

Obtención de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica.

César I. Pérez-Maldonado

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela.

Recibido Febrero 26, 2007. Aceptado Marzo 12, 2007

MACROPHAGES OBTAINED FROM MONONUCLEAR CELLS PRESENT IN PERIPHERAL BLOOD

Resumen

El eje monocito-macrófago o sistema mononuclear fagocítico participa eficazmente en procesos fisiológicos y patológicos. Los macrófagos constituyen la primera línea de defensa contra agentes extraños y controlan procesos degenerativos eliminando células anormales e inhibiendo su división. El tipo de activación durante la diferenciación de monocito a macrófago debe estar controlado, a fin de obtener resultados objetivos en su análisis molecular, funcional o morfológico. Las técnicas *in vitro* son usadas ampliamente para éste tipo de estudios. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar un método sencillo y eficaz, basado en la capacidad de adhesión de los monocitos al plástico y su diferenciación, a fin de obtener macrófagos inactivos (naive) a partir de sangre total. Su utilización permitirá, mediante la activación con ciertos antígenos y la adición de citocinas o mitógenos, realizar estudios sobre la expresión de genes que se regulan transduccionalmente.

PALABRAS CLAVE: Monocitos, Macrófagos, Células mononucleares

Abstract

*The monocyte-macrophage axis or mononuclear phagocytic system participates efficiently in physiologic and pathological processes. Macrophages are the first line of defense against foreign agents; in addition, they control degenerative processes eliminating abnormal cells and inhibiting their division. The activation during the differentiation of monocyte to macrophage should be controlled, so objective results at the molecular, functional or morphological level could be obtained. These *in vitro* techniques are broadly used for this type of studies. The purpose of this report is to describe a simple and effective method for the isolation and differentiation of monocytes to inactive (naive) macrophages. The technique is based on the capacity of blood monocytes to adhere on plastic and differentiate to naive macrophages. The naive macrophages thus obtained, could be useful in studies on the expression of transductionally regulated genes, following activation with antigens and cytokines or mitogens.*

Key Words: Monocytes, Macrophages, Mononuclear cells

Introducción

Una parte esencial en el complejo funcionamiento de nuestro sistema inmunológico la constituyen sus componentes celulares. Un rango extenso de funciones antimicrobianas y antiparasitarias y su amplia distribución en nuestro organismo, caracterizan al sistema mononuclear fagocítico o eje monocito-macrófago (1, 2). El mismo está constituido de monocitos circulantes (4-6 % del total de las células leucocitarias) y macrófagos tisulares que se identifican y reciben un nombre particular según la localización anatómica, específicamente: células de Kupffer en hígado,

macrófagos alveolares en pulmón, microglía en sistema nervioso central, osteoclastos en hueso, células tipo A sinoviales en articulaciones, e histiocitos o células de Langerhans en piel (3). Su elevado poder fagocítico es esencial en la regulación y control de células anormales. La infiltración de los macrófagos en tejidos tumorales y la destrucción de estas células, le confieren un protagonismo esencial en los mecanismos de defensa tumoral. Los macrófagos secretan mediadores que inhiben la división de las células tumorales, esto se suma a su actividad citotóxica directa (MTC, *macrophage-mediated tumour cytotoxicity*) por la presencia de anticuerpos

mediante la citotoxicidad tipo ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (1, 3, 4). La presencia en monocitos y macrófagos de receptores de superficie para las fracciones Fc de la inmunoglobulina G (IgG) son de gran utilidad en su identificación (6). El FcRI (CD64) es un receptor que se expresa claramente en monocitos y macrófagos activados, y juega un papel de suma importancia en las reacciones de tipo ADCC. El FcRII (CD32) se halla también en los neutrófilos, linfocitos B y algunos linfocitos T y participa en la respuesta T proliferativa, siendo además una diana para las células asesinas naturales o células NK (7, 8). Los monocitos y los macrófagos son células presentadoras de antígeno (CPA) muy importantes, por tanto poseen moléculas de clase II de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (HLA-DR, - DP y - DQ) (9, 10). Los antígenos de superficie de los monocitos y macrófagos son de gran relevancia en su estudio. La molécula CD14 es el antígeno de superficie más característico de la línea monocitaria y se le denomina LBP (*lipopolysaccharide binding protein*). Se expresa en alta densidad tanto en monocitos como en macrófagos y constituye un excelente marcador de superficie (11, 12). El antígeno CD68 se manifiesta de forma abundante solamente en macrófagos y tiene funciones asociadas a la endocitosis de organismos extraños como levaduras, virus, bacterias, parásitos protozoarios y células tumorales (13). Su acción en la defensa local está mediada por componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), endotoxina de las bacterias Gram negativas que es determinante en el control de infecciones microbianas y procesos granulomatosos degenerativos (14). En estos últimos, su actividad puede ser nociva y a menudo, exacerba algunas situaciones patológicas como las observadas en la sarcoidosis y la tuberculosis (15).

La diferenciación de los monocitos a macrófagos depende de las condiciones de activación y de cultivo, debido a que la estimulación con antígenos o anticuerpos dirigidos contra sus receptores produce efectos particulares en su morfología, síntesis de mediadores químicos y expresión de sus moléculas de superficie (16). El análisis molecular, funcional o morfológico de las células fagocíticas debe llevar un control óptimo de las condiciones de su activación. La diferenciación *in vitro* es un método ampliamente usado en estudios sobre desarrollo, función y actividad de los

macrófagos, y a diferencia de los obtenidos *in vivo*, estos son macrófagos no activados o naive. Los macrófagos naive, mediante una activación controlada pueden aportar datos importantes sobre el origen celular y molecular de su actividad enzimática, producción de mediadores solubles y expresión antigénica, así como de las posibles alteraciones en las mismas (5). Existen otros métodos que permiten obtenerlos a partir de médula ósea induciendo la diferenciación mediante la adición al medio de cultivo de citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina IL-4 o los factores de crecimiento M-CSF y GM-CSF (4, 16, 17); sin embargo, estos ensayos son costosos. El contacto de los receptores de la superficie celular del monocito al colágeno o al plástico, dan inicio a la señalización intracelular necesaria para su diferenciación, lo que permite la obtención de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica (5,18). Este método de bajo costo y fácil realización, nos provee de una fuente confiable para obtener macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica *in vitro*, que se pueden emplear en una amplia gama de estudios. Lo versátil, sencillo y económico de su realización permite además emplear antígenos, factores de crecimiento, citocinas o anticuerpos, para inducir la maduración de los monocitos y el estudio de la expresión de diferentes genes en los macrófagos, de acuerdo al tipo de activación empleado (21, 22, 26, 27). En el presente trabajo se estandarizó éste sencillo y eficaz método para obtener macrófagos inactivos a partir de sangre total.

Material y Métodos

Separación de las células mononucleares

La separación de las células mononucleares se realizó por el método de centrifugación por densidad (Ficoll). La técnica de diferenciación celular por adherencia se realizó mediante la modificación del método originalmente diseñado por Hassan et al. (18). Se obtuvieron entre 10 y 25 ml de sangre total de individuos clínicamente sanos, con reacción negativa a los diferentes marcadores virales del virus de la hepatitis B y al virus de la inmunodeficiencia humana. Las muestras se diluyeron con amortiguador salino (PBS) estéril y libre de LPS en proporción 1:1. Se colocaron en tubos de 50 ml sobre un gradiente de

Ficoll (Sigma, St.Louis, MO), para ser separados por centrifugación a temperatura ambiente y 900 g por un lapso de 30 minutos, empleando un rotor oscilante y con el freno de la centrifuga desconectado. Se recuperó el paquete celular de la interfase del tubo y se lavó dos veces con PBS mediante centrifugación a 200 g, por 10 minutos cada vez. El botón celular se resuspendió en 25 ml de medio DMEM (Gibco BRL, NY) con 10% de suero bovino fetal (DMEM-FBS) y se lavo nuevamente por centrifugación con PBS, para ajustarse a una concentración aproximada de 2×10^6 células/ml en medio DMEM -FBS al 10%. La viabilidad de cada suspensión celular se confirmó mediante el análisis con azul tripano.

Purificación del paquete mononuclear

Las células fueron colocadas en placas de Petri plásticas de 90 mm de diámetro (Fluka) y se incubaron a 37°C en cámara de CO₂ al 5%, por un periodo entre 45-60 minutos. Al final de la incubación se aspiró el sobrenadante del cultivo, a fin de eliminar las células no-adherentes (linfocitos y polimorfonucleares). A cada placa se le adicionaron 16 ml de solución PBS-EDTA 10 mM y nuevamente se incubaron durante 15 minutos a 37°C, en cámara de CO₂ al 5%. Los monocitos adheridos fueron recuperados mediante raspado del fondo de la placa.

Cultivo de las células

El volumen total de las células recuperadas, se inoculó en placas plásticas de 90 mm de diámetro con 25 µl de penicilina (10.000 U/ml) y estreptomycin (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO) e incubó a 37°C, en cámara de CO₂ al 5%. Para efectos de la evaluación fenotípica de los monocitos, este momento del cultivo se denominó día cero (día 0). El volumen inicial del medio de cultivo se reemplazó en su totalidad a las 48 horas, evitando aspirar las células que aún no estaban eficazmente adheridas. Se realizaron observaciones de los cultivos cada 24 horas y cada 3 días se renovó una tercera parte del medio de cultivo.

Marcaje celular y citometría de flujo

Las células se despegaron de la placa los días 0, 2, 7

y 14 de cultivo con ayuda de un raspador estéril, a fin de realizar el marcaje celular con los diferentes anticuerpos monoclonales. Para cada día se identificaron y prepararon 3 tubos, cada uno con el volumen equivalente a 2×10^5 células. Al tubo # 1 se le añadió 0.1 mM de anti-CD14 (Caltag, USA); al tubo # 2 se le adicionó 0.1 mM de anti-MHC II (Laboratorio de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona), y al tubo # 3, 0.1 mM de anti-CD68 (Caltag, USA). Los tres tubos se incubaron en hielo (4°C) por espacio de 30 minutos, y después se lavaron dos veces con 1 ml de PBS-FCS 10% y centrifugación a 200 g por 5 minutos. Posteriormente, a todos los tubos se les agregó 5 µl del conjugado IgG-FITC/GAM (Caltag, USA), en una dilución 1:200. Los tubos se incubaron a 4° por 30 minutos en la oscuridad. Se repitieron los lavados y las células se suspendieron en 1 ml de solución fijadora de PBS-formaldehído al 1%. El análisis celular se realizó en un citómetro de flujo EPICS-XL (Coulter Corporation, USA).

Análisis de la viabilidad celular

Se empleó el método de coloración supravital con azul tripano y se evaluó por observación microscópica directa.

Resultados

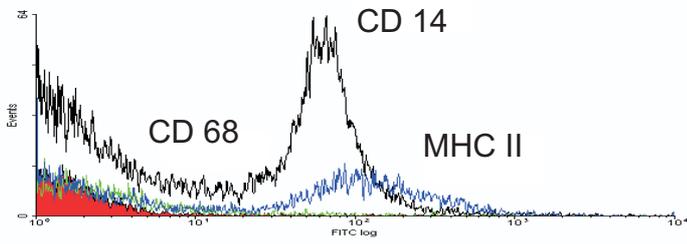
La pureza y viabilidad celular de las placas de cultivo se analizó mediante observación directa en microscopio de contraste de fase y en la mayoría de los cultivos se obtuvo entre 75% y 80% de monocitos purificados por adhesión al plástico. La viabilidad celular con azul tripano para los días 0, 2 y 7 arrojó valores de 90%, 70% y 50%, respectivamente. Después de dos semanas de cultivo los valores de viabilidad fueron menores al 50%. La evaluación por citometría de flujo se correspondió con las observaciones morfológicas en las placas de cultivo (Fig. 1).

La expresión de las moléculas CD14, CD68 y MHC de clase II sobre la superficie de las células estudiadas se muestran en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente.

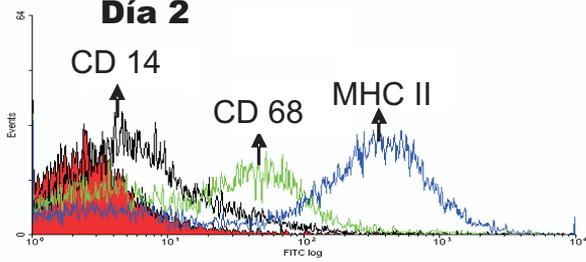
Discusión

El sistema monocito-macrófago juega un papel importante en la inmunidad natural y la inmunidad

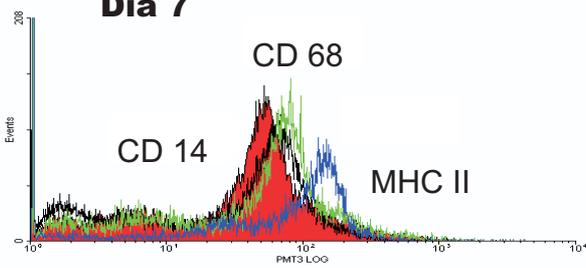
Día 0



Día 2



Día 7



diferenciación y maduración de monocitos a macrófagos. Estos niveles se equilibraron a partir del día 7 de cultivo. Las moléculas de clase II del MHC mantuvieron un aumento sostenido a lo largo del proceso (Fig. 4). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son comparables a los reportados por otros investigadores empleando metodologías de diferenciación monocito-macrófago más sofisticadas y de mayor costo operacional (9). Los macrófagos son células claves en el procesamiento de las sustancias supresoras de la respuesta inmune y de ciertas hormonas como la paratiroidea, de evaluación actual en estudios alérgicos y de autoinmunidad, donde la utilización de macrófagos naive seguramente permitirá abordar estudios fundamentales y necesarios para identificar la raíz de estas disfunciones. La necesidad de realizar estudios del efecto inhibitor de las prostaglandinas sobre los macrófagos en la producción de citocinas que potencian su acción bactericida, así como la expresión en el organismo humano de algunas moléculas de superficie, indispensables para la caracterización fenotípica de sus diferentes subpoblaciones, son ejemplos de la utilización de macrófagos obtenidos mediante el método aquí descrito (24). En algunas situaciones patológicas es posible aplicar esta técnica para evaluar la alteración de la capacidad para sintetizar interleucinas, así como la disminución de la expresión de los receptores de activación celular, que influyen marcadamente en la baja o nula producción de sustancias mediadoras de la inflamación y en su capacidad citotóxica (19, 22, 23, 25, 27). En publicaciones recientes se ha descrito el efecto de IL-4, IL-10, IL-13 e IFN sobre los monocitos en la obtención de células dendríticas (26, 27), donde el modelo a seguir puede ser obtenido a partir de macrófagos naive. De igual manera, un número significativo de estudios genéticos ha permitido la clonación de genes de macrófagos involucrados en la resistencia natural a ciertas infecciones bacterianas (19, 28).

En conclusión, el presente trabajo describe un método que posibilita la obtención de macrófagos viables a partir de monocitos de sangre circulante, funcionalmente inactivos (macrófagos naive o vírgenes), en completo estado de diferenciación y de alta pureza. La adición de antígenos al cultivo permitirán evaluar la activación celular, la producción de citocinas y la capacidad fagocítica de éstas células. El cultivo de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica representa un sencillo y muy accesible recurso dentro de nuestra actividad investigativa y profesional, dada su poca complejidad y bajo costo de realización. Su empleo impulsará el manejo práctico de los aspectos básicos de la biología molecular de los

monocitos/macrófagos, al poder contar en el laboratorio con una herramienta versátil que ofrece la posibilidad de realizar estudios e investigaciones en la inmunopatología de un importante número de enfermedades infecciosas, relacionadas con la participación del sistema fagocítico mononuclear.

Correspondencia: Dr. César I. Pérez-Maldonado, Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela. e-mail: cesarp@ula.ve

Referencias

- Lewis, C.E., McGee, J.O. (eds). 1992. The Macrophage. Oxford University Press. New York. 11-35.
- Gordon, S., Keshav, S. y Ghung L.P. 1988. Mononuclear phagocytes. Tissue distribution and functional heterogeneity. *Curr. Opin. Immunol.* 1:26-35.
- Van Furth, R. 1992. Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. *En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed, J.I. Gallin, R. Snyderman, eds. Raven, New York. 50-73.
- López, A.F., Elliot, M.J., Woodcock, J., Vadas, M.A. 1992. GM-CSF, IL-3 AND IL-5: Cross competition on human hematopoietic cells. *Immunol. Today* 3: 495-500.
- Nichols, B.A., Bainton, D.F. 1973. Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations. *Lab. Invest.* 29:27-31.
- Metzger, H. 1990. Fc Receptors and the action of antibodies. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 25-35.
- Ravetch, J.V. 1991. Fc receptors: rubor redux. *Cell* 78:553-560.
- Wright, S.D., Griffin F.M. 1985. Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J. Leuk. Biol.* 38:327.
- Gordon, S., Lawson, L. Raabinovich, R. Crocker, P.S. et al. 1992. Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181:1-37.
- Snider, D.D., Unanue, E.R. 1982. Corticosteroids inhibit murine macrophages Ia expression and interleukin-1 production. *J. Immunol.* 129:1803.
- Collman, R., Godfrey, B., Cutilli, J., Rhodes, A. et al. 1990. Macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1 utilize the CD4 receptor. *J. Virol.* 64:44-68.
- Matsuura, K., Ishida, T., Setoguchi, M., Higuchi, Y. et al. 1994. Upregulation of mouse CD 14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 179:1671-1676.
- Holness, C.L., daSilva, R.P., Fawcett, J. Gordon, S. et al. 1993. Macrosialin, a mouse macrophage -restricted glycoprotein is a member of the lamp/Igp family. *J. Biol. Chem.* 268:9661-9666.
- Fearon, D.T., Locksley, R. 1996. Innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50.

15. Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Koszyki, S. van Heinengen, T. et al. 1994. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* infected macrophages. *J. Immunol.* 153: 2568-2578.
16. Chapuis, F., Rosenzweig, M. Yagello, M., Ekman, M. et al. 1997. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 27:431-441.
17. De Waal-Malefyt, R., Fiador, C.G., Huijbens, R. Mohan-Peterson, R. et al. 1993. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytokine function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN on IL-10. *J. Immunol.* 151: 6370-6381.
18. Hassan, B. 1990. Preparation of adherent monocyte-derived macrophages. *J. Immunol. Meth.* 130: 283.
19. Gordon, S., Clarke, S., Greaves, D., Doyle, A. 1995. Molecular immunobiology of macrophages: recent progress. *Curr. Opin. Immunol.* 7:24-33.
20. Rappolee, D.A., Werb, Z. 1992. Macrophage-derived growth factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181: 87-126.
21. Chapova, A., Kamdar, S.J., Kremlev, S.G., Evans, R. 1998. CSF-1 (M-CSF) differentially sensitizes mononuclear phagocyte subpopulations to endotoxin in vivo: a potential pathway that regulates the severity of Gram-negative infections. *J. Leuk. Biol.* 63: 245-252.
22. De Ruggero, M., Cifone, M.G., Trotta, R., Rippon M.R. et al. 1994. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J. Exp. Med.* 180:1999-2004.
23. Marzio, R., Jirillo, E., Ransijn, A., Maule, J., Corradin, S.B. 1997. Expression and function of the early activation of CD69 in murine macrophages. *J. Leuk. Biol.* 62: 349-355.
24. Rogler, G., Hausmann, M. Vogl, D. Aschenbrenner, E. et al. 1998. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin. Exp. Med.* 112: 205-215.
25. Yokohama, W. 1995. Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 110-120.
26. De Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, G. Gaillard, C. et al. 1998. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.* 160: 1660-1676.
27. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage-colony stimulation factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118.
28. Mitchell, D., Nahir, S.K., Gilboa, E. 1998. Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 1923-1933.