



INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES EN BIOTECNOLOGÍA MÉDICA

PRACTICA

**“Extracción y preservación de células mononucleares de sangre
periférica “**

MAESTRIA EN MEDICINA REGENERATIVA

ALUMNO: DR. MANUEL VELEZ AGUILAR

MATRICULA: 201901116

Ensenada Baja California a 10 de Enero del 2020

Extracción y preservación de células mononucleares de sangre periférica

1. Introducción

En esta práctica aprenderemos la técnica correcta para la extracción y preservación de células mononucleares de sangre periférica, valoraremos la cantidad de células mononucleares viables antes de la preservación y el resultado final después de la preservación.

Recordaremos que una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) es una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo como los linfocitos o los monocitos. Estas células sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune concretamente para combatir las infecciones.

1.1 Monocitos

Los monocitos son fagocitos que se originan en la médula ósea a partir de células precursoras denominadas mielomonocitos (Meital) Son células mono nucleadas que tienen roles distintivos en los procesos de inmunidad y homeostasis. Son particularmente importantes en los procesos de inflamación y defensa (Ginhoux F. and Jung F., 2014).

Las poblaciones de monocitos se caracterizan por llevar a cabo diversas funciones efectoras, tales como: a) Vigilancia de los tejidos, b) activación de la respuesta inmune temprana, c) fagocitosis de patógenos y sustancias extrañas, d) reaprovisionamiento de macrófagos en tejidos periféricos. Constituyen aproximadamente el 10% de los leucocitos circulantes en sangre periférica (Meital L.T. et al., 2019).

La diferenciación de monocitos a macrófagos durante la inflamación por medio de señales del microambiente tiene un papel crucial en su activación y función. Tradicionalmente se pensaba que los macrófagos se polarizaban al fenotipo pro

inflamatorio M1 o al fenotipo alterno anti inflamatorio M2. Sin embargo, se ha reconocido que in vivo representan un espectro de fenotipos (Aoife K., Grabiec A.M. y Travis M.A, 2018).

In vivo, después de una lesión los macrófagos llegan al sitio de la lesión vía diapédesis. En las fases tempranas de la inflamación, las citosinas pro inflamatorias estimulan la polarización hacia macrófagos M1, los cuales tienen propiedades microbicidas. En la fase tardía el cambio en la señalización del microambiente y por el proceso de eferocitosis (eliminación de las células en apoptosis) genera la polarización hacia M2 los cuales impulsan la fase proliferativa del proceso de reparación tisular, de igual modo inducen la angiogénesis y la producción de la matriz extracelular (Das A. et al., 2015).

Debido a sus propiedades multifacéticas los macrófagos se asocian a condiciones que involucran remodelación tisular o inflamación, tales como aterosclerosis, fibrosis, obesidad y cáncer (Menck A. et al., 2014). Por tanto existe un interés constante en la posibilidad de manipular estas células para obtener un beneficio terapéutico, siendo que su manipulación podría disminuir su población o maximizar su movilización (Ginhoux F. and Jung F, 2014). Lo cual impulsa el desarrollo de métodos de extracción y purificación que sean reproducibles (Menck A. et al., 2014).

1.2 Conteo celular

El recuento o conteo celular es una técnica que permite conocer el número de células por mL, para llevarlo a cabo se ocupa el hemocitómetro o cámara de Neubauer, la cual consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm^2), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de $0.1 \text{ }\mu\text{L}$. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm^2 ($0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños (Arredondo Vega B.O. y Voltolina D.M, 2007). (Fig. 1).

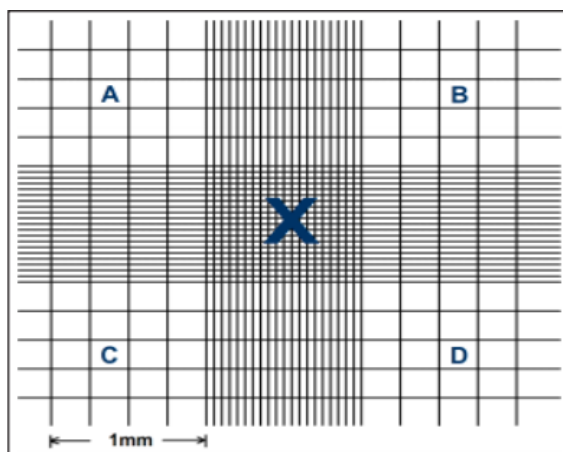


Figura 1. Rejilla de Neubauer de 9 mm^2 .

1.3 Criopreservación celular

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. Durante los procesos de criopreservación hay que tomar en cuenta los cambios biológicos que se originan como consecuencia a una disminución de la temperatura, si este proceso no se realiza de manera adecuada la viabilidad e integridad celular puede verse comprometida.

Una de las estructuras celulares que más se ve afectada en los procesos de criopreservación es la membrana celular, debido a la pérdida de la fluidez de los componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas.

Para poder llevar a cabo un protocolo de criopreservación es necesario contar con crioprotectores, los cuales son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor.

Existen dos tipos de crioprotectores: los penetrantes y los no penetrantes. Dentro de los penetrantes se encuentran el glicerol dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH), su característica principal es que son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. En cambio, los no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Ávila-Portillo L.M et al., 2006).

2. Objetivos:

Objetivo General:

1. Extraer monocitos de sangre periférica (**FIG. 1**).

Objetivos específicos:

1. Evaluar la calidad de la extracción al cuantificar por cámara de Neubauer
2. Conservar las células extraídas por diferentes métodos de criopreservación

3. Materiales y Métodos

3.1 Extracción de monocitos de sangre periférica

3.1.1 Materiales

Material para extracción de la muestra

1. Aguja para sistema de extracción por vacío
2. Soporte de extracción por vacío
3. Torniquete
4. Torundas de algodón alcoholadas
5. Banditas adhesivas redondas Skinprot®
6. Guantes de nitrilo

7. Gradilla para tubos

Material para aislamiento de células mononucleares

1. **Tubos Mn** para el aislamiento de células mononucleares
2. 15ml solución diluyente
3. Jeringas de 5 ml
4. Tubos cónicos de 15 ml para la recuperación del pellet de células mononucleares

3.1.2 Metodología

Llenado de los Tubos Mn para recuperación de células mononucleares de sangre periférica

1. Mantener los **Tubos Mn** para el aislamiento de células mononucleares a una temperatura entre 18-25°C.
2. Llenar cada uno de los **Tubos Mn** para el aislamiento de células mononucleares con aproximadamente 7 ml de la muestra recolectada.
3. Mezclar por decantación gentil la muestra de sangre invirtiendo el tubo 21 veces.
4. Transportar los tubos al laboratorio para su correspondiente procesamiento.

Procesamiento de la muestra para la recuperación de células mononucleares de sangre periférica

1. Centrifugar los **Tubos Mn** para el aislamiento de células mononucleares a 3500 rpm por 5 minutos en la centrifuga Centrificient II. **(FIG:2)**.
2. Abrir los tubos y aspirar cuidadosamente con una jeringa de 5 ml el sobrenadante de color amarillo de la muestra y desecharlo en el recipiente de rosca no estéril. **(FIG:3-4)**.
3. Decantar la capa de células mononucleares (capa transparente turbia) y pasar el contenido a cada uno de los tubos cónicos de 15 ml, distribuyendo equitativamente el contenido en ambos tubos
4. Centrifugar los tubos cónicos con las células mononucleares a 4000 rpm por 10 minutos en la centrifuga Centrificient II. **(FIG:5)**.
5. Decantar el sobrenadante de los tubos cónicos. **(FIG:6-7)**.
6. Agregar 1 ml de solución diluyente a los tubos cónicos con las células.
7. Homogenizar gentilmente hasta obtener una mezcla homogénea. **(FIG:8-9)**.

Procedimiento para conteo en cámara de Neubauer

1. Preparar una dilución 1:20 (20 μ l muestra + 380 μ L diluyente)
2. Mezclar suavemente la dilución **(FIG: 10)**.
3. Montar el cubreobjetos en la cámara de Neubauer
4. Llenar la cámara por capilaridad. (Debe llenarse de forma que el líquido ocupe toda su superficie) **.(FIG:11)**.
5. Dejar que repose durante 5 minutos en una cámara húmeda para que sedimenten las células
6. Enfoca primero con objetivo 10x y después con el de 40x. Comprueba que la distribución de las células es uniforme
7. Cuenta todos los leucocitos presentes en los 16 cuadros de los 4 cuadros grandes situados en las esquinas de la cámara **(FIG:12)**.
8. No contar artefactos microscópicos como partículas extrañas, pequeñas burbujas, etc. Recuerda que para realizar un recuento correcto y no contar el mismo leucocito dos veces debes seguir el siguiente criterio.

Calculos

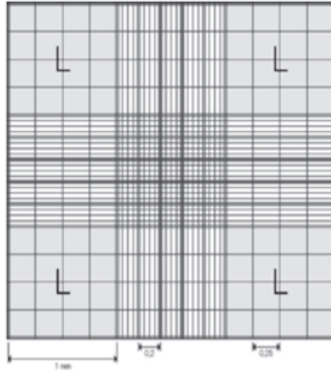
Para obtener el resultado final se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células por mm}^3 = L \cdot D \cdot CV$$

L es el número de células contados.

D es el factor de dilución.

CV es la corrección de volumen.



Para aplicar la fórmula anterior debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- ❖ Si se mezcla 20 microlitros de sangre y 380 microlitros de diluyente. La dilución realizada es 1:20. Por tanto deberemos multiplicar por veinte. ($D = 20$).
- ❖ Como el recuento lo hemos hecho en los 16 cuadros de los 4 cuadros grandes situados en las esquinas de la cámara, el volumen total en el que hemos realizado el recuento será $0,1 \text{ mm}^3 \cdot 4 = 0,4 \text{ mm}^3$. Como el resultado del recuento lo tienes que expresar por mm^3 la corrección de volumen (CV) será igual a $1/0,4 \text{ mm}^3 = 2,5$

Si utilizas exactamente estas condiciones, es decir cuentas los leucocitos en $0,4 \text{ mm}^3$ y realizas una dilución 1:20 la fórmula se simplifica bastante.

$$\text{Número de leucocitos por mm}^3 = \text{Número de leucocitos contados} \cdot 2,5 \cdot 20$$

$$\text{Número de leucocitos por mm}^3 = \text{Número de leucocitos contados} \cdot 50$$

$$\text{Número de células por mm}^3 = \text{Número de células contadas} \cdot 50$$

3.2 Conservación de las células Mononucleares

3.2.1. Criopreservación de las células Mononucleares

INTRODUCCIÓN

La criopreservación es el método donde se utilizan bajas temperaturas con el fin de preservar las estructuras intactas de las células vivas. Las células se crio preservan para evitar pérdidas por contaminación, para minimizar cambios genéticos en líneas celulares y evitar la transformación en líneas finitas. Una criopreservación exitosa de células requiere seguir protocolos estandarizados y reproducibles, aunque cada protocolo puede requerir modificaciones según el tipo celular o línea a usar, para lograr la máxima viabilidad después del descongelamiento. Las células de mamíferos crio preservadas incluyen líneas celulares inmortalizadas, células primarias aisladas a partir de tejidos y células madre. Las células de mamíferos se congelan comúnmente con un criopreservante; DMSO o glicerol, y se disminuye la temperatura a una velocidad de 1°C/minuto para evitar los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo del agua dentro de la célula.

PREPARACIÓN DE CELULAS

Generalmente la preparación del criovial (o también llamado criotubo) (**FIG:16**), se lleva a cabo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar de cultivo de células. Las suspensiones celulares suelen ser mantenidas frías (0,5 a 4,0 °C), por lo que se requiere del uso de hielo fuera de la campana o una unidad de refrigeración libre de hielo dentro de la campana. (**FIG:18**).

CONGELAMIENTO CELULAR

Generalmente la criopreservación de células requiere una velocidad de congelamiento controlada de -1°C por minuto para la mayoría de los tipos celulares. La congelación se puede realizar en un congelador de reducción de temperatura programada, en un congelador de -80°C (**FIG:19**) o en un contenedor de hielo seco con un recipiente de congelamiento pasivo a velocidad controlada. Los métodos actuales, tales como los que utilizan los contenedores de congelación a base de alcohol y cajas de poliestireno no proporcionan velocidades de congelación uniforme a todos los crioviales y no son reproducibles.

Procedimiento (criopreservación) (**FIG:14**).

1. Prepárese con anterioridad alícuotas de la solución de criopreservación agregando 900 μL de PBS o NaCl (0.9%) + 100 μL de DMSO o glicerol a crioviales (**FIG:17**), de 1.5 mL. Almacénelos en el congelador a -20°C .
2. Una vez obtenidos los crioviales homogeneice la solución y manténgalos bajo hielo a -4°C .
3. Rotule cada criovial con los siguientes datos: ID único, fecha, número de células totales en el Criovial expresadas en millones y porcentaje de viabilidad. Por Ejemplo: MXSLP01, 22NOV19, 3.5, 90%. Coloque y mantenga los crioviales bajo hielo.
4. Corrija la concentración celular obtenida del procedimiento de aislamiento de CMN a 5×10^6 CMN/mL con RPMI-1640.
5. Agregue 1 mL de la suspensión de CMN a 5×10^6 células/mL al crio vial que contiene la solución de criopreservación. Repita este mismo procedimiento hasta procesar la totalidad de las células extraídas.
6. Homogeneice la mezcla de CMN y solución de criopreservación por agitación y manténgase en hielo a -4°C .

7. Coloque los crioviales en el congelador de -20°C durante al menos 2 horas.
8. Transfiera los crioviales al ultra congelador (-80°C) durante al menos 8 horas.
9. Transfiera los crioviales al tanque de nitrógeno líquido a -196°C .

Descongelación de células criopreservadas.

La descongelación de CMN es un procedimiento muy sencillo, pero no se recomienda realizarlo en varias muestras a la vez, ya que el DMSO es tóxico para las células CMN a temperatura ambiente. Si se piensa procesar más de dos muestras, retire los crioviales del ultracongelador a -80 grados $^{\circ}\text{C}$, y colóquelos a -4 grados $^{\circ}\text{C}$ sin que el tiempo para su procedimiento sobrepase una hora.

Procedimiento (descongelación). (FIG:20).

1. Descongele (2 MINUTOS) una cantidad apropiada de RPMI o DMEN a 37°C calculando el volumen a razón de 10 mL por crio vial. Lo haremos en solución fisiológica o PBS.
2. Retire los crioviales del ultracongelador y descongélelos parcialmente agitando **(FIG:21)** en baño de agua a 37°C **(FIG:22)**, durante exactamente 2 minutos. ¡No deben descongelarse por completo a temperatura ambiente! **(FIG:23)**. Una vez que se hayan descongelado parcialmente deberán colocarse en hielo.(15 MINUTOS).
3. Añada 4 mL de Solución Fisiológica o RPMI-1640 a 37°C a un tubo de fondo redondo (FALCON) de 15 mL. (Con la finalidad de diluir el preservante).
4. Permita que el criovial con CMN se termine de descongelar por completo bajo hielo e inmediatamente decante el contenido del criovial al tubo de cultivo de fondo redondo previamente preparado.
5. Enjuague el criovial cuantas veces sea necesario con 1 mL de solución fisiológica o RPMI-1640, vertiendo su contenido al tubo de fondo redondo o conico con el objeto de recuperar la mayor parte de las células criopreservadas. Mezclando suavemente.

6. Centrifugue el tubo de fondo redondo a 400 G por 10 minutos **(FIG:24)**, programando la centrifuga para una desaceleración sin freno.
7. Deseche el sobrenadante por decantación directa a un frasco de descontaminación con NaCl al 0.5%. Re suspenda las CMN en el RPMI remanente y afore a 1 mL con solución fisiológica o RPMI-1640 (Hacerlo en 2 ocasiones).**(FIG:25)**.
8. Proceda a realizar el conteo de células en cámara de Neubauer **(FIG:11-12)** y Teñir con azul de metileno **,(FIG:13)** para evaluar su viabilidad de acuerdo al protocolo de “Conteo y Viabilidad”.
9. Ajuste la concentración de CMN entre 2×10^6 y 10×10^6 células/mL y proceda con el protocolo de transformación descrito en “Transformación Celular”

RESULTADOS:

Obtuvimos al inicio 6200 células viables contabilizadas en cámara de Neubauer.

Se obtuvieron en el conteo de la cámara de Neubauer:	
CSI=98	
CSD=68	TOTAL= 310
CII= 72	
CID= 72	

Dilución 1:20 $20+380=400/20=20$ mlts
muestra con 380 mlts diluyente.

Fórmula para leucocitos.

L= células contadas = 310

D= 20

CV= 1

Ecuación= $310 \times 20 \times 1 = 6,200$ células.

Se realiza la criopreservación con tres criopreservante, 2 penetrantes: Glicerol al 10%, DMSO al 10% y uno no-penetrante: Dextrosa al 25% y Cloruro de sodio al 0.9% (Solución Fisiológica) se sigue protocolo indicado y a los 28 días se realiza el protocolo de descongelación y bajo microscopia de fluorescencia se observa una lisis celular total de las tres muestras criopreservadas por lo cual no se pudo realizar conteo en microscopia de contraste de fases. **(FIG: 28, 29 y 30 respectivamente)**.

CONCLUSIÓN:

El proceso de criopreservación debe de realizarse siguiendo estrictamente el protocolo de extracción, conservación, congelamiento y descongelamiento.

En esta práctica, a pesar de haber seguido el protocolo antes descrito, se perdió la viabilidad total de las células.

Se observó que el proceso de descongelamiento fue muy rápido y se tomó la decisión de congelar nuevamente la muestra por 5 minutos más.

Se tardó en hacer la re suspensión y lavado, al igual que el manejo que se le dio al volverlas a temperatura ambiente, ya que el protocolo de extracción y criopreservación se llevó a cabo según protocolo.

Sin duda todos estos factores contribuyeron a la lisis celular total de las tres muestras procesadas, de acuerdo a lo observado en la microscopia de fluorescencia.

ANEXOS:



FIG: 1 Toma de muestra.



FIG: 2 Centrifugado.



FIG: 3. Muestra Centrifugada.



FIG: 4 Separar Sobrenadante.

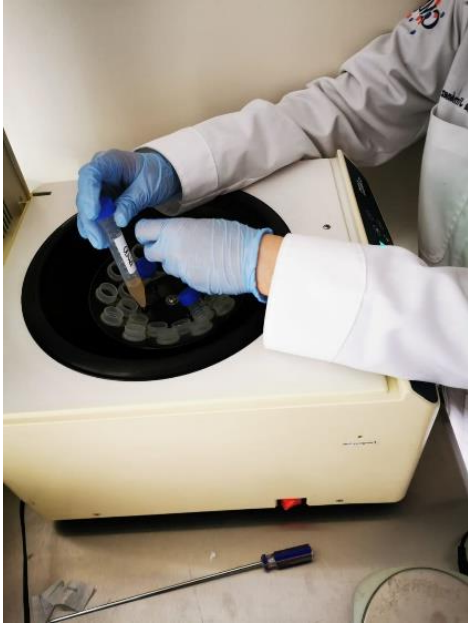


FIG: 5 Centrifugado a 4000rpm



FIG 6: Extracción de sobrenadante



Fig. 7: Decantar el sobrenadante.



FIG. 8 : *Homogenizar*



FIG. 9 *Homogenizar*

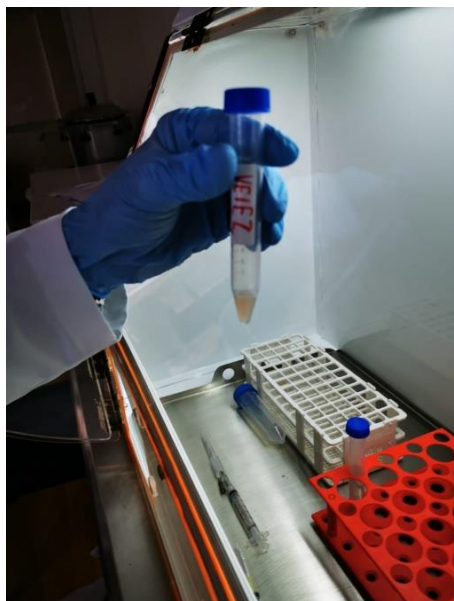


FIG. 10: Dilución



FIG. 11: Llenar la camara de Neubauer

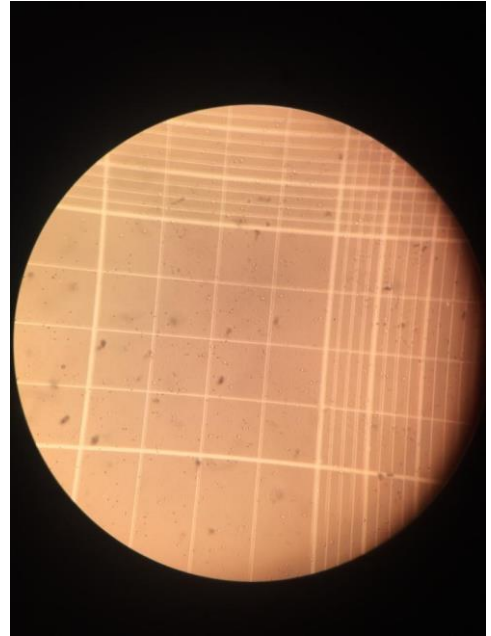
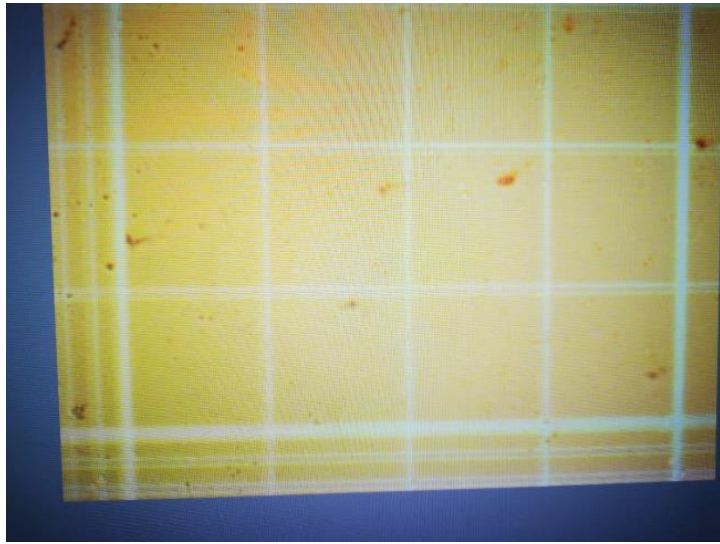


FIG. 12: Conteo Celular.

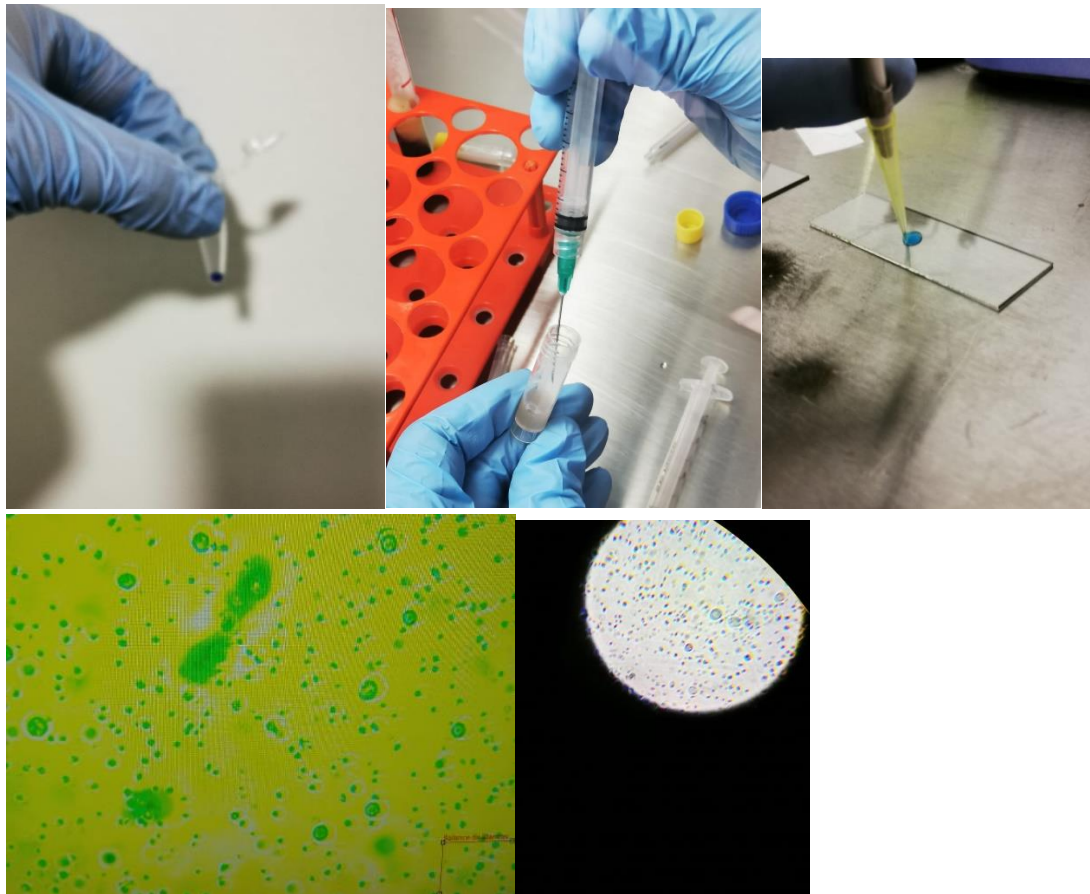


FIG. 13: Tinción con azul de metileno para observar viabilidad celular.

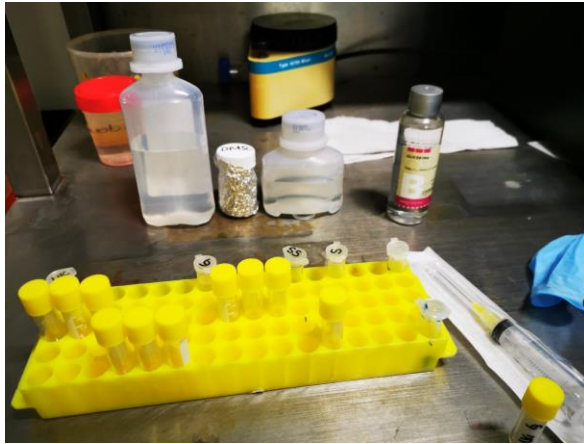


FIG. 14: Preparación para la criopreservación celular, DMSO, Glicerol, Dextrosa.



FIG. 15: Distribución de células.



FIG. 16: Criovial.

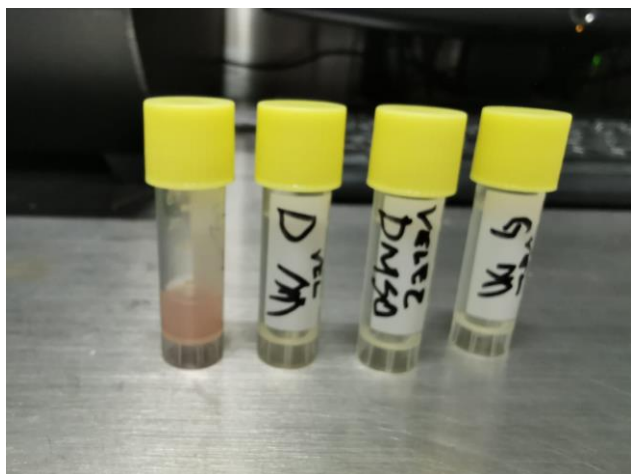


FIG. 17: Crioviales con crioprotectores.



FIG: 18: Congelación a -4 ° C.



FIG. 19: Congelación a -80 ° C

DESCONGELACION.



FIG. 20: Recipiente de Traslado.



FIG. 21: Preparación para baño maria.



FIG. 22: Baño maria a 37°C por 2 min.



FIG. 23: Colocacion en hielo de
Crioiales por 15 min.

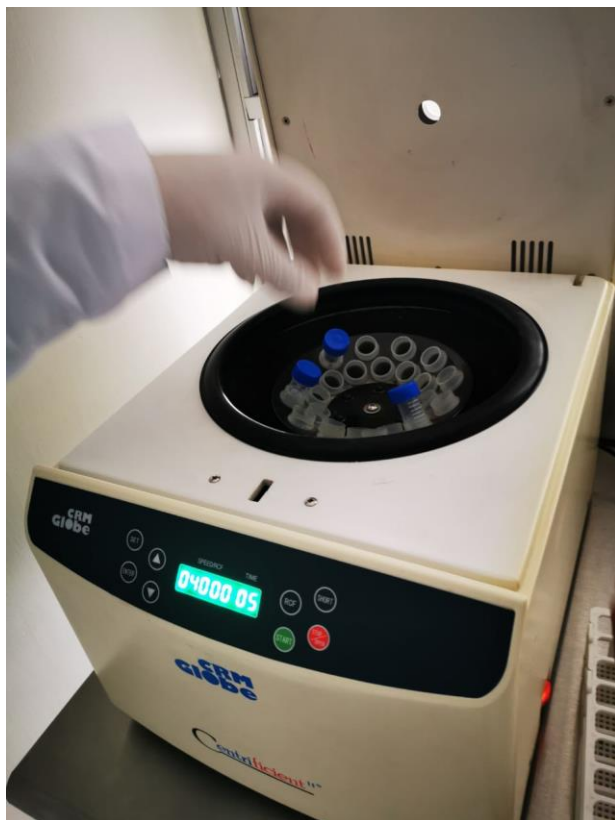


FIG. 24: Centrifugacion a 4000 rpm.por 10 min.



FIG. 25: Resuspension y Obtención de Pelet.



FIG. 26: Resuspension de celulas mononucleares en 1 ml. NaCL al 0.5%

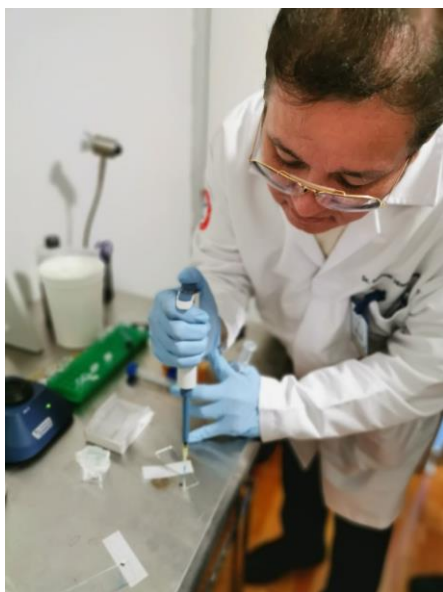


FIG. 27: Protocolo de Conteo y Viabilidad.



Fig. 28 Crioconservador Glicerol: Células lisadas.

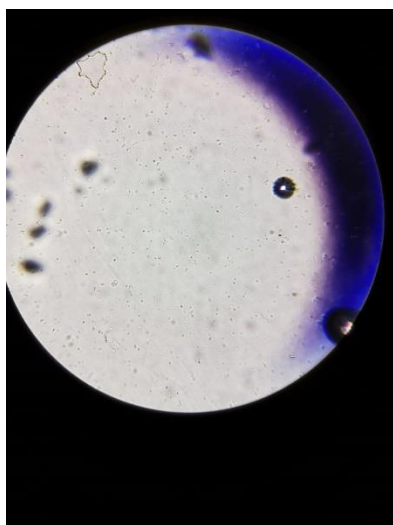


Fig. 29 Crioconservador Dextrosa: Células lisadas.



Fig. 30 Crioconservador DMSO: Células lisadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Aoife K. Grabiec A.M and Travis M.A (2018). Culture of human Monocyte- derived macrophages. *Methods in Molecular Biology*. 1784.
2. Arredondo- Vega B.O y Voltolina D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de biomasa micro alga. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La paz. México
3. Ávila- Portillo et al. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57(4): 291-300.
4. Das A. et al. (2015). Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American Journal of Pathology*. 158.(10): 2596-2606.
5. Ginhoux F. and Jung S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature*. 14:392-404.
6. Meital L.T. et al. () A simple and effective method for the isolation and culture of human monocytes from small volumes of peripheral blood. *Journal of Immunological Methods*. 472 (2019): 75-78
7. Menck K. et al. (2014). Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in Teflon-coated cell culture bags. *JOVE*. 91:1-10
8. Cheng, L, et al. Cryopreserving Whole Blood for Functional Assays Using Viable Lymphocytes in Molecular Epidemiology Studies. *Cancer Letters* 166 (2001) 155-163.
9. Mayor N, Marsh SGE. EBV Supernatant Production, Protocol for BLCL Generation. Anthony Nolan Research Institute. University College and Royal Free Hospital School of Medicine, London, United Kingdom.
10. Gorodezky C, et al. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Histocompatibilidad. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto de Diagnóstico y Referencia.