

302927 1
2ej

UNIVERSIDAD Femenina de Mexico
UfM

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

CRIOCONSERVACION DE ERITROCITOS DE POLLO PARA UTILIZARLOS EN LA TITULACION DE ANTIGENO Y ANTICUERPO DE RUBEOLA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
Alamilla Hernández Noemi

LIBROS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F.

1987



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.

INDICE

capítulo		páginas
	OBJETIVO	1
	INTRODUCCION	2
I	GENERALIDADES	5
	2.1 Generalidades del virus de rubeola	5
	2.1.1 Antecedentes históricos	5
	2.1.2 Clasificación	6
	2.1.3 Características estructurales y morfológicas .	6
	2.1.4 Composición antigénica	9
	2.1.5 Manifestaciones clínicas de la infección	9
	2.1.6 Diagnóstico de laboratorio	10
	2.2 Hemaglutinación	11
	2.2.1 Antecedentes	11
	2.2.2 Agentes crioprotectores	12
	2.2.3 Congelamiento rápido	13
	2.2.4 Agentes crioprotectores extracelulares	13
	2.3 Generalidades de eritrocitos	14
	2.3.1 Características físicas	14
	2.3.2 Resistencia de los eritrocitos	14
	2.3.3 Criotolerancia de sitios selectivos	15
III	DISEÑO EXPERIMENTAL	17
	3.1 Material y método	17
	3.1.1 Material biológico	17
	3.1.2 Preparación de las soluciones de trabajo	17
	3.1.3 Obtención de eritrocitos de pollo	24

	3.1.4	Técnica de congelación y descongelación	25
	3.1.5	Cuantificación de hemoglobina	26
	3.1.6	Cuenta celular de eritrocitos	27
	3.1.7	Tratamiento de las cosechas virales con tween y éter	27
	3.1.8	Técnica de hemaglutinación	28
	3.1.9	Determinación de anticuerpos séricos contra -- rubeola por inhibición de la hemaglutinación .	28
IV	RESULTADOS		30
	4.1	Determinación de las condiciones de trabajo para la - criopreservación de eritrocitos de pollos recién na- cidos	30
	4.2	Determinación de las condiciones óptimas de trabajo - para la criopreservación de los eritrocitos	34
	4.2.1	Selección del amortiguador	34
	4.2.2	Concentración de eritrocitos	34
	4.2.3	Crioconservadores	37
	4.2.4	Temperatura y osmolaridad	38
	4.2.5	Efecto del tiempo sobre el porcentaje de recu- peración durante la crioconservación de eri-- trocitros	40
V	DISCUSION		45
VI	CONCLUSIONES		48
	BIBLIOGRAFIA		49

OBJETIVO

OBJETIVO

La inhibición de la hemaglutinación es el procedimiento más común para diagnosticar la infección por rubeola. Esta técnica requiere eritrocitos de pollo los cuales deben utilizarse frescos ya que no existe un procedimiento establecido para almacenarlos y conservarlos sin que pierdan su reactividad para la prueba. Las soluciones preservativas anticoagulantes como la de Alsever solo permiten su preservación a corto tiempo, por lo cual el objetivo de este trabajo es estudiar las condiciones óptimas para almacenar y conservar los eritrocitos de pollo recién nacido durante largos periodos de tiempo.

CAPITULO I
INTROUCCION

CAPITULO I.

INTRODUCCION

Una de las principales preocupaciones del hombre ha sido el combatir rápida, eficiente y oportunamente las enfermedades que a través de los siglos ha sufrido la humanidad. Los grandes estragos que han causado estas enfermedades se pueden constatar a través de la historia.

Las estadísticas demuestran que han sido frecuentes las infecciones provocadas por virus, dadas las características geográficas del medio ambiente, históricas, etc. del país, llegando a casos de infecciones populares como son -- las epidemias.

Dentro de las infecciones provocadas por virus tenemos las exantemáticas, o sea, las que se manifiestan en la piel como erupciones, dentro de éstas están las del sarampión, varicela, rubeola, entre otras. (15)

Uno de los virus que ha afectado a los mexicanos, es el virus de rubeola. Se estima que en la Ciudad de México el 90% de los individuos entre 18 y 20 -- años adquirieron la infección naturalmente y poseen protección inmune; si un 10% de la población adulta es susceptible a la infección, suponiendo que en el D.F. existieran 10 000 000 de adultos 1 000 000 sería susceptible a la infección de la rubeola, como podrá observarse representa un porcentaje importante. (28) (30)

Otro aspecto importante con respecto a la infección rubeólica es su capacidad teratogénica con un riesgo de 80 % de malformaciones en el feto cuando la madre se infecta en los tres primeros meses del embarazo. (21)

En el laboratorio clínico se han efectuado diversos estudios sobre las técnicas más adecuadas, efectivas y aplicables para diagnosticar la infección del virus de rubeola.

Para efectuar las pruebas de diagnóstico de la rubeola se han seguido diversas técnicas como son: Neutralización (NT), Fijación de complemento (FC), Hemaglutinación indirecta (HI), Aglutinación en látex (AL), Inmunofluorescencia (IF), Radio inmuno ensayo (RIA), Ensayo inmuno enzimático (ELISA) e Inhibición de la hemaglutinación (IHA). (32)

La IHA es la más comunmente usada y hasta el momento es la técnica de referencia. Esta técnica requiere de antígeno, suero previamente tratado para eliminar inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación y un reactivo percedero que son los eritrocitos frescos, éstos pueden ser eritrocitos humanos tipo "0" o eritrocitos de pollo recién nacido. Una de las limitantes de esta técnica es que ha sido un problema el almacenamiento y conservación de eritrocitos frescos por más de 5 días.

Las pruebas de HA e IHA han sido usadas para detectar antígenos y anticuerpos del virus de rubeola respectivamente.

Los eritrocitos usados en pruebas serológicas presentan problemas de almacenamiento para el diagnosta y el investigador. Las soluciones preservativas --

anticoagulantes como la solución de Alsever son útiles solamente para almacenamiento a corto tiempo; bajo estas condiciones, los eritrocitos muestran una tendencia para retraerse, hemolizarse y perder reactividad; por lo cual, un procedimiento práctico de almacenamiento por tiempo prolongado facilita al laboratorio el uso de eritrocitos.

Para la crioconservación de eritrocitos de pollo, se desarrolló el método descrito por Myhrvold para la crioconservación de eritrocitos de carnero, ya que este método parece minimizar o eliminar las dificultades arriba mencionadas.
(22)

La crioconservación de eritrocitos de pollos recién nacidos fue probada. Las variables experimentales fueron: diferentes amortiguadores, diferentes concentraciones celulares, algunos crioconservadores y dos diferentes temperaturas, además de variar la osmolaridad de los amortiguadores.

Se estableció cuales eran las condiciones óptimas para la crioconservación de los eritrocitos en base a las variables anteriormente mencionadas.

CAPITULO II

GENERALIDADES

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1. GENERALIDADES DEL VIRUS DE RUBEOLA.

2.1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El virus de rubeola, distribuido en todo el mundo, causa enfermedades endémicas y epidémicas siendo el más leve de los exantemas virales comunes.

La magnitud y severidad de la morbilidad han motivado la realización de extensos estudios sobre rubeola y esfuerzos a gran escala para prevenir la infección a través de la inmunización.

La rubeola fue primeramente descrita en la literatura inglesa en 1815 por Maton, quien señaló sus características que la distinguen de la fiebre escarlatina y sarampión (19). La misma enfermedad fue descrita durante los inicios del siglo XVIII en Alemania por DeBergen, pero recibió poca atención hasta que los brotes en otros continentes fueron notados a mediados del siglo XIX. Veale, un cirujano de la fuerza británica trabajando en la India, la llamó "rubeola". Smith --- (primer profesor de pediatría en el Hospital Bellevue) fue el primero que describió la enfermedad en la ciudad de Nueva York en 1874 después de observar un brote en una guardería (34)

Como una enfermedad leve en niños, la rubeola recibió poca atención hasta el reporte en 1941 por Gregg, oftálmologo australiano, el cual mostró que la rubeola en etapa de embarazo induce defectos fetales severos. (8)

En 1962, dos diferentes grupos de investigación reportaron el aislamiento del virus, utilizando cultivos celulares. (29) (41)

En 1964, la devastadora epidemia ocurrida en Estados Unidos, reportó 12.5 millones de casos de los cuales 28 410 fueron de daño fetal congénito. Desde entonces se considera a la rubeola como un problema de salud pública, lo cual ha influido de manera directa en el desarrollo de vacunas y técnicas de diagnóstico de laboratorio. (5)

2.1.2. CLASIFICACION.

El virus de rubeola se encuentra clasificado en la familia Togaviridae y es el único miembro del género rubivirus. (39) (40)

2.1.3. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y MORFOLOGICAS.

El virus de rubeola contiene RNA de cadena simple. Está compuesto por tres proteínas estructurales denominadas E₁, E₂ y C con pesos moleculares de 60 K, 47 K y 33 K respectivamente. Las proteínas E₁ y E₂ son glucoproteínas que se encuentran unidas a la envoltura lipídica, C es una proteína no glucosilada relacionada con el RNA infeccioso, es la nucleoproteína. (27) (39) (40) (Fig. 2.1)

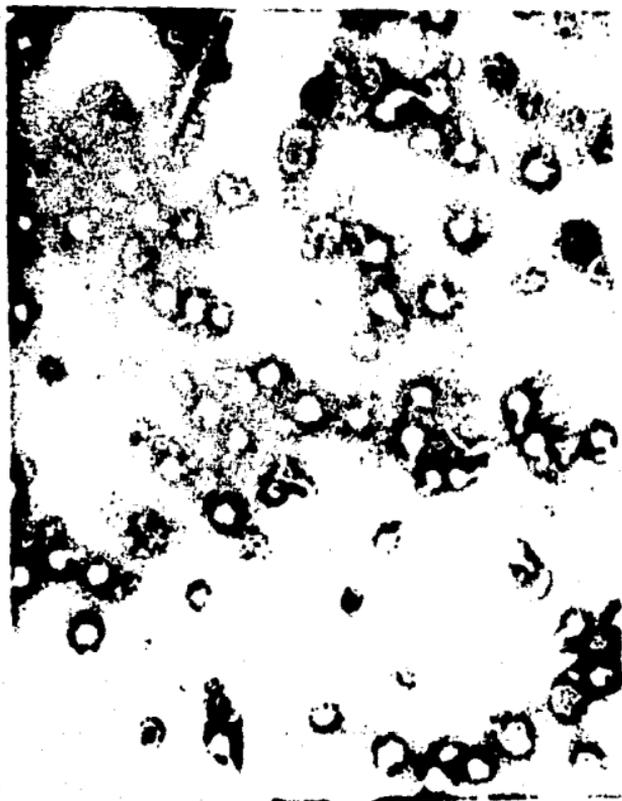


Fig. 2.1 Microscopía electrónica del virus de rubeola obtenida por -
gradiente de sacarosa.

Algunas características del virus de rubeola son mostradas en la tabla 2.1. -
(13) (16)

Forma:	Esférico, 50-70 nm de diámetro, con una o más protuberancias periféricas.
Acido nucleico:	RNA, cadena simple con peso molecular de 3.5×10^6 daltons.
Envoltura:	Tiene envoltura lipídica adquirida al pasar a través de la membrana de la célula huésped, modificada por la inserción de glucoproteínas específicas del virus.
Coefficiente de sedimentación:	280 S
Densidad de flotación:	1.18-1.20 g/ml.
Estabilidad de pH:	6.8-8.1, menor infectividad a 5.9 y completa inactivación a 2.0 .
Destrucción de infectividad:	Con solventes lipídicos, tripsina y radiación ultravioleta.
Temperatura:	Se inactiva con 30 min a 56°C. Estable 7 días a 4°C y por años a -60°C.

Tabla 2.1. Algunas características del virus de rubeola.

2.1.4. COMPOSICION ANTIGENICA.

El virus de rubeola consta de varios antígenos estructurales: la hemaglutinina, los fijadores de complemento y los precipitógenos. (31)

La hemaglutinina de la rubeola (HA antígeno), originalmente preparada a partir de fluidos de cultivos de tejidos y de extractos alcalinos de células infectadas, está asociada con una de las mayores proteínas de la membrana viral y -- aglutina a los eritrocitos de pollos recién nacidos.

La hemaglutinina y los fijadores de complemento son los más utilizados en el diagnóstico de laboratorio. (32)

2.1.5. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA INFECCION.

Existen dos formas de infección rubeólica:

a) La infección postnatal en la cual el virus es transmitido de persona a persona por vía respiratoria, es propia de la infancia, está caracterizada por -- una erupción maculopapular generalizada y linfadenopatía auricular y suboccipital. La fiebre y el malestar son leves y las complicaciones no son comunes. - (13)

b) La infección congénita es aquella en la que el feto es infectado por el paso del virus a través de la placenta y a diferencia de la infección postnatal -- es una enfermedad severa que origina anomalías en el desarrollo fetal. La severidad de los defectos, así como los órganos que involucra depende de la -- edad gestacional en que la infección materna ocurra. (3) (5)

El riesgo de malformaciones es alto (80%) durante los tres primeros meses del embarazo (organogénesis) y decrece a un 10% en los últimos meses. (21)

El síndrome de rubeola congénita se caracteriza por uno o varios de los siguientes defectos teratogénicos: sordera, cataratas, retardo mental y enfermedades congénitas del corazón. En los primeros meses de gestación causa muerte del feto y aborto espontáneo. (5) (6)

El virus se encuentra en la sangre, heces y orina generalmente a partir del séptimo día y hasta el décimo cuarto día después de la infección. (4) (16)

2.1.6. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico de rubeola solo puede ser establecido definitivamente por pruebas virológicas o serológicas específicas. (31)

Las pruebas virológicas corresponden a los métodos directos, los cuales consisten en el aislamiento del virus de muestras clínicas, que se logra a través de su multiplicación en cultivos celulares. (31)

Las pruebas serológicas corresponden a los métodos indirectos y están basadas en la demostración de inmunoglobulinas de tipo M o bien de un incremento significativo de anticuerpos en general contra el virus dentro del curso de la enfermedad. (31)

Se dispone de diversas técnicas serológicas, las cuales forman la base del diagnóstico de laboratorio. La más utilizada es la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA), la cual se fundamenta en que la capacidad del virus de rubeola para aglutinar los eritrocitos de diferentes especies animales se ve bloqueada si antes de adicionar los eritrocitos se hace reaccionar el virus con sus anticuerpos específicos. (36)

2.2. HEMAGLUTINACION.

2.2.1. ANTECEDENTES.

La hemaglutinación por rubeola fue reportada por primera vez por Stewart y -- Halonen en 1967. La técnica serológica que utiliza esta característica del vi-- rus para determinar niveles de anticuerpos es la IHA. (36)

Esta técnica es considerada de referencia por varias razones como son: 1) ser -- una prueba relativamente fácil de realizar, 2) no requiere de equipo especial, 3) los reactivos pueden adquirirse comercialmente y lo más importante, el he-- cho de que los anticuerpos contra la hemaglutinina (HA) del virus son los pri-- meros que aparecen después de la infección y los que más rápidamente se incre-- mentan.

La determinación de anticuerpos contra rubeola por esta técnica se lleva a cabo en dos fases: la primera consiste en el tratamiento del suero con $MnCl_2$ -heparina o Kaolin y eritrocitos de pollo para quitar inhibidores y aglutininas inespecíficas; en la segunda fase se lleva a cabo la reacción antígeno-anticuerpo y se utilizan los eritrocitos de pollo de un día de nacido como indicador de la reac-- ción.

La unión de los eritrocitos de pollo a la HA del virus es pH dependiente, re--- quiere un amortiguador orgánico como diluyente y es óptimo cuando se lleva a ca-- bo a temperatura ambiente. Estas son las condiciones que normalmente requieren los Togavirus para hemaglutinar.

Los eritrocitos de pollo como reactivo biológico es perecedero, esto hace que -- la técnica solo pueda realizarse en el rango de viabilidad de estas células.

Las soluciones preservativas anticoagulantes como la solución de Alsever son -- útiles solamente para almacenaje de corto tiempo, ya que los eritrocitos mues-- tran tendencia para retraerse, hemolizarse y perder reactividad. (17) (18)

El estudio de la crioconservación de eritrocitos se ha reportado para eritrocitos de carnero por Stein. Para eritrocitos de aves por Wesslen. En ambos casos se usó como sustancia crioprotectora Dextran, sin embargo los resultados no -- fueron satisfactorios con los eritrocitos de aves. (11) (12) (35) (42)

Posteriormente Myhrvold mostró que la polivinilpirrolidona (PVP) y Dimetil Sulfóxido (DMSO) son buenos crioprotectores en la congelación de eritrocitos de gallina. (23) (24) (25)

2.2.2. AGENTES CRIOPROTECTORES.

Los agentes crioprotectores se clasifican como: 1) agentes penetradores, los -- cuales en concentraciones multimolares protegen células vivas del daño causado en la congelación lenta y 2) agentes no penetradores que protegen a bajas molaridades pero que requieren un enfriamiento gradual rápido y una descongelación de igual manera. En ambos casos funcionan en base a las propiedades coligativas, puesto que disminuyen el punto de congelamiento de las sustancias intracelula-- res. (20)

Los agentes de tipo penetrador, al introducirse a la célula evitan la deshidratación por cambios de presión osmótica, protegen a la célula en dos formas diferentes: a) mediante su unión con el agua y b) mediante el desarrollo de una alta viscosidad. La penetración a la célula, va a depender del tipo de célula que se quiera congelar. (20).

Estas sustancias penetradoras no deben ser tóxicas en la concentración que tiene su carácter protector; a este grupo pertenece el DMSO y el Glicerol. (20)

2.2.3. CONGELAMIENTO RAPIDO.

El daño celular por congelamiento rápido radica en la producción de hielo intracelular. La observación de la hemólisis parcial siguiendo el congelamiento y --descongelamiento lento, sugiere que la hemoglobina también puede escapar de la célula conjuntamente con electrolitos provocándose con ello la mayor destrucción celular. Se debe congelar a la máxima velocidad que no permita la formación de hielo intracelular. Esta velocidad óptima variará de una célula a otra dependiendo de su coeficiente de difusión para el agua. (20)

2.2.4. AGENTES CRIOPROTECTORES EXTRACELULARES.

El mecanismo por el cual estos agentes confieren protección no ha sido establecido; difieren de los agentes penetradores en que su acción protectora es a concentraciones bajas y no requieren penetrar al interior de la célula. A este grupo pertenece la PVP. (20)

La presencia del agente crioprotector altera las características de permeabilidad de la membrana, de manera que si se produce una pérdida de componentes celulares durante la congelación, este escape solamente es temporal. (20)

La presión hipertónica durante el congelamiento es aligerada por una entrada de solutos extracelulares y por consiguiente durante la congelación se puede prevenir la lisis celular. (20)

2.3. GENERALIDADES DE ERITROCITOS.

2.3.1. CARACTERISTICAS FISICAS.

Los eritrocitos de las aves son de forma ovalada y diferentes éstos de la mayoría de los mamíferos, son nucleados y también más grandes (7.0-12.5 micrones de diámetro). (37) (38)

El número de eritrocitos está influenciado por la edad, el sexo y otros factores. (37) (38)

2.3.2. RESISTENCIA DE LOS ERITROCITOS.

La hemólisis es la liberación al plasma de la hemoglobina contenida en los glóbulos. Producen hemólisis un número de factores fisicoquímicos tales como la -- congelación, descongelación y cambios en la presión osmótica de la sangre. (26)

Las soluciones hipotónicas causan hemólisis y estallamiento por incremento del contenido de agua de las células y soluciones hipertónicas causan un encogimiento o contracción de los corpúsculos, por la pérdida del agua en las células. La fragilidad de las células rojas es medida por su resistencia a soluciones de -- concentraciones y presiones osmóticas conocidas, usualmente soluciones de cloruro de sodio (33). El punto en el cual la hemólisis comienza es el límite mínimo de resistencia, y el punto en el cual todas las células son hemolizadas es el -- límite máximo de resistencia. (38)

Hunter (1953) ha estudiado la permeabilidad de los eritrocitos de pollo a las -- soluciones hipotónicas e hipertónicas, empleando un método fotoeléctrico, por -- el que es posible medir la tumefacción o retracción de las células antes de que

se presente realmente la hemólisis. Sus resultados indican que los eritrocitos de pollo, como los del hombre se comportan como osmómetros perfectos en soluciones ligeramente hipotónica o ligeramente hipertónica, pero que en soluciones notablemente hipertónicas se retraen menos de lo que podría esperarse si se hubiesen comportado como osmómetros perfectos. (38)

2.3.3. CRITOLERANCIA DE SITIOS SELECTIVOS.

La superficie de la membrana de la célula, sirve como término limitante para separar a la célula de su medio ambiente y soportar el primer impacto de ataque por cambios físicos en suspensión media durante el congelamiento de las células. Los cambios en sitios criosensitivos sobre las superficies de estas membranas a causa de su directa e íntima asociación con otras unidades bioquímicas de la membrana, puede influenciar la cantidad de daños a los mecanismos de transportes por el movimiento de iones y proteínas a través de barreras selectivas y semipermeables. (9)

Estudios de otro de los efectos de congelación sobre células han sido concernidos con cambios en el sistema total siguiendo la transición de células suspendidas en líquidos a células suspendidas en sólidos; los cambios drásticos frecuentemente encontrados lo hacen difícil o imposible para evaluar los efectos de congelación en estructuras específicas de la célula. Basado en el fenómeno asociado con la adsorción y elución de mixovirus a partir de eritrocitos de pollo, se desarrolló un sistema de prueba, la prueba de adsorción de membrana, para determinar los efectos de enfriamiento a diferentes velocidades, ciclos de congelamiento y descongelamiento, el almacenaje a bajas temperaturas en los nucleoplisacáridos en la superficie de membrana de eritrocitos de pollo. Este ensayo por daño de superficie para sitios selectivos sobre la membrana no fue afectado

por hemólisis de células o fragmentación de membrana. (9)

El uso de reactivos de especificidad conocida y el estudio del modo de acción sobre la superficie de la célula representa una aproximación indirecta para obtener evidencias referentes a las estructuras naturales de la superficie. - Bajo condiciones apropiadas, los anticuerpos son indicadores sensitivos de -- cambios sobre la superficie macromolecular causado por el congelamiento y des congelamiento. (10)

Los eritrocitos y sus superficies son sujetos a manipulación experimental y - sirven por consiguiente como modelos de otras células más completas ya que -- los eritrocitos comparten receptores antigénicos con otras células. (10)

CAPITULO III

DISEÑO EXPERIMENTAL

CAPITULO III.

DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL Y METODO.

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

- 1) Virus de rubeola, cepa Therien (VRT), donada por el M.D. Ollimeurman del Departamento de Virología de la Universidad de Turku, Finlandia.
- 2) Eritrocitos de pollo de un día de nacido y no alimentado de la raza Rhode - Island Red de la Casa Armour, Hatchery de México, S.A.

3.2.1. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

ALSEVER

pH 6.0-6.2

<u>Reactivo.</u>	gr
Cloruro de sodio (NaCl)	4.2
Dextrosa ($C_6H_{12}O_6$)	20.5
Citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	8.0
Acido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0.55

Aforar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH. Esterilizar por filtración a través de una membrana millipore de 0.22 μ o en autoclave a 10 lbs de presión (115°C) durante 15 min. Guardar a 4°C en alícuotas convenientes.

AULETTA (AA)

pH 6.4

<u>Reactivo</u>	gr
Cloruro de sodio (NaCl)	9.0
Cloruro de Calcio anhidro (CaCl_2)	1.0
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0

Aforar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH.

Para hacer Auletta ASB, sólo se le agrega albúmina sérica bovina (ASB) al 0.4 %.

AULETTA ASB+DEXTROSA (AAD)

pH 6.4

<u>Reactivo</u>	gr
Cloruro de sodio (NaCl)	9.0
Cloruro de calcio anhidro (CaCl_2)	1.0
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0
Albúmina sérica bovina (ASB)	0.4 %
Dextrosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	10.0

Aforar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH.

AMORTIGUADOR VERONAL (VBD)

pH 7.3-7.4

Preparación de la solución amortiguadora stock (5x)

- a) Combinar lo siguiente en 1000 ml de agua en un matraz volumétrico de 2 litros en el orden siguiente:

<u>Reactivo</u>	gr
Cloruro de sodio (NaCl)	83.00
Barbital sódico ($C_8H_{11}N_2NaO_3$)	10.19
Agua destilada	500.00 ml
Acido clorhídrico 1 N (HCl)	34.58 ml
Solución stock conteniendo cloruro de magnesio 1 M y cloruro de calcio 0.3 M (20.3g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 4.4g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ en 100 ml de agua destilada)	5.00 ml

b) Llenar a la marca con agua destilada, mezclar fuertemente.

c) Checar el pH del amortiguador stock antes de refrigerar para hacer una dilución 1:5 con agua destilada.

DEXTOSA-GELATINA-VERONAL (DGV)

pH 7.2

<u>Reactivo</u>	gr
Acido dietil barbitúrico ($C_8H_{12}N_2O_3$)	0.58
Gelatina	0.60
Barbital sódico ($C_8H_{11}NaO_3$)	0.38
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.027
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.12
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5
Dextrosa ($C_6H_{12}O_6$)	10.0
Agua destilada	1000.0 ml

Disolver el ácido barbitúrico y la gelatina en 250 ml de agua caliente. Combinar esta solución con los demás reactivos restantes. Esterilizar por filtración a través de una membrana millipore de 0.22 μ . Guardar a 4°C.

AMORTIGUADOR VERONAL SACAROSA (GVBSM)

pH 7.35 ± 0.05

<u>Reactivo</u>	gr
Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	486.1
Barbital sódico ($C_8H_{11}N_2NaO_3$)	5.095
Cloruro de sodio (NaCl)	18.0
Agua destilada	1.5 lit.
Ajustar el pH con ácido clorhídrico 1 M (HCl)	
Gelatina disuelta en agua destilada	5.0
Solución conteniendo: $MgCl_2$ 1 M y $CaCl_2$ 0.15 M	2.5 ml

El volumen se lleva a 2 litros con agua destilada. Se guarda a $-20^{\circ}C$ y se diluye dos veces y media con agua destilada antes de ser usada.

HEPES-SALINO-ALBUMINA-GELATINA (HSAG)

pH 6.5

<u>Reactivo</u>	gr
1) HEPES salino solución stock 5x	
Hepes (N-2-hidroxiethyl piperazina-N-2 ácido etanosulfónico)	29.8
Cloruro de sodio (NaCl)	40.95
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.74
Agua destilada	1000.0 ml

Disolver en 900 ml. de agua destilada. Ajustar el pH agregando NaOH 1 N (aprox. 12.0 ml). Agregar agua destilada para llevar el volumen de la solución a 1000 ml. Esterilizar por filtración a través de una membrana millipore de 0.22 μ . Guardar a $4^{\circ}C$.

Albúmina sérica bovina solución stock 2x

Albúmina bovina en polvo (ASB)	20.0
Agua destilada	1000.0 ml

Disolver la albúmina bovina en 900 ml de agua. Ajustar el volumen a 1000 ml - agregando agua destilada. Esterilizar por filtración a través de una membrana - millipore de 0.22 M. Guardar a 4°C.

3) Gelatina solución stock 10x

Gelatina	25.0 mg
Agua destilada	1000.0 ml

La gelatina es disuelta y la solución esterilizada en autoclave 15 min a 120°C. Guardar a 4°C.

4) Para hacer el amortiguador de HSAG

combinar:	ml
Hepes salino solución stock 5x	200.0
Albúmina sérica bovina solución stock 2x	500.0
Gelatina solución stock 10x	100.0
Agua destilada	200.0

A 25°C el pH de HSAG deberá ser de 6.2 ± 0.05 . Si el pH está abajo de 6.2, ajustar con NaOH 1 N. Si el pH está arriba de 6.2, ajustar con HCl 1 N. Esta solución deberá guardarse a 4°C y puede ser usada por 2 meses si se guarda estéril.

CLORURO DE SODIO (NaCl)

0.15 M

<u>Reactivo</u>	gr
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5

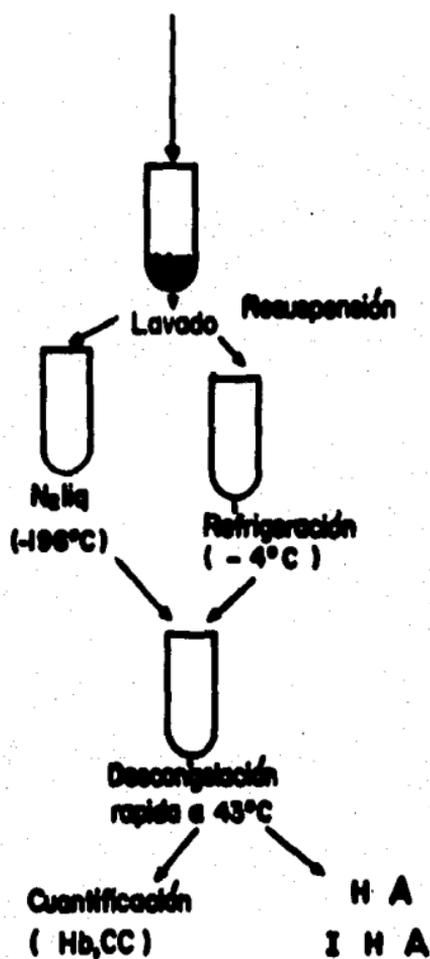
Aforar con agua destilada a 1000 ml.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADA DE FOSFATO (SSAF)

pH 7.3

<u>Reactivo</u>	gr
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	1.15
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	0.2
Cloruro de potasio (KCl)	0.2

Aforar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH.

CRIOCONSERVACION DE ERITROCITOS DE POLLO**OBTENCION DE LOS ERITROCITOS**

3.1.3. OBTENCION DE ERITROCITOS DE POLLO.

Se obtuvo sangre de pollos de un día de nacidos y no alimentados por punción -- cardíaca directa y se colectó en Alsever en proporción 1:1; la sangre obtenida se mezcló agitando la jeringa cuidadosamente para no producir hemólisis, des-- pués se pasó por una malla de gasa con el objeto de retener los coágulos que se pudieran formar.

La sangre se colectó en un tubo de centrifuga graduado y se centrifugó a 1500 -- rpm durante 10 min. a temperatura ambiente; se extrajo el sobrenadante y los -- eritrocitos se volvieron a resuspender en Alsever. Esta operación se repitió -- una o dos veces hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente o libre de sue-- ro. Los eritrocitos obtenidos se conservaron en esta solución no más de 4 días a 4°C. (Fig. 3.1.).

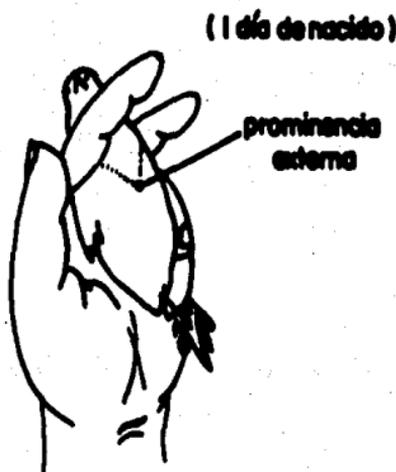


Fig. 3.1 Técnica de extracción de eritrocitos de pollo.

3.1.4. TECNICA DE CONGELACION Y DESCONGELACION.

Preparación de los crioprotectores:

Se preparó Dimetil Sulfoxido (DMSO), Glicerol y Polivinilpirrolidona (PVP), ésta con pesos moleculares de 20 000-30 000 y 360 000 a la concentración del 20 % en 0.15 M de NaCl. (7) La PVP fue ajustada a pH 7.3.

Preparación de la suspensión de eritrocitos de pollo:

Los eritrocitos de pollo fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 min. y lavados con Alsever, se retiró el sobrenadante y el paquete se resuspendió en el amortiguador correspondiente: Auletta (AA), Auletta ASB+Dextrosa (AAD), Veronal (VBD), Dextrosa-gelatina-veronal (DGV), Veronal sacarosa (GVBSM) y Hepes salino-albúmina-gelatina (NSAG). La concentración de eritrocitos fue del 10 - 40 %.

Preparación de la mezcla:

Un volumen del agente crioprotector fue agregado a un volumen de la suspensión de eritrocitos, se homogenizó la suspensión suavemente y se distribuyó en criotubos de 2 - 5 ml que se sumergieron directamente al Nitrógeno líquido para -- llevarlos a una temperatura de -196°C y en el congelador de un refrigerador para llevarlos a la temperatura de -4°C .

El descongelamiento se llevó a cabo, primero a temperatura ambiente por 15 seg. y posteriormente en baño maría a 43°C hasta su total descongelación. (22)

3.1.5. CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA.

La determinación de hemoglobina (Hb) se llevó a cabo en 3 pasos:

a) Pérdida por descongelamiento; después de descongelar los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente por 10 min a 1500 rpm. Se determinó la cantidad -

de hemoglobina al sobrenadante registrando las lecturas de densidad óptica - (DO) a 541 nm.

b) Pérdida por lavados; el paquete celular se resuspendió completamente en el amortiguador correspondiente, se centrifugó a 1500 rpm y del sobrenadante se determinó la cantidad de hemoglobina a una DO a 541 nm. Este procedimiento se repitió de 3 - 5 veces hasta que la lectura del sobrenadante dió una DO de 0.030.

c) Recuperación de células; para conocer el porcentaje de recuperación celular, el paquete de eritrocitos se hemolizó con agua destilada a la que se le puso unas gotas de cloroformo, se agitó fuertemente y se centrifugó a 1500 rpm para remover los fantasmas celulares. Se determinó la cantidad de hemoglobina al sobrenadante registrando las lecturas de DO a 541 nm. (2) (22)

CÁLCULOS:

100 % Hb = Hb total = Hb descongelamiento + Hb lavado + Hb de células recuperadas.

% pérdida por

descongelamiento = $\frac{\text{Hb descongelamiento} \times 100}{\text{Hb total}}$

% pérdida por

lavado = $\frac{\text{Hb lavado} \times 100}{\text{Hb total}}$

% recuperación

celular = $\frac{\text{Hb de células recuperadas} \times 100}{\text{Hb total}}$

3.1.6. CUENTA CELULAR DE ERITROCITOS.

Método de conteo:

Los eritrocitos se contaron directamente en una cámara de Neubauer. Una muestra de sangre se tomó y diluyó 1:200. Con esta dilución se llenó la cámara de Neubauer. Se contaron los cuadros terciarios de los cuatro ángulos y el cuadrado central. Para evitar confusiones al contar los eritrocitos que se encuentran en las líneas divisorias, se adoptó la siguiente regla general: los eritrocitos -- que toquen cualquiera de las tres líneas o la línea sola de la izquierda y los bordes superiores del cuadro pequeño deberá contarse como si estuviera dentro de los cuadros, mientras que los que toquen cualquiera de las líneas de la derecha y de los bordes inferiores de los cuadros pequeños no se contarán. El --- factor de conversión fue de $50 \times 200 = 10\ 000$. 50 para pasar de $0.02\ \text{mm}^3$ a --- $1\ \text{mm}^3$ y 200 debido a la dilución. (37)

3.1.7. TRATAMIENTO DE LAS COSECHAS VIRALES CON TWEEN Y ÉTER.

Se mezclaron 0.9 volúmenes de cosecha viral con 0.1 volúmenes de tween 80 al - 2 %.

Se incubaron a 4°C durante 15 min con agitación ocasional.

Se adicionaron 0.5 volúmenes de éter.

Se incubaron a 4°C durante 15 min con agitación adicional.

Se retiró la fase etérea con pipeta Pasteur y succión. El residuo de éter en la fase acuosa se eliminó por medio de burbujeo con Nitrógeno gaseoso. (14)

3.1.8. TECNICA DE HEMAGLUTINACION.

Se colocó por duplicado 0.025 ml. de solución de Auletta con albúmina sérica - bovina (ASB) al 0.4 % en los pozos de la microplaca (caja de microtitulación -- Cooke de 96 pozos, fondo tipo "V"), empezando en el segundo pozo.

Se añadió 0.05 ml de la muestra viral en el primer pozo, con un microdilutor se transfirió 0.025 ml al segundo pozo, los últimos 0.025 ml se desecharon.

Se agregó a cada pozo 0.025 ml de una suspensión de eritrocitos al 0.25 %.

Se agitó cuidadosamente y se dejó reposar durante 60 min. a temperatura ambiente.

El título se toma como el recíproco de la última dilución que presenta aglutinación de los eritrocitos. (1)

3.1.9. DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS CONTRA RUBEOLA POR INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

Se colocó, por duplicado, en los pozos de la microplaca a partir del segundo, - 0.025 ml de Auletta con ASB al 0.4 %.

En el primer pozo se adicionó 0.05 ml de suero tratado (dilución 1:4), con un microdilutor se transfirió del anterior 0.025 ml al segundo pozo, se mezcló y se repitió la operación hasta el último pozo desechando los últimos 0.025 ml.

Se adicionó 0.025 ml del antígeno diluido a 4 unidades HA (suspensión de antígeno viral tratado con tween y éter, titulado por hemaglutinación y diluido a - 4 unidades HA).

Se incubó 60 min. a temperatura ambiente.

Se adicionó 0.025 ml de suspensión de eritrocitos de pollo al 0.25 % (en solución de Auletta con ASB al 0.4%) y se agitó cuidadosamente.

Se dejó reposar durante 60 min. a temperatura ambiente.

Se leyeron los resultados. El título se da en la máxima dilución en la cual la hemaglutinación está totalmente inhibida. (36)

CAPITULO IV

RESULTADOS

CAPITULO IV.

RESULTADOS

4.1. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA LA CRIOPRESERVACION DE ERITROCITOS DE POLLOS RECIEN NACIDOS.

Para establecer las condiciones de criopreservación de eritrocitos de pollo recién nacido es necesario contar con una técnica de cuantificación celular; las más usadas son: la determinación de Hemoglobina leída a 541 nm y la observación y cuantificación directa en un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Para seleccionar una de las dos técnicas mencionadas se congelaron eritrocitos a -196°C en DMSO al 10 % y se determinó el porcentaje de recuperación por los dos métodos.

En la tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos al cuantificar la recuperación de eritrocitos por el método de hemoglobina, este método consta de 3 pasos que son: pérdida por descongelación, pérdida por lavado y cuantificación del paquete celular (recuperación). El objetivo del agrupamiento de datos en esta tabla es el de mostrar la pérdida de eritrocitos por efecto de la congelación y lavado; por otro lado la determinación se puede llevar a cabo bajo cualquier condición en que se encuentren los eritrocitos como son, en diferentes amortiguadores y concentraciones.

TABLA 4.1. DETERMINACION DE LA HEMOLISIS DE ERITROCITOS CRIOCONSERVADOS A -196°C Y EN PRESENCIA DE DMSO AL 10 % ^a

Concentración de Eritrocitos (%) en diferentes amortiguadores.	Pérdida por descongelamiento %	Pérdida por lavado %	Recuperación células %
<u>DGY</u>			
5	37 ± 29	19 ± 11	45 ± 19
10	40 ± 25	21 ± 19	39 ± 12
15	40	26	34
20	32	35	34
<u>AAD</u>			
5	35 ± 5	26 ± 6	39 ± 7
10	33 ± 8	19 ± 5	48 ± 7.5
15	41	33	26
20	37 ± 0.9	28 ± 3	35 ± 2.3
<u>GVBSM</u>			
5	53	16	32
10	73	10	17
<u>VBD</u>			
5	56 ± 27	26 ± 13	18 ± 13
10	52 ± 22	33 ± 9	15 ± 13.4
15	51 ± 12	30 ± 5.6	17 ± 9
20	37 ± 1	36 ± 3.8	27 ± 5.6
<u>HSAG</u>			
5	22 ± 14	43 ± 14	35 ± 34
10	35	20	44

^a El porcentaje de recuperación es la relación entre la hemoglobina en el medio y la hemoglobina total de la muestra. La lectura se hizo a 541 nm.

La cuantificación directa se lleva a cabo en un solo paso, se diluyen los eritrocitos 1:200 en el amortiguador en que fueron criopreservados. Los resultados se muestran en la tabla 4.2, en ella se tabularon los resultados que se obtuvieron con el método de la hemoglobina. Al comparar estos valores se observa cierta similitud, esto puede deberse a que a través de la cuantificación de hemoglobina se puede introducir un factor de error por ser una técnica más elaborada.

TABLA 4.2 DETERMINACION DE LA INTEGRIDAD CELULAR POR HEMOLISIS Y CONTEO DE ERITROCITOS CRIOCONSERVADOS A -196°C Y EN PRESENCIA DE DMSO AL 10%.

Concentración de eritrocitos (%) en diferentes amortiguadores.	Hb ^a	CC ^b
<u>DGV</u>		
5	45	30
10	39	27
15	34	33
20	34	ND ^c
<u>AAD</u>		
5	39	23
10	48	58
15	26	29
20	35	ND
<u>HSAG</u>		
5	35	62
10	44	41
15	ND	50
<u>GVBSM</u>		
5	32	ND
10	17	ND
<u>VBD</u>		
5	18	26
10	15	23
15	19	20
20	27	ND
<u>AA</u>		
10	ND	16

^a HB = % de hemoglobina en el medio

^c ND= no se determinó.

^b CC = % de células íntegras, contadas por visualización al microscopio.

4.2. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE TRABAJO PARA LA CRIOPRESERVACION DE LOS ERITROCITOS.

Para optimizar las condiciones de criopreservación de los eritrocitos es necesario tomar en cuenta los factores que influyen en la estabilidad de las células como son: a) amortiguadores, b) concentración de eritrocitos, c) criopreservadores y d) temperatura de congelación. Si no se cumple con alguno de estos factores el resultado es la destrucción del eritrocito y la liberación de hemoglobina al medio externo.

4.2.1. SELECCION DEL AMORTIGUADOR.

Siendo el amortiguador capaz de impedir cambios de pH, mantener la concentración de iones extracelulares y estabilizar la estructura celular es necesario contar con un amortiguador eficiente. Con este fin se seleccionaron 6 amortiguadores que son DGV, AAD, GVBSM, HSAG, VBD y AA. Los resultados se muestran en la tabla 4.2. Aquí se puede ver que cuando se resuspenden los eritrocitos en los amortiguadores DGV, AAD y HSAG se recuperaron 26 y 48 % de células y 15 a 32 % en los amortiguadores GVBSM y VBD ambos por el método de Hb; cuando se hace cuenta directa se obtienen de 23 a 62 % y de 20 a 26 % respectivamente.

4.2.2. CONCENTRACION DE ERITROCITOS.

Se probaron concentraciones de 5, 10, 15 y 20 % de hematíes en cada uno de los amortiguadores antes mencionados; los resultados se muestran en la tabla 4.2. Cuando se resuspenden los eritrocitos en DGV, AAD y HSAG la recuperación es en promedio de 37.9 % por Hb y de 39.2 % por CC. en las cuatro concentraciones probadas. Con células al 5 % en GVBSM se recuperan 32 % y en VBD 27 % ambas cuantificadas por el método de Hb.

Otra de las características además de la recuperación del mayor número de eritrocitos criopreservados es la unión del virus de Rubeola al receptor de los eritrocitos; esta unión se determinó a través de la hemaglutinación, se tituló por dilución y se expresó como unidades hemaglutinantes.

Los eritrocitos recuperados en el experimento anterior fueron los que se probaron, como control se usaron eritrocitos frescos. Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

TABLA 4.3. TITULACION DE LA HEMAGLUTININA CON ERITROCITOS CRIOCONSERVADOS + (DMSO AL 10%) EN DIFERENTES AMORTIGUADORES Y A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

Amortiguador	Control de eritrocitos frescos	Eritrocitos crioconservados (%)			
		5	10	15	20
DGV	++++	++++	++++	++	++++
VBD	++++	++++	++++	++++	++++
AA	++++	ND	++++	++++	-
AAD	++++	++	++++	++++	ND
GVBSM	++++	++	++++	++	++++
HSAG	++++	++	++++	++++	ND

La titulación se hizo utilizando Auletta como diluyente.

++++ = 100 % unidades hemaglutinantes.

++ = 50 % unidades hemaglutinantes.

- = negativo.

ND = no se determinó.

+ = a -196°C.

En ella se observa un 100% de hemaglutinación con eritrocitos congelados al 10% en cada uno de los 6 amortiguadores probados. Con eritrocitos al 5, 15, y 20 % la HA es de 100 y 50 % dependiendo del amortiguador en que son resuspendidos.

4.2.3. CRIOCONSERVADORES.

Las condiciones que hasta el momento nos permite recuperar en promedio el --- 38.55 % de eritrocitos y un 100 % de unión a rubeola son: eritrocitos al 10 y - 15 % resuspendidos en amortiguadores HSAG y AAD, crioconservador DMSO al 10 % y temperatura de -196°C.

En base a estos resultados, el siguiente paso fue, el incrementar la recuperación de las células, para ello se probaron otros criopreservadores.

El criopreservador juega un papel muy importante en la congelación a bajas temperaturas ya que impide la concentración extracelular de solutos extracelulares, por lo tanto impide la deshidratación excesiva de la célula.

Los soportes empleados son los de tipo penetrador y son Glicerol, PVP con peso molecular de 20 000 - 30 000 y 360 000, ambos reactivos al 10 %. En la tabla -- 4.4. se muestran los resultados. La mayor recuperación se obtuvo con Glicerol y eritrocitos al 15 % en AAD, esta recuperación fue de 52 %, del 31 % con eritrocitos al 15%, resuspendidos en amortiguador HSAG.

TABLA 4.4. RECUPERACION DE ERITROCITOS CRIOPRESERVADOS CON DIFERENTES CRIO-
CONSERVADORES.

Crioprotector ^a	Amortiguadores	Concentración	% Recuperación ^b	
		Eritrocitos %	-196°C	-4°C
Glicerol	HSAG	10	20	0
		15	31	2
	AAD	10	14	0
		15	52	0
PVP (360,000)	HSAG	10	0	0
		15	0	0
	AAD	10	1	1
		15	1	0
PVP (20,000 - 30,000)	HSAG	10	13	0
		15	9	0
	AAD	10	8	0
		15	2	0
DMSO	HSAG	10	41	65
		15	50	80
	AAD	10	58	60
		15	29	60

^a Todos los crioprotectores se usaron al 10 %.

^b Los valores se determinaron por conteo.

4.2.4 TEMPERATURA Y OSMOLARIDAD.

Un último intento por incrementar la recuperación celular fue la de modificar la temperatura y la osmolaridad del amortiguador. Se trabajó a -4°C y los amor-

tiguadores a los que se les modificó la osmolaridad (290 a 340 mOs) fueron HSAG y AAD. Los resultados de la concentración del 5 % en experimentos anteriores -- fueron ambigüos y por eso se experimentaron nuevamente como se muestra en la tabla 4.5. y se ve que dá bajo porcentaje de recuperación celular, por eso no se siguió determinando su viabilidad y fue descartado. También se muestra el incremento de la recuperación cuando se congelaron los eritrocitos a -4°C a la concentración de 10 y 15 % en ambos amortiguadores. Sin embargo la modificación - de la osmolaridad de los amortiguadores no incrementó la recuperación celular.

TABLA 4.5. RECUPERACION DE ERITROCITOS CRIOPRESERVADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CON DMSO AL 10 %.

Concentración	Recuperación (%)				
	%	-196°C		-4°C	
	HSAG	AAD	HSAG	AAD	
5	62 26 ⁺	23	12	29	
10	41 26 ⁺	58	65 43 ⁺	60	
15	50 29 ⁺	29	80	60 39 ⁺	

+ Los eritrocitos se conservaron ajustando la osmolaridad del amortiguador a - 290-340 mOs.

Con los eritrocitos recuperados en el experimento 4.2.4. se probó la HA del -- virus de rubeola. La tabla 4.6 muestra los resultados.

La HA es del 100 % en todos los casos probados.

TABLA 4.6. TITULACION DE LA HEMAGLUTININA CON ERITROCITOS CRIOCONSERVADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS ^a

Concentración de Eritrocitos (%)	-196°C		-4°C	
	AAD	HSAG	AAD	HSAG
10	16	16	16	16
15	16	16	16	16

^a El amortiguador y el crioprotector se eliminaron por lavados con Auletta. La hemaglutinina se tituló con eritrocitos frescos y tuvo un título de 16 unidades hemaglutinantes.

4.2.5. EFECTO DEL TIEMPO SOBRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACION DURANTE LA CRIOCONSERVACION DE ERITROCITOS.

En base a las condiciones experimentales en la tabla 4.5. sin cambiar la osmolaridad se probó el efecto del tiempo de almacenaje sobre el porcentaje de recuperación de eritrocitos. Los mejores porcentajes de recuperación en los diferentes periodos se obtienen con AAD al 15 % a -196°C (Fig. 4.1). De acuerdo a este resultado se probó nuevamente el efecto del tiempo de almacenaje de 0 - 34 días. Los resultados se muestran en la figura 4.2. Aquí también se puede observar que el título de hemaglutinación es del 100 % en todos los porcentajes de recuperación.

En la figura 4.3. se puede observar la hemaglutinación de eritrocitos crioconservados en dos diferentes periodos con AAD al 15 % a -196°C.

El título de IHA de eritrocitos crioconservados durante 34 días en AAD al 15 % a -196°C se muestra en la figura 4.4.

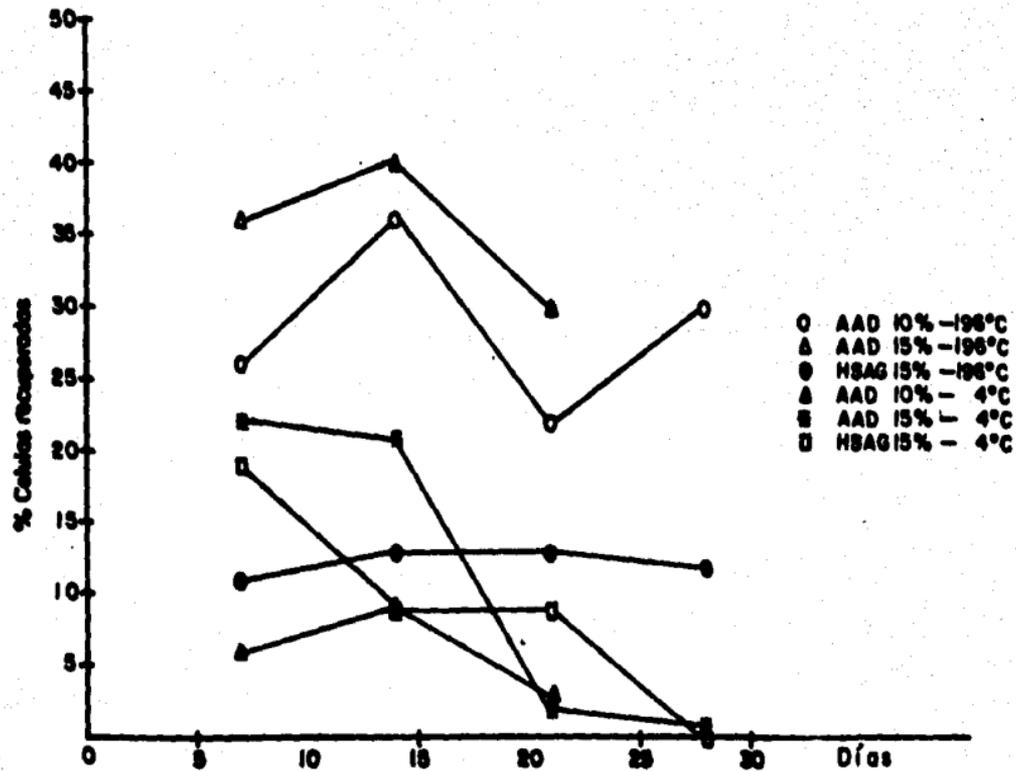


Fig.4.1 Efecto del Tiempo sobre el porcentaje de recuperación durante la Crioconservación de eritrocitos

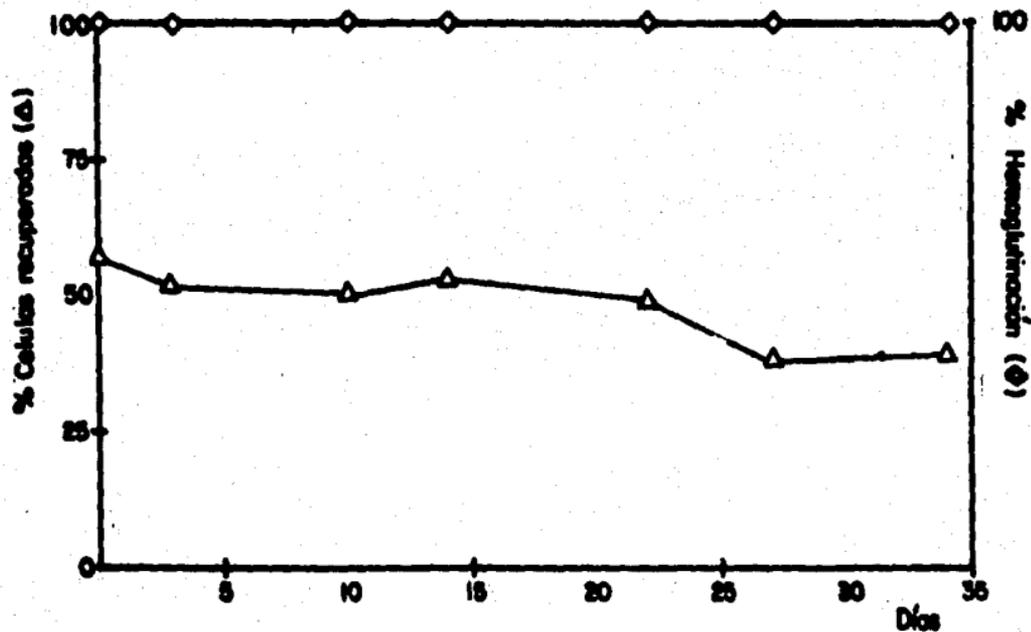


Fig 4.2. Efecto del Tiempo sobre el porcentaje de recuperación (Δ) y de hemaglutinación (◊) durante la Crioconservación de eritrocitos al 15% en AAD con DMSO al 10% a -196°C

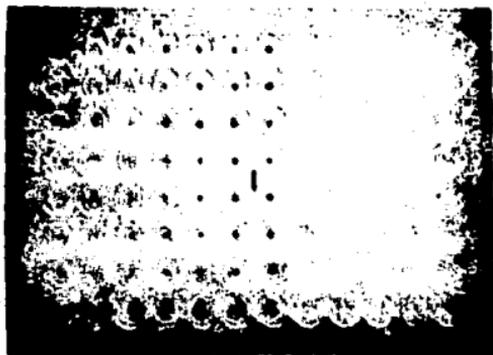


Fig. 4.3 Comparación de títulos de la hemaglutinina del virus de Rubéola (HA), usando eritrocitos frescos y congelados.

Se empleó como crioprotector DMSO al 10 %

A,B-Eritrocitos crioprotectados al 15 % en

AAO a -196°C por 34 días.

D,E-Eritrocitos crioprotectados al 15 % en

AAO a -196°C por 17 días.

G Eritrocitos frescos.

C,F,H-Controles respectivos.

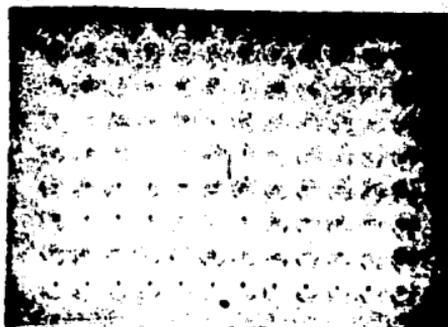


Fig. 4.4 Utilización de Eritrocitos Crioconservados en la Inhibición de la Hemaglutinación. Las columnas 1-6 contienen eritrocitos frescos, las columnas 7-12 eritrocitos crioconservados.

CAPITULO V

DISCUSION

CAPITULO V

DISCUSION

Los eritrocitos de pollo recién nacido se usan rutinariamente en muchos laboratorios para las pruebas de HA e IHA. El tiempo de uso normal de estas células es alrededor de 5 días máximo cuando son almacenadas en Alsever a 4°C. De ahí que una de las limitantes para el desarrollo de estas técnicas son los eritrocitos. Una solución para la realización de estas técnicas sería la --crioconservación de los eritrocitos.

Experimentos anteriores realizados por el investigador Myhrvold (25) mostró -- que el DMSO tuvo los mejores efectos crioprotectores para eritrocitos de pollo a una concentración final del 10 %. En base a este reporte los primeros experimentos se llevaron a cabo congelando las células a -196°C utilizando -- como crioconservador DMSO al 10 %.

En la tabla 4.1 se muestran los eritrocitos recuperados que se congelaron a -- diferentes concentraciones y en 5 amortiguadores. Los resultados que se -- muestran es el promedio de 4 experimentos que se realizaron. El porcentaje -- de recuperación se cuantificó por la técnica de hemoglobina liberada. Sin -- embargo al calcular la desviación estandar y obtener valores altos (40±25, 37±24, 35±34, etc.), la reproducibilidad de estos valores fue difícil, de -- ahí que se optó por la cuantificación de células recuperadas por conteo di---recto en cámara de Neubauer. Resultados que se muestran en forma comparati---va con la de Hb en la tabla 4.2.

De las dos variables probadas que fueron las diferentes concentraciones de eritrocitos en cada uno de los amortiguadores tablas 4.1 y 4.2 se observó -- que la recuperación mayor se obtuvo con AAD al 10 %.

Los porcentajes de células recuperadas en la tabla 4.2 fueron probados en la titulación de la hemaglutinina, usando como control eritrocitos frescos (tabla 4.3).

Cuando se probaron estos eritrocitos en la técnica de hemaglutinación se obtuvo 100 % de hemaglutinación con cada una de las concentraciones de eritrocitos en el amortiguador VBD, y del 50 al 100 % en todos los demás casos; -- sin embargo la recuperación mayor de eritrocitos fue con el amortiguador AAD y HSAG.

Para incrementar el porcentaje de recuperación celular se congelaron los eritrocitos a -4°C y -196°C en presencia de Glicerol y PVP (ésta última de -- dos diferentes pesos moleculares) como criopreservadores (tabla 4.4). En -- estas nuevas condiciones ninguno de los criopreservadores probados favore-- cieron la recuperación de eritrocitos, ya que las células recuperadas en -- presencia de Glicerol fueron de 31 y 52 % las más altas, al utilizarlas en -- la técnica de hemaglutinación la unión al virus de rubeola no fue posible -- (resultado que no se muestra en la tabla). Con respecto a la PVP la recuperación fue menor del 13 % y la temperatura de -4°C en todos los casos provocó la destrucción total de los eritrocitos.

Este mismo efecto se observó cuando al modificar la osmolaridad de los amortiguadores HSAG y AAD a las dos temperaturas antes mencionadas (tabla 4.5) -

la recuperación de eritrocitos fue siempre menor que en las condiciones iniciales de experimentación.

Siendo la recuperación menor con este nuevo cambio, únicamente se probaron - en la técnica de HA los eritrocitos recuperados en las condiciones normales de experimentación y aquellos recuperados a -4°C , obteniéndose un 100 % de la hemaglutinación en todos los casos (tabla 4.6).

El siguiente paso de experimentación fue el probar el efecto del tiempo de - almacenaje sobre el porcentaje de recuperación de eritrocitos; para ello se trabajó en las condiciones mostradas en el experimento anterior sin modifi-- car la osmolaridad (Fig. 4.1). El tiempo máximo de almacenaje fue de 30 --- días y los porcentajes mayores se obtuvieron cuando se congelaron las célu-- las a -196°C al 10 y 15 % en AAD.

En la figura 4.2 se muestra nuevamente el efecto del tiempo de almacenaje -- sobre el porcentaje de recuperación únicamente con eritrocitos al 15 % en -- AAD con DMSO al 10 % a -196°C y en forma paralela la utilización de estos e-- ritrocitos en la técnica de hemaglutinación en las diferentes etapas de al-- macenamiento, siendo en cada uno de los casos del 100 % (Fig. 4.3).

En la figura 4.4 se muestran los resultados de los eritrocitos crioconserva-- dos probados en la técnica de INA, usando como control eritrocitos frescos. Como se puede observar se obtienen resultados similares con eritrocitos crio-- conservados como con eritrocitos frescos. Los títulos de anticuerpos son i-- dénticos.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos permiten concluir que:

- 1.- Las mejores condiciones para crioconservar los eritrocitos de pollo recién nacido fueron:
 - a) Eritrocitos concentrados al 15 %
 - b) Amortiguador AAD
 - c) Crioconservador DMSO al 10 %
 - d) Temperatura de -196°C

Estas permitieron una recuperación del 39 % de eritrocitos con membrana celular íntegra.

- 2.- Los eritrocitos crioconservados sustituyen adecuadamente a los frescos en una prueba de HA rutinaria y en la prueba de IHA.
- 3.- Bajo estas condiciones de almacenamiento se dispone de eritrocitos para estas técnicas durante más de 34 días.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Auletta, A.E., G.L. Gitnick, C.E. Whitmire., and J.L. Sever, 1968. An improved diluent for rubella hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Appl. Microbiol.* 16:691-694.
2. Bankowski, R.A., 1942. Studies of the hemoglobin content of chicken blood and evaluation of methods for its determination. *Am. J. Vet. Res.* 3:373-381.
3. Cooper, L.Z., Krugman, S., 1967. "Clinical manifestation of postnatal and congenital rubella". *Arch. Opht.* 77:434.
4. Davidsohn, I., Henry, J.B., 1978. DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO. 6ª Edición. Salvat Editores. Barcelona.
5. Feery, B.J., 1980. "Epidemiology of congenital rubella ", Symposium on -- potency and efficacy of vaccines, held in Manila, Philippines Smith Kline-RIT, February 21-22.
6. Fenner, F., White, D.O., 1979. VIROLOGIA MEDICA. 2ª Edición. La Prensa -- Médica, S.A. México. p. 411-420.
7. Garvey, J.S., Cremer, N.E., and Sussdorf, D.H., 1977. METHODS IN IMMUNOLOGY. WA Benjamin Inc. USA.
8. Gregg, N. Mc., 1941. Congenital cataract following German measles in the - mother. *Trans. Ophthalmol. Soc. Aust.* 3:35-46.
9. Greiff, D., and Seifert, P., 1968. Cryotolerance of Selected Sites on the Surfaces of Membranes of Cells: I. Mucopolysaccharides of E--rythrocytes. *Cryobiology.* 4:295-302.
10. Greiff, D., Strong, D.H., and Seifert, P., 1971. Cryotolerance of Selec--ted Sites on the Surfaces of Membranes of Cells: II. A, B and H Combining Sites of Human Erythrocytes. *Cryobiology.* 8:550-558.

ESTA TESIS NO PUEDE SER PRESTADA SIN EL ASIENTO DE LA BIBLIOTECA

11. Gupta, J.D., and Harley, J.D., 1970. Use of Formalinized Sheep Erythrocytes in the Rubella Hemagglutination-Inhibition. *Test. Appl. Microbiol.* 20:843-844.
12. Gupta, J.D., and Peterson, V.J., 1971. Use of a new buffer system with -- formalinized sheep erythrocytes in the rubella hemagglutination-inhibition test. *Appl. Microbiol.* 11 (1):749-750.
13. Horstman, D.M., 1971. "Review, Rubella: The Challenge of its control". *J. Infect. Dis.* 123 (6):640-654.
14. Ho-Terry, L., and Cohen, A., 1980. Degradation of rubella virus envelope components. *Archives of Virology.* 65:1-13.
15. Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A., 1985. *MICROBIOLOGIA MEDICA.* - 11^a Edición. p. 348,465-471,488-490.
16. Kurstak, E., and Kurstak, C., 1977. *COMPARATIVE DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES.* Vol. I. Human and related viruses. Part A. Chapter 16. Academic Press. New York. p. 688-758.
17. Lawrence, G.T., and Wentworth, B.B., 1985. Freezing and rejuvenation of - human O erythrocytes for use in the immune adherence hema---gglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 22:654-655.
18. Maes, R.K., Hayes, M.M., and Newman, J.P., 1985. Cryopreserved Erythrocytes in Clinical laboratory hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. *J. Clin. Microbiol.* 22:659-661.
19. Maton, W.G., 1815. Some account of a rash liable to be mistaken for scarlatina. *Med Tr. Coll. Physicians (Lond.).* 5:149-165.
20. Meryman, H.T., 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology.* 8:173-183.
21. Miller, E., Cradock-Watson, J.E., Pollock, T.M., 1982. "Consequences of - confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy" *Lancet*, October 9. 781-784.

22. Myhrvold, V., 1979a. Cryopreservation of sheep red blood cells. 1. Experiments with polyvinylpyrrolidone and other protective agents. *Acta Vet Scand.* 20:525-530.
23. Myhrvold, V., 1979b. Criopreservation of sheep red blood cells. 2. purified polyvinylpyrrolidone and hydrolyzed starch as protective agents. *Acta Vet Scand.* 20:531-536.
24. Myhrvold, V., 1979c. Cryopreservation of sheep red blood cells. 3. Complement titrations with frozen sensitized cells. *Acta Vet Scand.* 20: 537-545.
25. Myhrvold, V., 1981. The use of frozen erythrocytes in the single radial haemolysis test (SRHT) for antibodies to rubella virus. *Acta Path Microbiol. Scand. Sect B.* 89:103-107.
26. Nei, T., 1968. Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near zero temperatures. II. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing. *Cryobiology.* 4:303-308.
27. Oker-Blom, C., Kalkkinen, N., Känänen, L., and Pettersson, R.F., 1983. "Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E₁, E_{2a}, and E_{2b}". *J. Virol.* 46:964-973.
28. Ordóñez, R.B., 1969. "Frecuencia de la rubeola en México". *Sal. Pub. Epoca V.* 6(11):731-740.
29. Parkman, P.D., Buescher, E.L., Artenstein, M.S., McCown, J.H., Mundon, F. K., and Druzol, A.D., 1964. Studies of rubella. I. Properties of the virus. *J. Immunol.* 93:595-607.
30. Ruiz-Gómez, J. y Espinosa-Larios, E.L., 1978. "Seroepidemiología del sarampión, rubeola y parotiditis en la República Mexicana. IV Rubeola". *Sal. Pub..Mex. Epoca V XX:*21-25.
31. Seligson, D., 1978. HANDBOOK SERIES IN CLINICAL LABORATORY SCIENCE, Rubriidae: Rubella Virus. C.R.C. Press Editor in Chif. p. 201-203.

32. Sever, J.L., Cleghorn, C., 1982. "Rubella diagnostic tests. What is a --- significant result ?". Post Graduate Medicine. 71(3):73-77.
33. Siegel, F.P. TONICITY, OSMOTICITY, OSMOLALITY, AND OSMOLARITY. Chapter 80 Remington's Pharmaceutical Sciences. 17th Edition. p. 1455---1472.
34. Smith, J.L., 1941. Rothein. Arch. Dermatol. 1:1-13.
35. Stein, G.A., 1952. The preservation of sheep erythrocytes. Am. J. Clin. - Path. 22:177-187.
36. Stewart, G.L., Parkam, P.D., Hoops, H.E., Douglas, R.E., Hamilton, J.P., and Meyer, H.M., 1967. Rubella-virus-hemagglutination-inhi- bition test. N. Engl. J. Med. 176:554-557.
37. Sturkie, P.D., 1954. AVIAN PHYSIOLOGY. Blood: Formed elements, hemoglobin, physical characteristics, Comstock Publishing Associates. -- Ithaca, New York. p. 2-3.
38. Sturkie, P.D., 1965. AVIAN PHYSIOLOGY. Blood: Formed elements, physical - characteristics, and coagulation. Second Edition. Comstock - Publishing Associates a division of Cornell University Press Ithaca, New York. p. 1-26.
39. Trudel, M., Nadon, F., Comtois, R., Payment, P., Bonneau, A., and Lecomte, J., 1982. "Identification of rubella virus structural prote- ins by immunoprecipitation". J. Virol. Methods. 5:191-197.
40. Waxham, M.N., Wolinsky, J.S., 1983. "Immunochemical identification of ru- bella virus hemagglutinin". Virology. 126:194-203.
41. Weller, T.H., and Neva, F.A., 1962. Propagation in tissue culture of cy-- topathogenic agents from patients with rubella-like illness. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111:215-225.

42. Wesslen, L., 1978. Hemolysis-in-gel (HIG) test for antibodies to influenza A, measles and mumps using liquid Nitrogen freezed erythrocytes coupled with the respective viral antigen. J. -- Immunol. Methods. 24:1-8.