



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

ADECUACION DE LA TECNICA DE SEPARACION DE
HETEROFILOS Y MONOCITOS AVIARES DE SANGRE
COMPLETA, UTILIZANDO GRADIENTES
DISCONTINUOS DE FICOLL-HYPAQUE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

GARY GARCIA ESPINOSA



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS.....	4
OBJETIVOS.....	4
MATERIAL Y METODOS.....	5
RESULTADOS.....	8
DISCUSION.....	9
LITERATURA CITADA.....	12
CUADROS.....	15

RESUMEN

GARCIA ESPINOSA GARY: Adecuación de la técnica de separación de heterófilos y monocitos aviares de sangre completa, utilizando gradientes discontinuos De Ficoll-Hypaque. (Bajo La dirección de: Guillermo Tellez Isaias, Miguel Angel Ceniceros Ruiz, José Antonio Quintana López y Billy Hargis).

Se realizó la adecuación de la técnica de gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque, para la obtención de monocitos y heterófilos aviares puros y viables a partir de sangre completa de pollos sanos de entre 8 y 9 semanas de edad. Al final de 10 repeticiones la cuenta total de monocitos obtenida fue de 0.25×10^6 a 0.46×10^6 por ml, con un porcentaje promedio de viabilidad y pureza de 97.65 ± 1 para la primera y 95.17 ± 0.97 para la segunda. La cuenta total de heterófilos fue de 0.41×10^6 a 1.15×10^6 por ml; con un porcentaje promedio de viabilidad y pureza de 99.4 ± 0.4 para la primera y 96.77 ± 1.88 para la segunda. Mediante esta técnica se pueden obtener monocitos y heterófilos viables, puros y cultivos in vitro para determinar mecanismos de quimiotáxis, fagocitosis y lisis contra bacterias.

INTRODUCCION:

En los últimos años, la avicultura nacional ha sufrido cambios importantes generados a partir de la tecnificación, lo cual ha modificado la incidencia en la presentación de enfermedades (15). Los agentes microbiológicos patógenos son reconocidos por el sistema inmunitario del ave, constituido principalmente por células fagocíticas de defensa como los heterófilos (equivalentes a los neutrófilos en los mamíferos) y los monocitos, los cuáles eliminan microorganismos por diferentes mecanismos (8,13,16). Los heterófilos son células polimorfonucleares, usualmente redondos y con un diámetro aproximado de 10 a 15 μ , su característica más importante es la presencia de cuerpos cristalinos fusiformes o baciloides dentro del citoplasma, que adquieren una coloración acidófila con distintas tinciones rutinarias, que es uno de los criterios para diferenciarlos de otras células (13,14). Los monocitos son macrófagos inmaduros que circulan en la sangre periférica, provenientes de la médula ósea en donde se encuentran en forma de promonocitos, ocasionalmente están en tejidos para una posterior diferenciación a macrófagos maduros (13,16); los monocitos son células grandes, su citoplasma es poco abundante y su núcleo de contorno irregular (14). Es necesaria la obtención de estas células purificadas, para realizar ensayos *in vitro* y observar la interacción con microorganismos intracelulares como son las salmonelas, entre otros, ya que estas células responden a varios

estímulos quimiotácticos y fagocíticos, que no se conocen con toda claridad en la mayoría de las invasiones por este tipo de microorganismos (1,13,16). También el conocimiento de la interacción de mediadores químicos como las interleucinas, factores del complemento y las manoproteínas no han sido ampliamente investigadas por separado en cada una de estas células; algunos mecanismos disminuyen por diversos agentes etiológicos patógenos como el virus de la anemia infecciosa que afecta la producción de interleucina-1, expresión del receptor Fc, fagocitosis y actividad bactericida, pese no haberse realizado estudios profundos ni ensayos individuales e integrales (8,11,16). Sin embargo, las investigaciones de las funciones de los heterófilos en las enfermedades han sido limitadas por la gran dificultad que se tienen al realizar la separación de poblaciones puras de heterófilos de sangre completa (2). Esto es debido a la presencia de trombocitos y eritrocitos nucleados ya que estos tienden a difundirse junto con los heterófilos; por ello los métodos desarrollados para la separación de poblaciones celulares en mamíferos no son aplicables a las aves (3,10), con un método de gradientes discontinuos de Ficoll-hypaque; se pretende aislar heterófilos y monocitos viables (2).

HIPOTESIS:

El método de gradientes dicontínuos de Ficoll-Hypaque, sirve para separar heterófilos y monocitos de sangre completa de aves, obteniéndose células viables con un mínimo de células contaminantes.

OBJETIVO:

Adecuar la técnica de separación de heterofilos y monocitos aviáres de sangre completa utilizando gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque.

MATERIAL Y METODOS:

Se obtuvieron 10 muestras de sangre completa con EDTA al 10%, para cada tipo celular, obtenidas de pollos diferentes de 8 y 9 semanas, los cuales se mantuvieron vivos con agua y alimento *ad libitum*.

Aislamiento de los monocitos.

La sangre fué colectada y mezclada por 15 minutos como lo describen Stabler et al (13). Cinco ml de sangre con anticoagulante al 10%, se colocaron en la parte superior del gradiente discontinuo de Ficoll-Hypaque (*) (hypaque 1077) en tubos de vidrio estériles. El gradiente fue centrifugado a 700 x g por 30 minutos a temperatura ambiente, la interfase de células mononucleares se removió y transfirió a tubos estériles, conteniendo medio de cultivo RPMI 1640 (*), se lavó tres veces a 250 x g por 10 minutos. El concentrado de células se homogenizó en 20 ml de RPMI y se decantó en una caja de petri, para incubarse por 2 hr a 37.5 °C y 3% CO₂ para permitir la adherencia de los monocitos al plástico. Se hicieron tres lavados con RPMI para remover las células no adheridas. Para despegar las células se utilizó una solución de PBS con EDTA al 1 mM por 10 segundos (**), el sobrenadante fue colectado en un tubo con RPMI y centrifugado a 250 x g por 10 min. La cantidad,

* Sigma diagnostics (1993)

** Comunicación personal. Dr. Vianney Ortiz N. (1993)

pureza y viabilidad celular fueron determinadas mediante coloración de azul de trypan en la cámara de Neubauer. Los resultados son expresados en promedio \pm desviación estándar.

Aislamiento de heterófilos.

El procedimiento utilizado para el aislamiento de los heterófilos de la sangre periférica fue una modificación de el método previamente descrito por Andreasen y Latimer (3). Se colectaron 5 ml de sangre de cada ave en un tubo estéril de 3 ml conteniendo 0.5 ml de EDTA al 10%. Estos tubos fueron homogenizados por 15 minutos a temperatura ambiente. La sangre completa con anticoagulante se centrifugó a 350 x g por 10 minutos, obteniendo tres fracciones, formadas por suero, capa blanca y eritrocitos; de estas fracciones se tomó la capa flogística, que se transfiere a otro tubo que contiene los gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque. La capa flogística fue colocada en la parte superior del primer histopaque 1.077, localizado encima del histopaque 1.119. El gradiente fue centrifugado a 700 x g por 30 minutos. Se recolectó la fracción de heterófilos, localizada en la parte superior del histopaque 1.119, la que se transfirió a un tubo con 10 ml de RPMI 1640, se homogenizó y centrifugó a 650 x g por 10 minutos. La presencia de eritrocitos contaminantes se removió por lisis hipotónica, adicionando un ml de agua destilada por 5 segundos y restableciendo la tonicidad con RPMI; se realizaron dos lavados con RPMI a 650 x g por 10

minutos cada uno. La cantidad de células, viabilidad y pureza se determinaron por la coloración de azul de trypan en la cámara de Neubauer. Los heterófilos purificados fueron resuspendidos en un medio de cultivo RMPI 1640 estéril .

RESULTADOS

Para los monocitos, la cantidad de células obtenido por ml, fue de 0.25×10^6 a 0.46×10^6 . El porcentaje promedio de viabilidad fue de 97.65 ± 1 y de pureza de 95.17 ± 0.97 (cuadro 1).

La cantidad de heterófilos obtenidos por ml fue de 0.4×10^6 a 1.15×10^6 . El porcentaje promedio de viabilidad fue de 99.4 ± 0.4 y de pureza de 96.77 ± 0.97 (cuadro 2).

DISCUSION

El uso de mezclas de polisacaridos y diatrizoate de sodio, ajustados a una densidad de 1.077, resulta útil para fraccionar células (5). Estos ensayos se han realizado en humanos (18) y a partir de ellos se han implementado sus principios a los animales, como en los pavos (10). El fundamento utilizado para esta línea blanca es aprovechar su adherencia al vidrio y aun más en vidrio siliconizado, eliminando linfocitos y eritrocitos que se encuentran en mayor porcentaje (2,3,10,14,18).

La cantidad de leucocitos es variable, dependiendo de la especie, sexo y edad (14) por lo tanto para aislar monocitos se requiere obtener toda la línea leucocitaria. Usando gradientes de Ficoll-Hypaque se logra obtener la capa de monocitos y linfocitos en pavos(10). Andreasen y Latimer(1992), además reportan la presencia de eosinófilos, basófilos y trombocitos en la capa mononuclear de pollos de engorda, debido a la relación de peso y tamaño de monocitos con las otras células sanguíneas y la perdida durante su purificación (5,14).

Con la técnica descrita en el presente trabajo es posible obtener un aislamiento *in vitro* de monocitos viables y puros, necesarios para realizar ensayos bactericidas y fagocíticos.

ESTA TESIS DE BEBE
ESTÁ EN LA BIBLIOTECA

El aislamiento de heterófilos, resulta más complejo para la obtención óptima en pureza (12,17), debido a que el tamaño de eritrocitos y heterófilos, es muy parecido (10 a 15 μ) (4,14), sin embargo utilizando el método de gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque es posible obtener una capa visible de heterófilos, separados de los eritrocitos (7); cabe señalar que el número de heterofilos aislados también depende de la especie, edad y sexo del ave (14).

El uso de gradiente 1.119 logra aislar 74.8 % de heterófilos con 90 % de viabilidad, pero estos resultados no son óptimos para pruebas de fagocitosis (6). La presencia de eritrocitos debe ser eliminada para evitar alteraciones en la evaluación fagocítica y bactericida de los heterófilos (2).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por Andreasen y Latimer (1992), las variaciones en el número de células es muy amplio y demuestra que hay diferencias entre los mismos individuos. Este hecho no es el único, ya que el punto crítico para lograr su aislamiento comienza en la obtención de la sangre y el anticoagulante (3,17) y la recolección de la capa flogística. Otro punto crítico es la recolección de los heterófilos del gradiente 1.119, ya que los heterófilos se encuentran mezclados homogéneamente con trombocitos y/o eritrocitos, dificultando su purificación (3).

La modificación que se hizo a la técnica de aislamiento de heterófilos descrita por Andreasen y Latimer (2),

consiste en pasar sólo la capa flogística por los gradientes, para remover desde el inicio casi la totalidad de eritrocitos, siendo mas fácil la ubicación y recolección de heterófilos de la parte superior del histopaque 1.119, aunque en el resto del gradiente también haya heterófilos y eritrocitos remanentes. En este caso la pureza y viabilidad son elevados, teniendo menos del 4 % de contaminación por los eritrocitos; mientras tanto la cantidad de células aisladas es relativamente baja (Cuadros 1 y 2), siendo estas características aceptables para realizar estudios *in vitro* de fagocitosis, poder bactericida y quimiotáxis (11,13).

LITERATURA CITADA

- 1.-Andreasen J.R.: Heterophil Chemotaxis in Chickens with Natural Staphylococcal Infections. Avian Diseases 16:374-380 (1993)
- 2.-Andreasen, C.B. and Latimer K.S.: Separation of turkey heterophils from blood using two-step Ficoll-Hypaque discontinuos gradients. Avian Diseases 31:571-573 (1989).
- 3.-Andreasen, C.B. and Latimer, K.S.: Separation of avian heterophils from blood using two-step Ficoll-Hypaque discontinuos gradients. Avian Diseases 31:163-167 (1989).
- 4.-Banks W.J.: Histología Veterinaria Aplicada. 1a ed. Ed. Manual Moderno. México D.F., 1986.
- 5.-Boyum A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand Clinics Laboratory Investigation 21:77; (1968).
- 6.-Chang C.F. and Hamilton P.B.: The Thombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. J. Reticuloendothelial Soc. 25:585-590 (1979).
- 7.-English D. and Andreasen B.R.: Single-step separation of red blood cells, Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuos density gradient, of Ficoll-Hypaque. Journal Immunology Methods 5:248; (1974).
- 8.-Janeway Ch.A.: How the Immune System Recognizes Invaders. Scientific American September:41-47, (1993).

9.-Lighbody J.: In Manual of Clinical Immunogy. Editors American Society for Microbiology. Washington D.C. 1976.

10.-Matsumoto M. and Strain J.G.: An improved method for the purification of blood cells of turkeys. Avian Diseases 15:221-223 (1990).

11.-McConnell C.D.G., Adair B.M. and McNulty M.S.: Effects of Chicken Anemia Virus on Macrophage Function in Chickens. Avian Diseases 37:358-365, (1993).

12.-Noble P.B. and Cutts J.H.: Isolation of individual leukocyte types from peripheral blood. Journal Laboratory Clinics Medicine 72: 533-538 (1968).

13.-Stabler J.G. McCormick T.W., Powell K.C. and Kugut M.H.: Avian Heterophils and Monocytes: Phagocytic and Bactericidal Activities Against *Salmonella enteritidis*. Avian Diseases, en prensa (1993).

14.-Sturkie P.D.: Avian Physiology. 4a. ed. Ed.Acribia Zaragoza España 1986.

15.-Tavera C. S., Cenicerros R. M., Urquiza B. O., Quintana L. J., Casaubon H. T., Valladares C. J.: Reporte de los casos de diagnóstico remitidos al departamento de producción animal aves FMVZ, UNAM. Memorias de la XVIII Convención Nacional ANECA A.C. Cancun Quintana Roo; Mayo: 1993.

16.-Tizard I.: Inmunología Veterinaria 3a edición. Ed. Interamericana. México D.F. 1989.

17.-Topp R.C. and Carlson H.C.: Studies on Avian Heterophils III Phagocytic properties. Avian Diseases 16:374-380 (1972).

18.-Topp R.C. and Carlson H.C.: Studies on avian heterophils. I. Cell separation. Avian Diseases 16:364-380 (1972).

CUADRO 1
PARAMETROS EVALUADOS EN LA PURIFICACION DE MONOCITOS
AVIARES A PARTIR DE SANGRE COMPLETA

PRUEBA	NUM. CELULAS/ML	% VIABILIDAD	% PUREZA
1	460,000	98.0	96.0
2	440,000	98.5	96.0
3	440,000	99.0	94.0
4	340,000	98.0	95.0
5	300,000	97.0	95.5
6	350,000	97.0	97.0
7	390,000	97.0	95.0
8	310,000	99.0	94.0
9	250,000	97.0	95.0
10	270,000	96.0	94.0
MEDIA ± D.E. (*)	---	97.65 ± 1	95.17 ± 0.97
INTERVALO	250,000 a 460,000	---	---

* DESVIACION ESTANDARD

CUADRO 2
PARAMETROS EVALUADOS EN LA PURIFICACION DE HETEROFILOS
AVIARES A PARTIR DE SANGRE COMPLETA

PRUEBA	NUM. CELULAS/ML	% VIABILIDAD	% PUREZA
1	500,000	100	95.0
2	920,000	100	96.0
3	412,000	100	94.0
4	400,000	100	99.0
5	660,000	100	97.0
6	930,000	98	97.4
7	910,000	98	96
8	770,000	98	95
9	1,150,000	100	99.3
10	1,150,000	100	99.0
MEDIA ± D.E. (*)	---	99.40 ± 0.40	96.77 ± 0.97
INTERVALO	400,000 A 1,150,000	---	---

• DESVIACION ESTANDARD