfocito (Zuckerman, 1979). La evaluación de éstos receptores es necesaria, ya que éstos son importantes en el proceso de fagocitosis (adherencia e internalización) de algunos agentes infecciosos (Dyer, 1983). Por otra parte, se conoce que éstos receptores varían en número cuando existen infecciones virales o presencia de algunas sustancias tóxicas (Dyer, 1983; Trigo, 1984a).

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo es el de desarrollar un método inocuo de lavado pulmonar en ovinos vivos para la recolección, cultivo y caracterización parcial in vitro de macrófagos alveolares.

MATERIAL Y METODOS:

ANIMALES: Se utilizaron 4 borregos Tabasco, adultos, clínicamente sanos de 2 a 3 años de edad, los cuales fueron alimentados con una dieta de mantenimiento y se mantuvieron en corrales techados con piso de concreto.

También se utilizaron 2 conejos adultos, los cuales tuvieron una dieta a base de alimento comercial y agua ad libitum, mantenidos en jaulas individuales en forma de batería para la obtención de antisuero (IgG) anti-eritrocito de carnero.

Se utilizaron 10 ratas adultas, las cuales se alimentaron con una dieta a base de alimento comercial para la obtención de antisuero (IgG) anti-eritrocito de carnero.

Fueron utilizados 40 ratones adultos para la obtención de complemento.

ANESTESIA: Para la recolección de MA, cada borrego fue anestesiado disociativamente utilizando como preanestésico hidrocloreuro de xilazina (rompún al 2 % lab. Bayer de México) a una dosis de 0.6 mg/kg de peso por vía intramuscular en la región del cuello. Bajo el efecto tranquilizante del rompún (aproximadamente 5 minutos después de su aplicación) se administró por vía intravenosa hidrocloreuro de ketamina (ketalar, Lab. Cia. Medicinal "La campana" de México) a una dosis de 5.0 mg/kg de peso (Cendejas, 1979).

OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES: Esta técnica es una modificación a la utilizada por Trigo (1984b) en bovinos. Bajo anestesia, el animal fue colocado en decúbito dorsal e intubado intraesofágicamente con una sonda de polivinil de 1.5 cm de diámetro por un metro de largo. Con la ayuda de un abre bocas de metal y utilizando un laringoscopio con hoja del # 3 se retra-

jo ligeramente la glotis para introducir a la tráquea, hasta sentir una ligera resistencia, un tubo de polipropileno con un diámetro exterior de 0.6 cm por 60 cm de largo con punta roma (Figura 1). En el extremo libre o externo del tubo se conectó una jeringa desechable de plástico con capacidad de 20 ml. Se introdujeron lentamente alíquotas de 20 ml de una solución salina balanceada suplementada con glucosa (apéndice 1) a temperatura ambiente (Figura 2) inmediatamente con la misma jeringa se hizo succión ligera del émbolo para recolectar la solución conteniendo las células pulmonares. Este procedimiento fue repetido 5 o 6 veces introduciendo un total de 100 a 120 ml de la solución de lavado.

La solución conteniendo las células pulmonares se depositó en tubos de centrifuga de polivinil con capacidad de 50 ml y fueron colocados en baño de agua fría a una temperatura aproximada de 4°C. Después de la obtención de células se procedió a retirar la sonda endotraqueal retrayéndola lenta y uniformemente. Para contrarrestar el efecto de la anestesia se le administró al animal efedrina (refrina, Lab. Hoechst de México) a una dosis de 35 mg/kg de peso por vía subcutánea. Transcurridos 10 minutos de la aplicación de efedrina se retiró la sonda esofágica.

VIABILIDAD Y CONTEO DE CELULAS: El número total de células fue determinado tomando con tubos capilares alíquotas de la suspensión de células, colocándolas en una cámara cuentaglóbulos de Neubauer y realizando el conteo directo en los cuadros de los extremos (0.4 mm^3). El número de células contado fue dividido entre 4 y multiplicado por 10 000 para obtener así, el número total de células por ml. La viabilidad fue determinada utilizando la técnica de exclusión de azul de tripan al 2% en solución (Mishell, 1980).

Se determinó la población celular recolectada antes

del cultivo, para lo cual se colocaron las células pulmonares sobre portaobjetos de vidrio, fijándolas con metanol absoluto durante 5 minutos y tiñendolas con la técnica de Giemsa (Benjamin, 1974).

CULTIVO DE CELULAS: Los tubos de polivinil con 50 ml de la solución de lavado fueron colocadas en una centrífuga con unidad refrigerante y centrifugadas a 150 g durante 10 minutos. El fluido fue decantado y el paquete de células se resuspendió en medio 199. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces resuspendiendo finalmente en medio 199 con 10 % de suero fetal de ternera, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g por ml de estreptomocina y fungizona en relación 1: 2000 ajustando la concentración de células a 10^5 por ml.

Se utilizaron microplacas de 24 pozos de plástico para cultivo de células. Se colocaron cubreobjetos redondos de vidrio en el fondo de los pozos. En forma estéril se depositó 1 ml de la suspensión de células en cada uno de los pozos. La placa fue colocada por un período de 45 minutos a 37°C en una atmósfera conteniendo 2 % de CO_2 para facilitar la adherencia de los MA sobre la superficie de vidrio.

Las células no adherentes en ese período fueron eliminadas mediante un lavado de los pozos con medio 199. A las células adheridas se les añadió 1 ml de medio 199 con antibióticos, antimicóticos y suero fetal de ternera y fueron incubadas bajo las mismas condiciones de atmósfera y temperatura mencionadas hasta el momento de evaluarlas.

DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA PARA LA FRACCION FC DE IgG SOBRE LA MEMBRANA DE MACROFAGOS ALVEOLARES: Los eritrocitos de carnero fueron lavados 3 veces con PBS ph 7.2 estéril (Benjamin, 1974) por centrifugación a 150 g durante 10 minutos. Finalmente fueron resuspendidos al 10 % con PBS.

Se mezclaron volúmenes iguales de ésta suspensión de eritrocitos al 10 % con IgG anti-eritrocito de carnero en unidades aglutinantes para que al realizarse la mezcla quedara como unidad subaglutinante. Se incubó a 37°C durante 30 minutos para la sensibilización de los eritrocitos. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 150 g durante 10 minutos y se lavó por centrifugación con PBS y fue resuspendida al 2,5 % con medio 199 (Mishell, 1980.)

Los eritrocitos ya sensibilizados fueron incubados con los MA adheridos a vidrio por 15 minutos y por 1 hora a 37°C con una atmósfera con 2 % de CO₂, manteniendo la microplaca en constante movimiento para facilitar el mayor contacto posible de los macrófagos adheridos con los eritrocitos sensibilizados.

Las muestras incubadas por 15 minutos fueron utilizadas como parámetro para determinar la presencia de receptores de membrana para la fracción Fc de IgG. Los eritrocitos libres fueron removidos mediante lavados con PBS. Los cubreobjetos con macrófagos adheridos formando rosetas fueron fijados con metanol absoluto, teñidos con Giemsa y contados (%) en microscopio de luz visible, considerando un macrófago en "roseta" aquel que tuviera por lo menos 3 eritrocitos adheridos a su membrana. Las muestras incubadas durante una hora fueron lavadas con agua destilada para lisis de los eritrocitos no fagocitados, se fijaron y teñieron de igual forma para determinar el % de fagocitosis. Se consideró que existió fagocitosis cuando hubiera al menos un eritrocito en el citoplasma del macrófago.

DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA PARA COMPLEMENTO EN MEMBRANA DE MACROFAGOS ALVEOLARES. Se sensibilizaron eritrocitos de carnero con IgM anti-eritrocito de carnero. Los eritrocitos ya sensibilizados fueron mezclados en proporción 1:1 con el suero de ratón (complemento) diluido 1:3 con PBS e incubados durante una hora a 37°C. La mezcla fue centrifugada y lavada una vez

a 150 g durante 10 minutos con PBS estéril y resuspendida finalmente al 5 % con medio 199 con antibióticos y antimicóticos (Misell, 1980).

Se determinaron receptores de membrana para complemento y fagocitosis mediada por complemento de igual forma que para la fracción Fc de IgG.

OBTENCION DE IgG ANTI-ERITROCITO DE CARNERO: Se obtuvo sangre de un borrego adulto por punción en la vena yugular. La sangre fue suspendida en solución de Alsever's (Apéndice 2) en proporción 1:1. Los eritrocitos se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 10 días para su maduración. Los eritrocitos fueron lavados en forma estéril con PBS 3 veces por centrifugación a 150 g durante 10 minutos y resuspendidos finalmente a una concentración del 10 % con PBS. Esta suspensión se inoculó a 2 conejos adultos a una dosis de 1 ml por kg de peso por vía subcutánea de acuerdo al siguiente calendario: Día 0, 1, 3, 4, 6, 10, 13, 15, 17 y 21. El día 23 post-inoculación los conejos fueron sangrados totalmente por punción cardíaca. Se dió tiempo a la coagulación de la sangre y se procedió a la separación del suero por centrifugación a 300 g durante 20 minutos. Se inactivó a 56°C 30 minutos. Por microtitulación (prueba de Coombs) fueron determinadas las unidades aglutinantes y subaglutinantes. El suero de cada conejo se mantuvo en congelación a - 20°C hasta su uso. (Misell, 1980).

OBTENCION DE IgM ANTI-ERITROCITO DE CARNERO: Se recolectó y manejó la sangre de borrego de igual forma que para la obtención de IgG anti-eritrocito de carnero. Se inocularon 10 ratas por vía intracardíaca con 10^8 eritrocitos suspendidos en PBS. Siete días después de la inoculación las ratas fueron sangradas para la obtención de suero rico en IgM. El suero se manejó y tituló de igual forma que el suero de IgG y se mantuvo en congela-

ción hasta su uso (Mishell, 1980).

OBTENCION DE COMPLEMENTO: Para la obtención de complemento fueron sangrados 40 ratones adultos. Se dio tiempo a la coagulación de la sangre y se procedió a la separación del suero por centrifugación a 300 g durante 20 minutos en una centrifuga refrigerada. El suero fue diluido en proporción 1:3 con PBS estéril y se mantuvo en congelación a - 20°C hasta su uso (Mishell, 1980).

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CARACTERIZACION PARCIAL DE MA DE OVINOS.

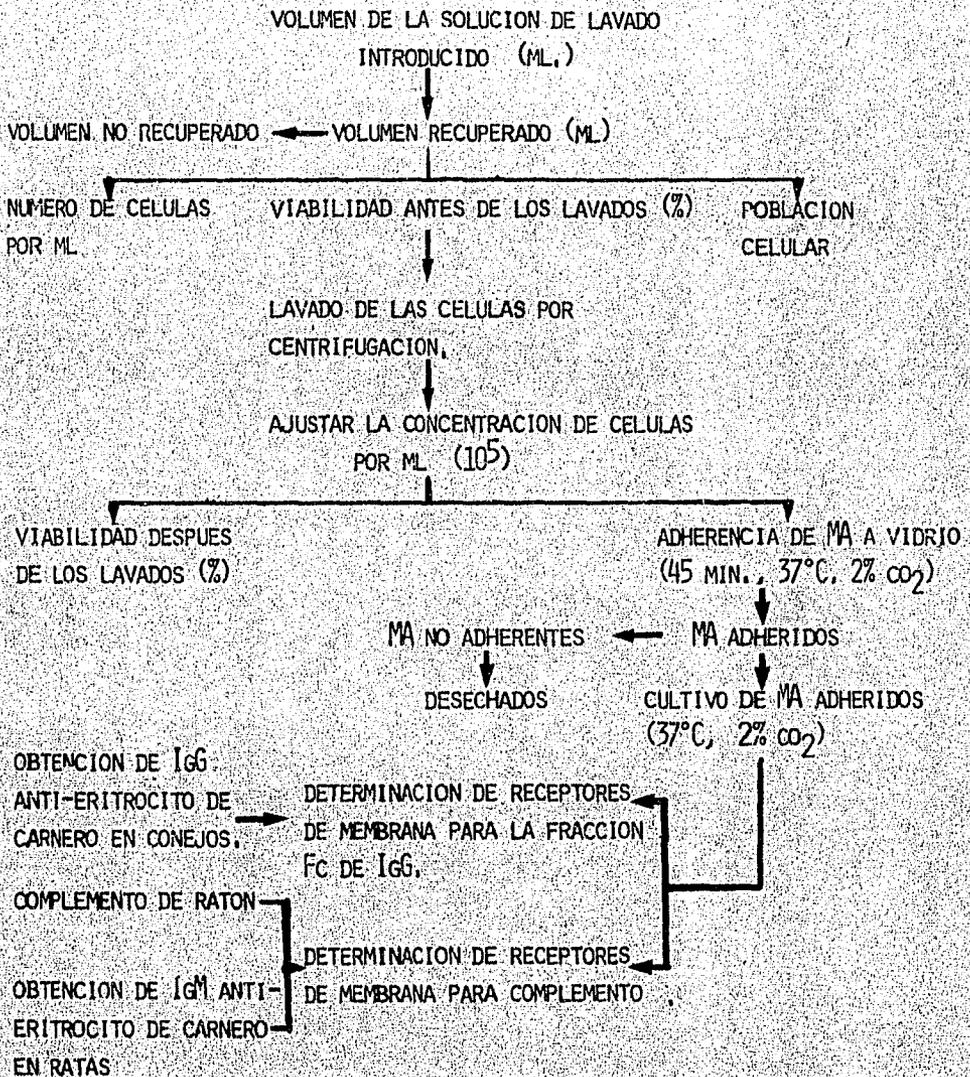
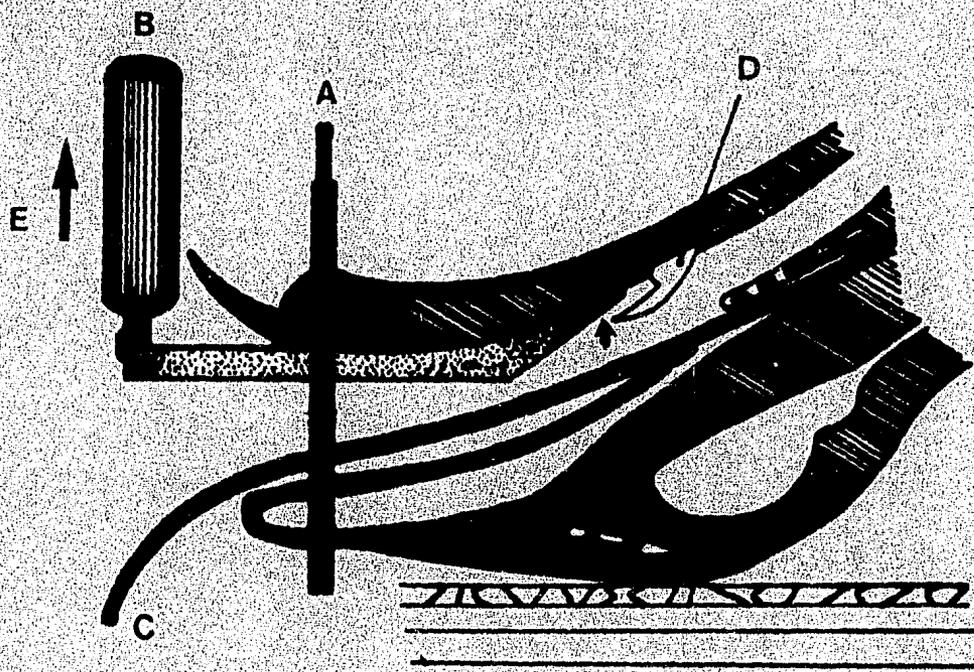
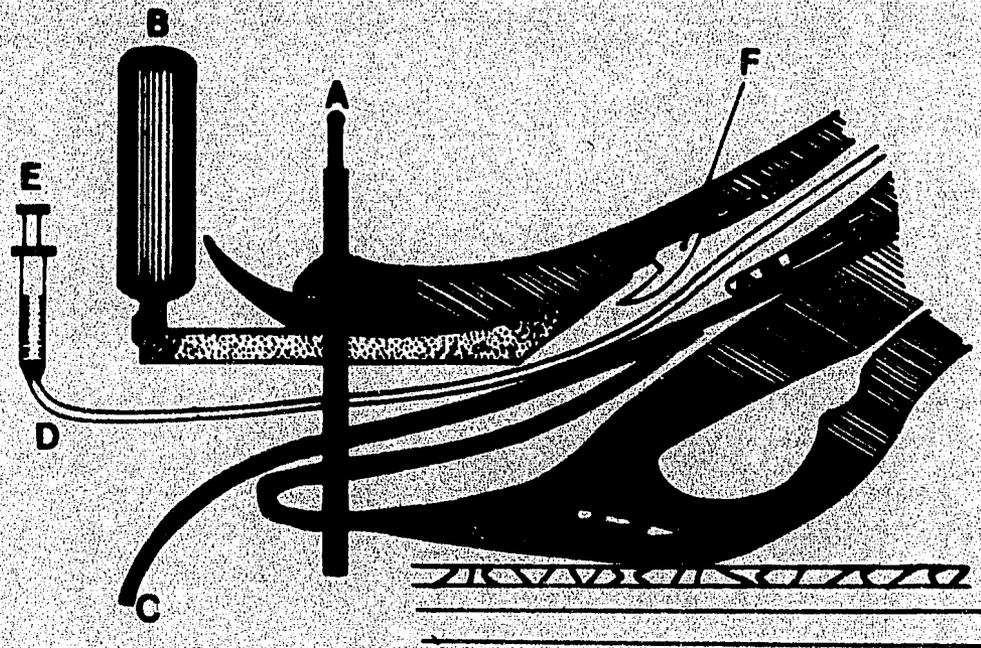


FIGURA 1. USO DEL LARINGOSCOPIO EN LA INTUBACION ENDOTRAQUEAL PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE OVINOS.



A, ABREBOCAS; B, LARINGOSCOPIO; C, SONDA ESOFÁGICA; D, EPIGLOTIS; E, DIRECCION DE ELEVACIÓN.

FIGURA 2. INTUBACION ENDOTRAQUEAL PARA LA OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE OVINOS.



A, ABREBOCAS; B, LARINGOSCOPIO; C, SONDA ESOFÁGICA; D, SONDA ENDOTRAQUEAL;
E, JERINGA; F, EPIGLOTIS.

RESULTADOS:

El tiempo que permanecieron los animales bajo el efecto anestésico con una dosis única de rompún-ketalar fue de 10 a 15 minutos, después de la aplicación de refрина los animales se recuperaron en un lapso de 25-45 minutos. En uno de los animales existió la necesidad de administrar una dosis adicional de ketalar (150 mg), debido a que la dosis inicial no produjo el efecto anestésico deseado.

Se realizaron lavados pulmonares previos en nueve borregos con el fin de perfeccionar la técnica de obtención de las células pulmonares (cuadro 1). El volumen recuperado de la solución de lavado fue del 55.8 ± 9.3 %, obteniéndose una viabilidad antes y después de los lavados celulares de 83.0 y 82.4 % respectivamente. En los borregos 2 y 4 la viabilidad después de los lavados celulares no pudo ser determinada debido a que la solución de lavado pulmonar contenía una moderada cantidad de moco al cual se adhirieron las células pulmonares durante la centrifugación.

En el borrego 6 el número de células pulmonares por ml fue elevado en comparación con los demás animales. El recuento diferencial de leucocitos obtenido en éste animal fue de 93 % linfocitos, 6 % macrófagos y 1 % neutrófilos. En el resto de los animales la población celular recolectada promedio fue de 73 % macrófagos, 25 % linfocitos y 2 % neutrófilos.

El cuadro 2 muestra los resultados obtenidos de lavados pulmonares en 10 ovinos para la recolección de MA, a los cuales se les evaluó adherencia e internalización mediada por IgG y complemento. El volumen recuperado de la solución de lavado fue del 60.0 ± 10.0 %. La viabilidad antes de los lavados por centrifugación fue de 90.8 ± 5.85 % y 87.3 ± 7.42 % después de la centrifugación.

La población celular fue de 73.5 ± 7.8 % macrófagos; 20.6 ± 6.8 % linfocitos; 5.8 ± 2.8 % neutrófilos y 0.1 ± 0.3 eosinófilos (cuadro 3).

La adherencia de eritrocitos de carnero sensibilizados a receptores de membrana específicos para la fracción Fc de IgG fue de 79.6 ± 14.9 %, en tanto la fagocitosis mediada por IgG fue calculada en 54.6 ± 15.7 % a los 45 minutos de adheridos (cuadro 4).

La adherencia e internalización de eritrocitos de carnero mediada por complemento fue menor que por IgG, determinándose receptores para complemento en el 49.8 ± 10.9 % de los macrófagos y fagocitosis en el 31.0 ± 15.1 % (cuadro 5).

CUADRO 1. DATOS BASALES DE LAVADOS PULMONARES PARA LA RECOLECCION DE MA DE OVINOS

BORREGO	VOLUMEN INTRODUCIDO (ML)	VOLUMEN RECUPERADO (%)	VIABILIDAD ANTES DE LOS LAVADOS CELULARES (%)	VIABILIDAD DESPUES DE LOS LAVADOS CELULARES (%)	NO. DE CELULAS X ML x 10 ⁴
1	100	68.0	70	58	5.5
2	100	60.0	66	-	7.0
3	120	41.6	96	86	12.0
4	120	50.0	70	-	5.7
5	120	45.8	82	80	10.5
6	120	66.6	93	93	39.7
7	120	58.3	89	80	8.5
8	120	50.0	85	83	7.0
9	80	62.5	96	96	11.5
\bar{X}	111	55.8	83	82.4	11.9
DS	± 14.5	± 9.3	± 11.5	± 12.4	± 10.6

CUADRO 2. LAVADOS PULMONARES EN BORREGOS PARA LA RECOLECCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE MA.

BORREGO	VOLUMEN INTRODUCIDO (ML)	VOLUMEN RECUPERADO (%)	VIABILIDAD ANTES DE LOS LAVADOS CELULARES (%)	VIABILIDAD DESPUES DE LOS LAVADOS CELULARES (%)	NO. DE CELULAS POR ML. $\times 10^4$
1	120	58.3	92	90	7.0
2	80	50.0	90	88	9.0
3	90	44.4	90	73	6.0
4	95	52.0	82	75	8.0
5	120	66.6	85	84	10.2
6	120	62.5	95	93	12.7
7	120	64.0	93	92	10.0
8	90	58.0	95	93	6.5
9	100	65.0	90	90	8.5
10	100	80.0	96	94	9.0
X	103.5	60.0	90.8	87.3	8.6
DS	± 15.2	± 10.0	± 5.8	± 7.4	± 1.9

CUADRO 3. RECUENTO DIFERENCIAL DE CELULAS RECOLECTADAS MEDIANTE LAVADOS PULMONARES

BORREGO	MACROFAGOS (%)	LINFOCITOS (%)	NEUTROFILOS (%)	EOSINOFILOS (%)
1	67	27	6	0
2	73	22	5	0
3	76	14	9	1
4	71	23	6	0
5	82	15	3	0
6	58	32	10	0
7	70	21	9	0
8	73	26	1	0
9	80	16	4	0
10	85	10	5	0
\bar{X}	73,5	20,6	5,8	0,1
DS	$\pm 7,8$	$\pm 6,8$	$\pm 2,8$	$\pm 0,3$

CUADRO 4. ADHERENCIA E INTERNALIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO POR MA MEDIADA POR IgG.

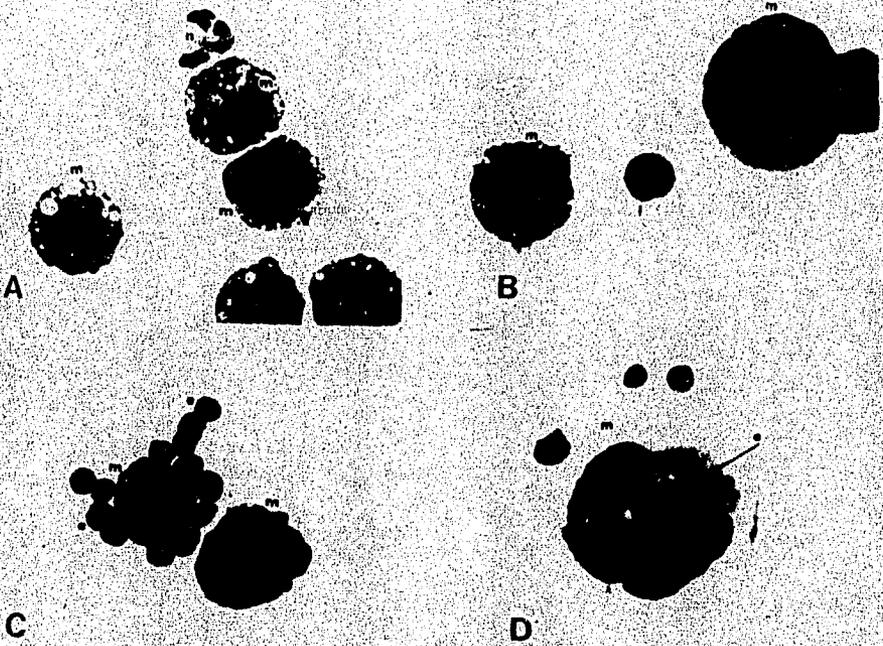
BORREGO

	RECEPTORES DE MEMBRANA PARA LA FRACCION Fc DE IgG (%)	FAGOCITOSIS MEDIADA POR IgG (%)
1	58	
2	53	61
3	91	48
4	77	70
5	76	50
6	76	58
7	82	38
8	84	42
9	96	70
10	97	79
		30
\bar{X}	79.6	54.6
DS	± 14.9	± 15.7

CUADRO 5. ADHERENCIA E INTERNALIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO POR MA MEDIADA POR COMPLEMENTO

BORREGO	RECEPTORES DE MEMBRANA PARA COMPLEMENTO (%)	FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO (%)
1	50	25
2	67	10
3	37	40
4	45	30
5	50	50
\bar{X}	49.8	31.0
DS	± 10.9	± 15.1

FIGURA 3.



A y B : POBLACION CELULAR OBTENIDA DE LOS LAVADOS PULMONARES macrófago (m), linfocito (l), neutrófilo (n).

C : DETERMINACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA SOBRE LA SUPERFICIE DE MACROFAGOS A TRAVES DE LA FORMACION DE "ROSETAS" macrófago (m), eritrocito (e).

D : FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS DE CARNEPO MEDIADA POR OPONINAS SERICAS macrófago (m), eritrocito fagocitado (e).

DISCUSION:

El tiempo que permanecieron los animales bajo el efecto de la anestesia concuerda con los reportes en la literatura (Cendejas, 1979) y fue suficiente para practicar el lavado pulmonar con facilidad. La técnica utilizada en éste trabajo para la recolección de MA es relativamente sencilla, ya que el tiempo y el manejo al que fueron sometidos los animales fue mínimo.

Esta técnica es una modificación a la reportada por Trigo (1984b) con resultados similares. Tiene la ventaja que no se utilizan aparatos sofisticados como en trabajos realizados por Mauderly (1977) y Rebar (1980) en otras especies.

La sonda esofágica fue utilizada con el fin de evitar la timpanización del animal, así como para evitar rejurgitamiento y mantener la cavidad oral libre de contenido ruminal.

El método anestésico es altamente seguro como lo demuestran también experimentos realizados por Curl (1983) y Waterman (1983) en hámsters y bovinos respectivamente. El tiempo de recuperación de los animales es rápido y se consideró que no se produjo daño a los tejidos pulmonares, ya que se utilizó una sonda endotraqueal con punta roma y no se observó evidencia clínica de neumonía en los animales sometidos a lavado pulmonar en un período de 30 días posteriores al lavado.

El volumen recuperado de la solución de lavado fue menor que el obtenido por Castello (1979), Mauderly (1977), Rebar (1980) y Trigo (1984b) quienes reportan valores superiores al 60 %, sin embargo el volumen recuperado en éste trabajo fue suficiente para la evaluación de las células pulmonares debido a que el número de células recolectadas y la viabilidad fueron tan altas como las obtenidas por estos investigadores.

La población elevada de linfocitos obtenida en uno de

los animales del cual también se obtuvo un número elevado de células (cuadro 1) pudo ser debido a que al introducir la sonda endotraqueal, el extremo interior de ésta posiblemente quedó cercana a una área de acumulación linfoide peribronquial que normalmente se encuentran rodeando a los bronquios.

La razón por la cual se evaluaron células adheridas a vidrio fue para tener una población mas homogénea de células, con el objeto de reducir la variabilidad entre las células evaluadas.

Los receptores de membrana para la fracción Fc de IgG y complemento han sido determinados por otros investigadores en diversas especies. En cerdos, Charley (1980) demostró receptores de membrana para IgG en el 80 % de los macrófagos y 74% para complemento. En humanos, Reynolds (1975) demostró 94 % para complemento y de 70 a 90 % para IgG. Diamond (1978) y Větvička (1984) demostraron el 90 % de receptores para IgG sobre la membrana de macrófagos. En éste trabajo se demuestra que los receptores de membrana de MA de ovinos para la fracción Fc de IgG existen en similar proporción a los reportados en los trabajos mencionados en otras especies. Sin embargo los receptores para complemento se encontraron en menor proporción, lo que indicaría que probablemente existe menor actividad fagocítica en los MA de ovinos mediada por complemento.

La no formación de rosetas en las demás células pudiera deberse a que existen subpoblaciones de macrófagos inmaduros con escasa capacidad fagocítica debido a la ausencia de receptores de membrana.

Cabe hacer mención que el número de eritrocitos adheridos a macrófagos formando "rosetas" frecuentemente era menor en la evaluación de receptores para complemento en proporción con los eritrocitos observados en la determinación de receptores para IgG. Probablemente ésto se deba a que existe menor cantidad

de receptores de membrana para complemento en éstas células.

Este trabajo demuestra que los receptores de membrana para IgG y complemento in vitro son importantes para la fagocitosis de eritrocitos de carnero mediada por éstas opsoninas. Es por lo tanto razonable pensar que éstos receptores tienen la misma función in vivo y juegan un papel importante en la fagocitosis de bacterias opsonizadas.

La técnica desarrollada para la obtención de MA de borregos ofrece innumerables perspectivas ya que permitirá la evaluación de éstas células en diferentes períodos de vida del animal, así como para conocer el efecto de diversos agentes patogénicos in vivo e in vitro que se ven involucrados en problemas respiratorios de éstos animales sobre las características morfofisiológicas de la célula fagocítica primaria del pulmón a nivel alveolar.

En la literatura existen reportes del efecto de Pasteurella haemolytica en suspensiones de MA de ovinos (Sutherland, 1983) en donde se reporta que P. haemolytica produce una sustancia inespecífica la cual es citotóxica para MA, sin embargo éstos MA fueron obtenidos de pulmones de animales sacrificados en rastro. Con la técnica descrita en éste trabajo, se pueden tener animales de experimentación bajo condiciones controladas y hacer evaluaciones secuenciales de éstas células durante distintas etapas de vida del animal (in vitro) o seguir el desarrollo de alguna enfermedad del tracto respiratorio (in vivo). Asimismo, con éste tipo de lavados también se podrían evaluar los niveles de algunas sustancias dentro del pulmón en casos de neumonía (como pudiesen ser niveles y relación de inmunoglobulinas o cantidades de proteínas en los fluidos) y hasta obtener surfactante, el cual pudiese ser evaluado como agente opsonizante.

APENDICE:

1.- SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA SUPLEMENTADA CON GLUCOSA (RINALDINI, 1959; WALKER, 1984).

Na Cl.....	8.0 g
KCl.....	0.2 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ . 2H ₂ O.....	1.0 g
H CO ₃	1.0 g
Na H ₂ PO ₄ . H ₂ O.....	0.5 g
GLUCOSA.....	1.0 g
E.D.T.A.	2.0 g
Agua Destilada.....	CBP 1000 ml.

Para preparar la solución estéril, se mezclan todos los reactivos excepto el H CO₃ el cual se esteriliza por separado.

2.- SOLUCIÓN DE ALSEVER'S (MISHELL, 1980)

Na Cl.....	4.18 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ . 2 H ₂ O.....	8.0 g
GLUCOSA.....	1.0 g
ACIDO CITRICO.....	0.55 g
Agua destilada	CBP 1000 ml.

**** Ambas soluciones se esterilizan a 10 libras de presión durante 10 minutos o por filtración.

LITERATURA CITADA:

- Benjamin, M.M., 1974. Outline of Veterinary Clinical Pathology. 2nd ed., The Iowa state University Press. Iowa, U.S.A., 43-50.
- Brain, J.D. and Frank, N.R., 1968. Recovery of free cells from rat lungs by repeated washings. J. Appl. Physiol., 5:63-69.
- Carr, I.A., 1975. The macrophage. A review of ultrastructure and function. 1st ed., Academic Press. New York, U.S.A. 17-19.
- Cendejas, S.J., 1979. Anestesia disociativa en ovinos. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F.
- Charley, B. and Frenove, B., 1980. Fc and C₃ receptors of swine alveolar macrophages. Res. Vet. Sci., 28: 380-381.
- Curl, J.L. and Peters.L.L., 1983. Ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride anaesthesia in the golden hamster (Mesocricetus auratus). Lab. Anim., 17: 290-293.
- Dellman, H.D. and Brown, E.M., 1976. Textbook of Veterinary Histology. 1st ed., Lea and Febiger. Philadelphia, U.S.A.
- Diamond, B., Bloom, B.R. and Scharff, M.D., 1978. The Fc receptors of primary and cultured phagocytic cells studied with homogeneous antibodies. J. Immunol., 121: 1329-1333.
- Dyer, R.M. and Wes, L.R., 1983. Surface receptors for IgG and complement on equine alveolar macrophages. Inflammation, 7: 183-195.
- Fox, M.L., 1973. The bovine alveolar macrophage: I. Isolation, in vitro cultivation, ultrastructure, and phagocytosis. Can. J. Microbiol., 19: 1207-1210.
- Frank, T., Anderson, K.L., Smith, A.R., Whitmore, H.L. and Gus-

- tafsson, B.K., 1983. Phagocytosis in the uterus: A review. Theriogenology, 20: 103-110.
- Green, G.M., Jakab, G.J. and Low, R.B., 1977. Defense mechanisms of the respiratory membrane. Am. Rev. Respir. Dis., 115: 479-514.
- Kaltreider, H.B., 1976. Expression of immune mechanisms in the lung. Am. Rev. Res. Dis., 113: 347-379.
- Kastello, M.D., Emmert, A.D., Denson, R.F. and Kishimoto, R.A., 1979. Recovery of alveolar macrophages from Rhesus and Cynomolgus macaques by lung lavage. Am. J. Vet. Res., 40: 271-273.
- Laskin, A.I. and Lechevalier, H., 1972. Macrophages and cellular immunity. 1st ed., The Chemical Rubber Co., U.S.A. 13-44.
- Mauderly, J.L., 1977. Bronchopulmonary lavage of small laboratory animals. Lab. anim. Sci., 27: 255-261.
- Melewicz, F.M., Kline, L.E., Cohen, A.B. and Spiegelberg, H.L., 1982. Characterization of Fc receptors for IgG on human alveolar macrophages. Clin. Exp. Immunol., 49: 364-370.
- Mishell, B.B. and Stanley, M.S., 1980. Selected methods in cellular immunology. 1st ed., W.H. Freeman and Co., San Francisco, U.S.A. 219-224.
- Moolenbeek, C., 1982. Obtaining alveolar macrophages from small laboratory rodents. Lab. Anim., 16: 56-58.
- Myryik, Q.N., Soto, L.E. and Faris, B., 1961. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: A technique to procure them in a high state of purity. J. Immunol., 86: 128-132.
- Peterson, P.K., Keane, W.F., Miller, W., Freiberg, M., Staub, D.

- and Verbrugh, H. A., 1983. Human peritoneal macrophage cytotoxicity mediated by cytophilic IgG. J. Infect. Dis., 148: 1040-1048.
- Rebar, A.H., De Nicola, D.B. and Muggenburg, B.A., 1980. Broncho-pulmonary lavage cytology in the dog: Normal findings. Vet. Pathol., 17: 294-304
- Reynolds, H.Y., Atkinson, J.P., Newball, H.H. and Frank, M.M., 1975. Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. J. Immunol., 114:1813-1819.
- RinaIdini, L.M., 1959. A improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp. Cell Res., 16:477-505.
- Sutherland, A.D., Gray, E. and Wells, P.W., 1983. Cytotoxic effect of Pasteurella haemolytica on ovine bronchoalveolar macrophages in vitro. Vet. Microbiol., 8: 3-15.
- Tizard, I.R., 1979. Inmunología Veterinaria. 1^a ed., Interamericana, México, D.F., 10-24.
- Trigo, E., Liggitt, H.D., Breeze, R.G., Leid, R.W. and Silflow, R.M., 1984b. Bovine pulmonary alveolar macrophages. Ante mortem recovery and in vitro evaluation of bacterial phagocytosis and killing. Am. J. Vet. Res., 45: 1842-1847.
- Trigo, F.J., Breeze, R.G. and Liggitt, H.D., 1984a. Interaction of bovine respiratory syncytial virus and Pasteurella haemolytica in the ovine lung. Am. J. Vet. Res., 45:1671-1977.
- Turner-Warwick, M., 1980. Inmunología del pulmón. 1^a ed., El manual Moderno, México, D.F., 1-55 y 172-216.
- Unkeless, J.C., 1977. The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: Evidence from a variant cell line and di-

- ferential trypsin sensitivity. J. Exp. Med., 145: 931-947.
- Větvička, V., Fornusek, L., Jořub, M., Zídková, J. and Kopeček, J., 1984. Macrophages of athymic nude mice: Fc receptors, C receptors, phagocytic and pinocytic activities. Eur. J. Cell Biol., 35: 35-40.
- Walker, R.D., Schultz, T.W., Hopkins, F.M. and Bryant, M.J., 1984. Growth phase-dependent phagocytosis of Pasteurella haemolytica by bovine pulmonary macrophages. Am. J. Vet. Res., 45: 1230-1234.
- Waterman, A.E., 1983. Effect of a combination of ketamine and xylazine on respiratory gas tensions and acid-base status in calves. Vet. Rec., 113: 517.
- Williams, P.P., 1978. Collection and cultivation of and phagocytosis by pulmonary macrophages obtained from hysterectomy-derived pigs. Am. J. Vet. Res., 39: 485-489.
- Zuckerman, S.H. and Douglas, S.D., 1979. Dynamics of the macrophage plasma membrane. Ann. Rev. Microbiol., 33: 267-307.