

Estudio comparativo morfológico y funcional de los granulocitos neutrófilos humanos obtenidos por los métodos de filtración y de centrifugación a flujo continuo

Francisco Cardellach López

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO COMPARATIVO MORFOLOGICO Y FUNCIONAL DE LOS
GRANULOCITOS NEUTROFILOS HUMANOS OBTENIDOS POR LOS
METODOS DE FILTRACION Y DE CENTRIFUGACION A FLUJO
CONTINUO

Tesis presentada por
D. Francisco CARDELLACH LOPEZ
para aspirar al Grado de
Doctor en Medicina
Octubre, 1979

UNIVERSIDAD DE BARCELONA



Cirilo ROZMAN BORSTNAR, Catedrático de Patología y Clínica Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA: que la tesis doctoral: "Estudio comparativo morfológico y funcional de los granulocitos neutrófilos humanos obtenidos por los métodos de filtración y de centrifugación a flujo continuo", realizada por D. Francisco CARDELLACH LOPEZ para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, y dirigida por el que suscribe, está en condiciones de ser leída ante el tribunal correspondiente.

Lo que se hace constar a los efectos oportunos en Barcelona, a 30 de septiembre de 1979.

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
II Cátedra de Patología
y Clínica Médicas
Prof. C. Rozman**

A Begoña

A Marta

A mis padres

Al Prof. C. Rozman, cuya inteligencia y
espíritu de trabajo han sido
siempre para mí motivo de
admiración y afecto

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Evaristo FELIU FRASNEDO, por la orientación y supervisión de la presente tesis doctoral.

A la Srta. Margarita MARTI HERNANDEZ, por su eficaz y constante colaboración.

A la Dra. Estela MATUTES JUAN por su ayuda en la realización de los cálculos estadísticos.

A mis compañeros de la Escuela de Hematología "Farreras Valentí" y del resto del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona por su desinteresada colaboración.

Al Sr. Robert CABRE por la puntual obtención de las muestras.

Al Ministerio de Educación por la concesión de la Beca de Ayuda a la Investigación los cursos académicos 1977-78 y 1978-79, para la realización de la presente tesis.

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

GN	= Granulocito neutrófilo
MEB	= Microscopio electrónico de barrido
MET	= Microscopio electrónico de transmisión
RER	= Retículo endoplásmico rugoso
Ig	= Inmunoglobulina
AMP	= Adenosina monofosfato
GMP	= Guanosina monofosfato
SHM	= Shunt de las hexosas monofosfato
NADH	= Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD ⁺	= Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADPH	= Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NADPH ⁺	= Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NAT	= Nitroazul de tetrazolio
SOD	= Superoxidodismutasa
GSH	= Glutati3n reducido
GS-SG	= Glutati3n oxidado
GPX	= Glutati3n peroxidasa
GR	= Glutati3n reductasa
MPO	= Mieloperoxidasa
6GP	= 6-glucosa fosfato
G6PD	= Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
6PG	= 6-fosfogluconato
6PGD	= 6-fosfato-gluconato-deshidrogenasa
H ₂ O ₂	- Per3xido de hidr3geno

- GN(CF) = Granulocitos neutrófilos obtenidos por el sistema de centrifugación
- GN(FL) = Granulocitos neutrófilos obtenidos por el sistema de filtración
- GN(M) = Granulocitos neutrófilos de donantes a los que se les había administrado la medicación

INDICE

- I. MOTIVACION GENERAL
- II. MOTIVACION PERSONAL
- III. OBJETIVO DE LA TESIS DOCTORAL
- IV. REVISION BIBLIOGRAFICA
 - 4.1. Introducción
 - 4.2. Aspectos ultraestructurales del GN en reposo
 - 4.2.1. Núcleo
 - 4.2.2. Membrana citoplásmica
 - 4.2.3. Gránulos
 - 4.2.4. Centriolo y microtúbulos
 - 4.2.5. Microfilamentos
 - 4.2.6. Otras estructuras
 - 4.3. Aspectos ultraestructurales del GN en estado funcional
 - 4.3.1. Desplazamiento
 - 4.3.2. Ingestión
 - 4.3.3. Desgranulación
 - 4.4. Aspectos fisiológicos del GN
 - 4.4.1. Quimiotactismo
 - 4.4.1.1. Factores extragranulocitarios
 - Quimiotácticos
 - Bacterianos
 - Séricos. Derivados del complemento
 - Derivados de la activación del factor Hageman

INDICE

- I. MOTIVACION GENERAL
- II. MOTIVACION PERSONAL
- III. OBJETIVO DE LA TESIS DOCTORAL
- IV. REVISION BIBLIOGRAFICA
 - 4.1. Introducci3n
 - 4.2. Aspectos ultraestructurales del GN en reposo
 - 4.2.1. N3cleo
 - 4.2.2. Membrana citopl3smica
 - 4.2.3. Gr3nulos
 - 4.2.4. Centriolo y microt3bulos
 - 4.2.5. Microfilamentos
 - 4.2.6. Otras estructuras
 - 4.3. Aspectos ultraestructurales del GN en estado funcional
 - 4.3.1. Desplazamiento
 - 4.3.2. Ingesti3n
 - 4.3.3. Desgranulaci3n
 - 4.4. Aspectos fisiol3gicos del GN
 - 4.4.1. Quimiotactismo
 - 4.4.1.1. Factores extragranulocitarios
 - Quimiot3cticos
 - Bacterianos
 - S3ricos. Derivados del complemento
 - Derivados de la activaci3n del factor Hageman

Celulares. Derivados de los GN

Derivados de los linfocitos

Derivados de los macrófagos

Otros

Antiquimotácticos

Inactivadores de las citotaxinas

Inhibidores de la quimiotaxis

4.4.1.2. Factores granulocitarios

Receptores localizados en la superficie
celular

Serín esterases

Mecanismos contráctiles. Microtúbulos

Microfilamentos

Cationes

Metabolismo ener-
gético

Nucleótidos cícli-
cos

4.4.2. Ingestión

4.4.2.1. Factores extragranulocitarios:opsonización

Opsoninas termoestables

Opsoninas termolábiles

4.4.2.2. Factores granulocitarios

Membrana citoplásmica

Microfilamentos

Microtúbulos

Nucleótidos cíclicos intracelulares

Metabolismo energético

4.4.2.3. Factores ambientales

4.4.3. Desgranulación

4.4.3.1. Microtúbulos

4.4.2.2. Microfilamentos

4.4.3.3. Nucleótidos cíclicos

4.4.3.4. Metabolismo energético

4.4.3.5. Otros

4.4.4. Mecanismos bactericidas

4.4.4.1. Generalidades

4.4.4.2. Sistemas bactericidas O_2 -dependientes

4.4.4.3. Sistemas bactericidas O_2 -independientes

4.5. Revisión de los estudios funcionales realizados en los GN obtenidos por leucaféresis

V. MATERIAL Y METODO

5.1. Estudio morfológico

5.1.1. Examen óptico

5.1.2. Examen ultraestructural

5.1.3. Análisis estadístico

5.2. Estudio funcional

5.2.1. Aislamiento de los GN

5.2.1.1. Método de sedimentación en Dextrano

5.2.1.2. Método de sedimentación en una mezcla de Dextrano-Pielograf

5.2.2. Obtención del suero

5.2.3. Quimiotactismo

5.2.4. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico

5.2.5. Reducción del NAT. Método colorimétrico

5.2.6. Producción de radical superóxido (O_2^-). Método de la

reducción del ferricitocromo C

5.2.7. Yodación

5.2.8. Análisis estadístico

VI. RESULTADOS

6.1. Estudio morfológico

6.1.1. Examen óptico de los GN en cortes semifinos

6.1.2. Examen ultraestructural

6.1.2.1. Alteraciones nucleares

6.1.2.1. Alteraciones citoplasmáticas

6.2. Funcionalismo de los GN del grupo control

6.2.1. Quimiotactismo

6.2.2. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico

6.2.3. Reducción del NAT. Método colorimétrico

6.2.4. Producción de anión superóxido

6.2.5. Yodación

6.3. Funcionalismo de los GN obtenidos por el procedimiento de filtración

6.3.1. Quimiotactismo

6.3.2. Movilidad al azar

6.3.3. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico

6.3.4. Reducción del NAT. Método colorimétrico

6.3.5. Yodación

6.4. Funcionalismo de los GN obtenidos por el procedimiento de centrifugación

- 6.4.1. Quimiotactismo
- 6.4.2. Movilidad al azar
- 6.4.3. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico
- 6.4.4. Reducción del NAT. Método colorimétrico
- 6.4.5. Yodación
- 6.5. Aspectos funcionales comparativos entre los procedimientos de centrifugación y de filtración
 - 6.5.1. Quimiotactismo
 - 6.5.2. Movilidad al azar
 - 6.5.3. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico
 - 6.5.4. Reducción del NAT. Método colorimétrico
 - 6.5.5. Yodación
- 6.6. Efecto de la medicación sobre el funcionalismo granulocitario
 - 6.6.1. Quimiotactismo
 - 6.6.2. Movilidad al azar
 - 6.6.3. Ingestión de partículas de bactolátex y reducción del NAT. Método citoquímico
 - 6.6.4. Reducción del NAT. Método colorimétrico
 - 6.6.5. Yodación

VII. DISCUSION

VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES

IX. BIBLIOGRAFIA

I. MOTIVACION GENERAL

El enfermo portador de una hemopatía puede presentar múltiples complicaciones en relación con alteraciones cuantitativas o cualitativas de los elementos formes de la sangre (hematíes, leucocitos, plaquetas) que comprometen su supervivencia y pueden conducirle a la muerte por anoxia anémica, infecciones graves o hemorragias viscerales. Por otra parte, los citostáticos empleados en las hemopatías malignas deprimen profundamente la medula ósea y fomentan los riesgos anteriormente citados. Debido a ello, el tratamiento de soporte constituye uno de los pilares básicos del tratamiento de estos enfermos en espera de que la medula ósea recupere de nuevo su celularidad normal.

En estos pacientes, la infección es una de las principales causas de muerte (1-9) y debido a ello su prevención y tratamiento han polarizado la atención de gran número de investigadores en la última década. Diversos autores (10-14) han demostrado que la combinación del aislamiento en una unidad libre de gérmenes junto con antibioterapia profiláctica de descontaminación del tubo digestivo, orificios y pliegues cutáneos, reduce en gran manera la morbilidad y mortalidad infecciosas en adultos con hemopatías malignas que reciben terapéutica de inducción a la remisión. Con todo, el aislamiento y descontaminación de los enfermos hematológicos portadores de leucemias agudas, aplasias medulares o agranulocitosis no siempre es

posible, pues en muchas ocasiones llegan ya infectados a las manos del médico especialista. Generalmente, estas infecciones son producidas por gérmenes oportunistas, sobre todo del grupo de las enterobacteriáceas, entre las que cabe destacar a la *Ps. aeruginosa*, *Klebsiella enterobacter* y *E. coli*, y también por hongos del género *Candida*. Los procesos infecciosos más frecuentes son las neumonías e infecciones de las mucosas y de la piel, y a menudo estos enfermos desarrollan septicemias que comprometen seriamente su supervivencia. Cuando esto sucede, los dos recursos fundamentales de que se dispone en la actualidad son los antibióticos y las transfusiones de granulocitos.

La antibioterapia empírica, administrable cuando aún no se conoce el tipo de germen responsable de la infección, se realiza asociando aminoglucósidos (*gentamicina*, *tobramicina*), penicilinas sintéticas (*carbenicilina*) y derivados cefalosporánicos (*cefalotinas*, *amikacina*) (15-18), aunque pueden realizarse otras asociaciones (19).

La transfusión de granulocitos constituye un interesante método para la lucha contra las infecciones en los pacientes granulopénicos, si bien se enfrenta todavía con una serie de problemas por resolver.

La eficacia de las transfusiones de GN en el tratamiento de las septicemias por gérmenes gram negativos y de las infecciones por candidas en pacientes neutropénicos y en animales de experimentación en las mismas condiciones, ha sido ampliamente comprobada (20-34).

La obtención de los granulocitos (*leucaféresis*) se realiza fundamentalmente mediante dos procedimientos completamente distintos: el sistema de centrifugación a flujo continuo y

el sistema de filtración. La centrifugación a flujo continuo (35-37) consiste en la separación de la sangre del donante, heparinizada e impulsada hacia la centrífuga mediante bombas peristálticas, en sus distintos componentes, que posteriormente son aspirados mediante otras bombas peristálticas: la de leucocitos, que conecta la capa leucocitaria con una bolsa de transfusión, y las de hematíes y plasma, que conectan entre sí para mezclar ambos componentes y reintegrarlos al donante.

El sistema de filtración es un método descrito más recientemente (38,39), basado en la propiedad que poseen los granulocitos de adherirse de forma reversible a los filtros de ciertas sustancias, como el nylon. Este método consta de dos partes fundamentales: la primera es el paso de la sangre a través de los filtros de nylon (Leukopak, Fenwal Laboratories), en donde quedarán retenidos los granulocitos; la segunda consiste en la elución de los filtros con soluciones quelantes para liberar los GN allí adheridos. Posteriormente son concentrados por sedimentación o centrifugación a fin de poder ser transfundidos.

Toda transfusión de GN lleva implícita la consecución de tres objetivos fundamentales: 1) obtener el máximo número de GN con un mínimo coste, 2) traumatizar las células lo mínimo posible durante la leucaféresis con la finalidad de que conserven su capacidad funcional, y 3) alcanzar una buena respuesta clínica. Si bien el método de filtración es más sencillo y económico que el de centrifugación, y proporciona mayores rendimientos (40,41), para algunos autores su eficacia clínica es inferior a los de los GN obtenidos por el procedimiento de centrifugación (41,42).

Los estudios de laboratorio que hasta el momento han sido

realizados para valorar la capacidad funcional de los GN obtenidos por ambos métodos quizás se inclinan a favor del sistema de centrifugación. Los leucocitos así obtenidos muestran una morfología poco alterada (40,43) y su funcionalismo parece ser correcto en todas sus etapas (44,45). La vida media intravascular es normal y se consiguen notables aumentos postransfusionales en el receptor (21,33, 40-42).

Por el contrario, los GN obtenidos mediante el procedimiento de filtración presentan importantes alteraciones morfológicas imputables a su paso a través de los filtros (45-49). Desde el punto de vista funcional, las alteraciones observadas también son importantes, apreciándose notables disminuciones de la capacidad de ingestión, actividad bactericida y del quimiotactismo. Asimismo, la vida media intravascular se halla disminuida en el receptor y los aumentos postransfusionales también son menores con este método (21,23,40,41,44,45) o bien éstas desaparecen tratando a los donantes con ciertos fármacos o disminuyendo el tiempo de adherencia de los GN a los filtros (45-51).

Si todas estas alteraciones morfológicas y funcionales observadas en los GN obtenidos mediante el sistema de filtración interfieren o no con la eficacia clínica, no está demostrado. Prueba de ello es que cuando se efectúa una valoración clínica de las transfusiones de GN centrada en el control de la infección, es decir, valorando la desaparición de los focos infecciosos preexistentes, la desaparición de las condensaciones pulmonares y la negativización de los cultivos bacteriológicos, las respuestas son similares para ambos procedimientos, habiéndose obtenido muy buenos resultados clínicos con ambos métodos (21,23,33,47,52,53). Con todo, las reacciones

adversas en el donante y en el receptor son más frecuentes cuando se utiliza el sistema de filtración (21,23,42,44,51, 52,54).

La aplicación práctica de las transfusiones de GN fue llevada a cabo por primera vez en nuestro Servicio por el Dr. A. GRAÑENA y los resultados del amplio trabajo realizado quedaron bien reflejados en su tesis doctoral, presentada en el año 1977 bajo el título: Transfusión de Granulocitos (34). Actualmente, el tratamiento de soporte con GN obtenidos por leucaféresis constituye una medida obligatoria en todos los pacientes granulocitopénicos que presentan infección. Hemos creído que, una vez cumplida esta primera etapa asistencial, sin duda la más importante, debíamos profundizar en el estudio de las células que transfundimos a los pacientes, con la finalidad de adquirir nuestra propia experiencia al respecto y con el ánimo de que nuestros hallazgos pudiesen, aunque de forma indirecta, contribuir a mejorar la asistencia clínica de estos enfermos.

II. MOTIVACION PERSONAL

A lo largo de mi estancia en la Clínica Médica C, primero como alumno interno y después como médico residente, las enseñanzas más relevantes que he obtenido de su Director, el Prof. C. ROZMAN, han sido fundamentalmente dos: 1) la obligatoriedad de una buena formación en el campo de la Medicina Interna, cuyo ejercicio integrado subraya con tanto acierto mi director actual, el Prof. D. Alfonso BALCELLS GORINA, y 2) la necesidad para todo internista, de profundizar en alguno de los campos o especialidades en que aquélla puede dividirse.

Mi interés por el tema nació hace ya algunos años, durante mi permanencia en la sala de Medicina Interna, cuya dirección está a cargo del Dr. A. URBANO MARQUEZ, a quien quiero dar testimonio de mi agradecimiento y afecto. En ella tuve ocasión de vivir la problemática clínica, fundamentalmente infecciosa, del enfermo hematológico ingresado en una sala convencional. La creación de una unidad de aislamiento libre de gérmenes y la terapéutica de soporte con transfusiones de granulocitos ha supuesto un gran avance en el tratamiento de los enfermos con granulocitopenia.

Por otra parte, el interés por el estudio de los GN ha suscitado la atención de algunos compañeros de nuestro grupo y ha sido motivo de realización de sus tesis doctorales. Así, el Dr. J.M. FERNANDEZ-HUERTA(55) estudió el quimiotactismo granulocitario, la Dra. N. PUJOL (56), con la que tuve ocasión de colaborar, desarrolló el método de la reducción del NAT y su aplicación clínica, el Dr. A. GRAÑENA (34) introdujo en la clínica las transfusiones de granulocitos y el Dr. E. FELIU (57)

efectuó el estudio del funcionalismo granulocitario en la cirrosis hepática. Estos trabajos han ofrecido la posibilidad de ampliar esta línea de investigación hacia otros campos, como por ejemplo la determinación de las enzimas intragranulocitarias llevadas a cabo por el Dr. J.L. VIVES-CORRONS y el estudio a nivel funcional de la patología congénita del GN.

En nuestro Servicio la aplicación clínica de las transfusiones de granulocitos se efectúa desde hace aproximadamente 5 ó 6 años. Una vez establecida esta primera etapa asistencial, sin duda la más importante, he creído de interés profundizar en el estudio de los GN obtenidos mediante el procedimiento de leucaféresis, con el ánimo de que nuestros hallazgos podrían de alguna forma contribuir a mejorar la asistencia clínica de los enfermos con granulocitopenia. La posibilidad que tenía de combinar los estudios funcionales con la observación morfológica ultraestructural de las células, influyó notablemente en la elección de la presente tesis doctoral.

III. OBJETIVO DE LA TESIS DOCTORAL

En el proceso de leucaféresis intervienen diversos factores, como el tiempo requerido para obtener un número suficiente de GN, la premedicación que reciben los donante, el traumatismo mecánico que supone el propio proceso de obtención, etc., que pueden alterar en grado variable a los GN. Estas alteraciones pueden repercutir de forma indirecta sobre la respuesta clínica del receptor con granulocitopenia.

El objetivo de la presente tesis doctoral es identificar las posibles alteraciones morfológicas y funcionales en los GN obtenidos con los procedimientos de centrifugación a flujo continuo y de filtración, e intentar averiguar cuáles pueden ser las causas responsables de las mismas.

IV. REVISION BIBLIOGRAFIA

4.1. INTRODUCCION

El granulocito neutrófilo (GN) tiene, como misión fundamental, la de luchar contra los agentes patógenos que invaden el organismo. Su función la realiza mediante el desplazamiento activo hacia el foco infeccioso, donde ingiere y destruye las bacterias. A diferencia de otras células, capaces de fagocitar sólo ocasionalmente y en menor grado, el GN pertenece al grupo de los llamados fagocitos "profesionales", por ser ésta su principal propiedad (58).

Los estudios al microscopio electrónico, tanto de barrido (MEB) como de transmisión (MET), han contribuido de manera notable a la comprensión de los aspectos funcionales del GN.

4.2. ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DEL GN EN REPOSO

En primer lugar procede analizar los aspectos ultraestructurales que muestra el GN en reposo y preguntarse acerca de la finalidad funcional de sus distintas subestructuras.

Cuando el GN en reposo se observa al MEB (Fig.1), aparece como una célula redondeada, en cuya superficie aparecen únicamente algunas microvellosidades y crestas (59). Este aspecto es bien distinto del monócito cuya superficie ofrece unas formaciones que le son bien características, los llamados "ruffles" o volantes fruncidos, comparables también a pétalos de flor.

El linfocito, además de ser más pequeño, suele tener la superficie poblada de microvellosidades.

Los cortes del GN en reposo, examinados al MET (60)

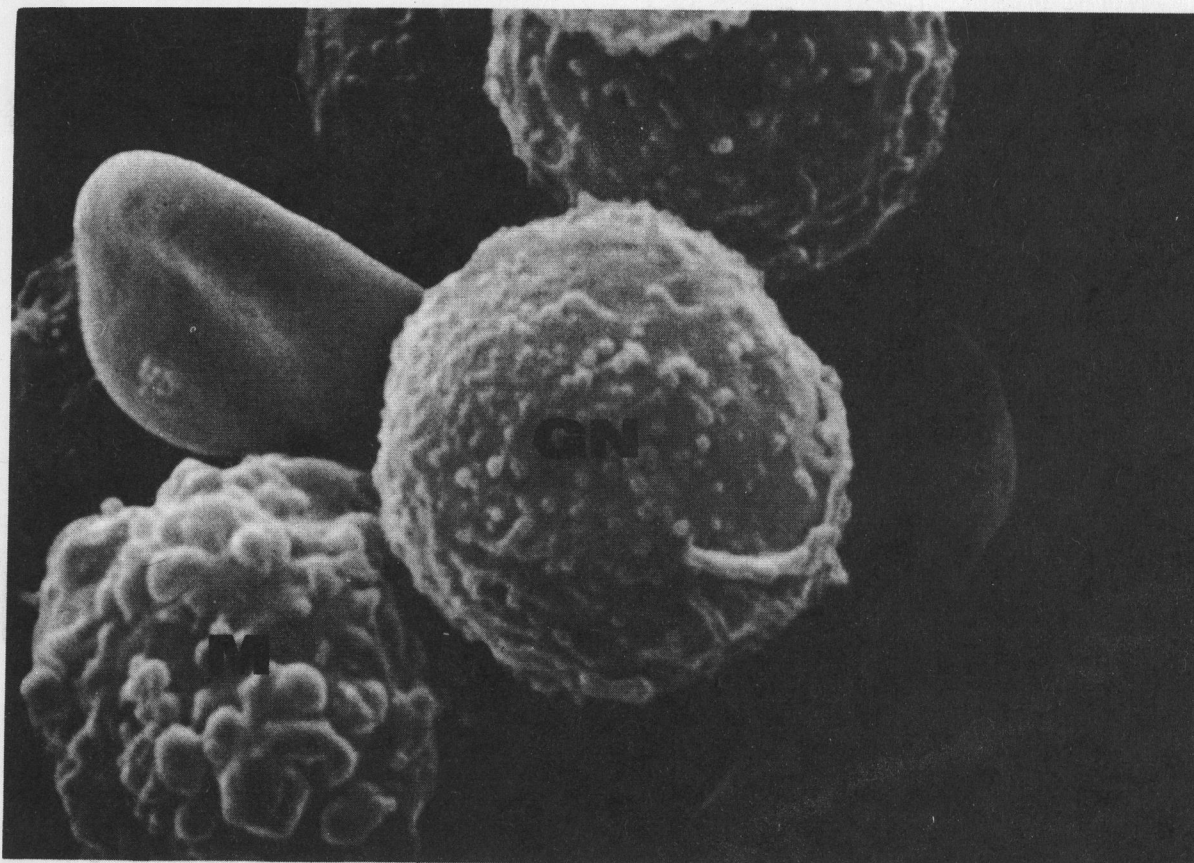


Fig. 1.- Preparación de sangre periférica vista al MEB. El GN muestra en su superficie una cresta y algunas microvellosidades. En cambio, el monocito (M) está poblado de "ruffles" o volantes fruncidos. (Aumento original 9.000x)

El linfocito, además de ser más pequeño, suele tener la superficie poblada de microvellosidades.

Los cortes del GN en reposo, examinados al MET (60) (Fig. 2), muestran una célula con uno o varios segmentos nucleares, un citoplasma lleno de orgánulos y una membrana celular.

4.2.1. El núcleo es propio de una célula madura, es decir, con predominio de heterocromatina y ausencia de nucléolos. El número de segmentos nucleares depende del eje por el que pasa la sección, pudiendo oscilar entre uno y cinco. En ocasiones, están unidos entre sí por finos puentes de heterocromatina (Fig. 3). El significado funcional de la segmentación nuclear parece ser el facilitar el desplazamiento de la célula (61,62), si bien aún falta sobre este punto la demostración definitiva.

4.2.2. La membrana citoplásmica ofrece la clásica estructura trilaminar (de 8 a 10 nm de espesor), con dos capas fosfolipídicas densas y otra proteica intermedia, más clara. Mediante tinciones especiales (con nitrato de lantano o rojo de rutenio) (63,64) cabe demostrar en la superficie externa de la membrana una cubierta amorfa (61), constituida por mucopolisacáridos. En ella asientan probablemente diversos receptores, tales como los de la fracción Fc de la IgG y los del C3, que tendrían gran importancia en la fase de reconocimiento, con la que se inicia la fagocitosis propiamente dicha.

4.2.3. Gránulos. - Son funcionalmente el componente citoplásmico más importante, ya que en ellos residen las sustancias destinadas a causar la muerte y degradación bacteriana. Atendiendo a su morfología y contenido se distinguen dos tipos principales (Tabla I): a) Granulación azurófila o primaria y

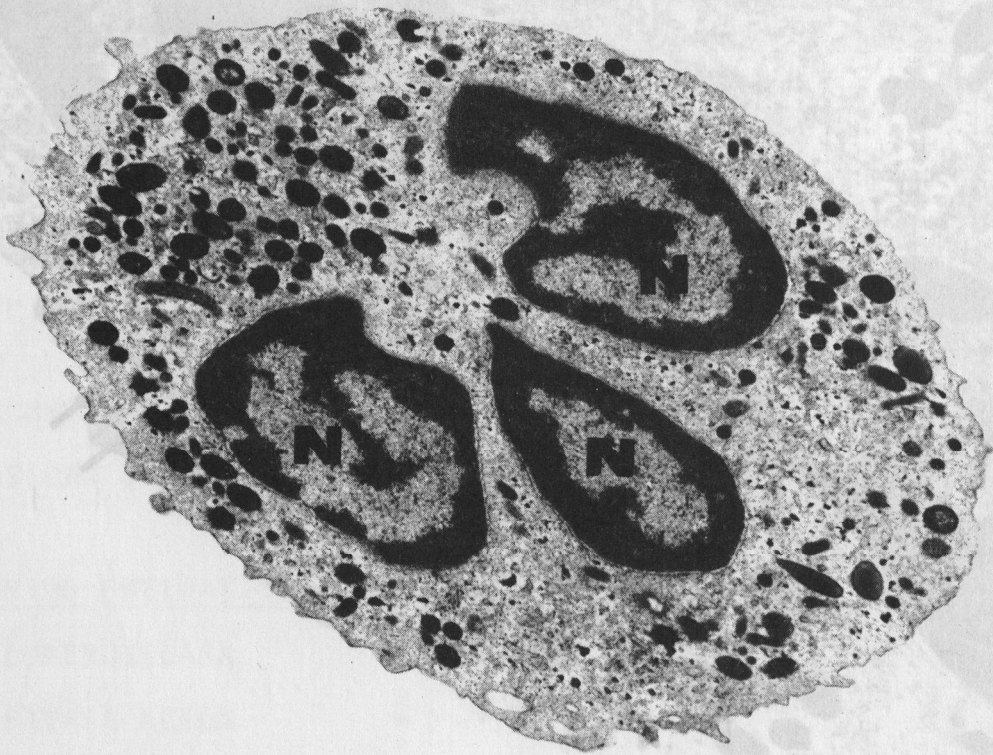


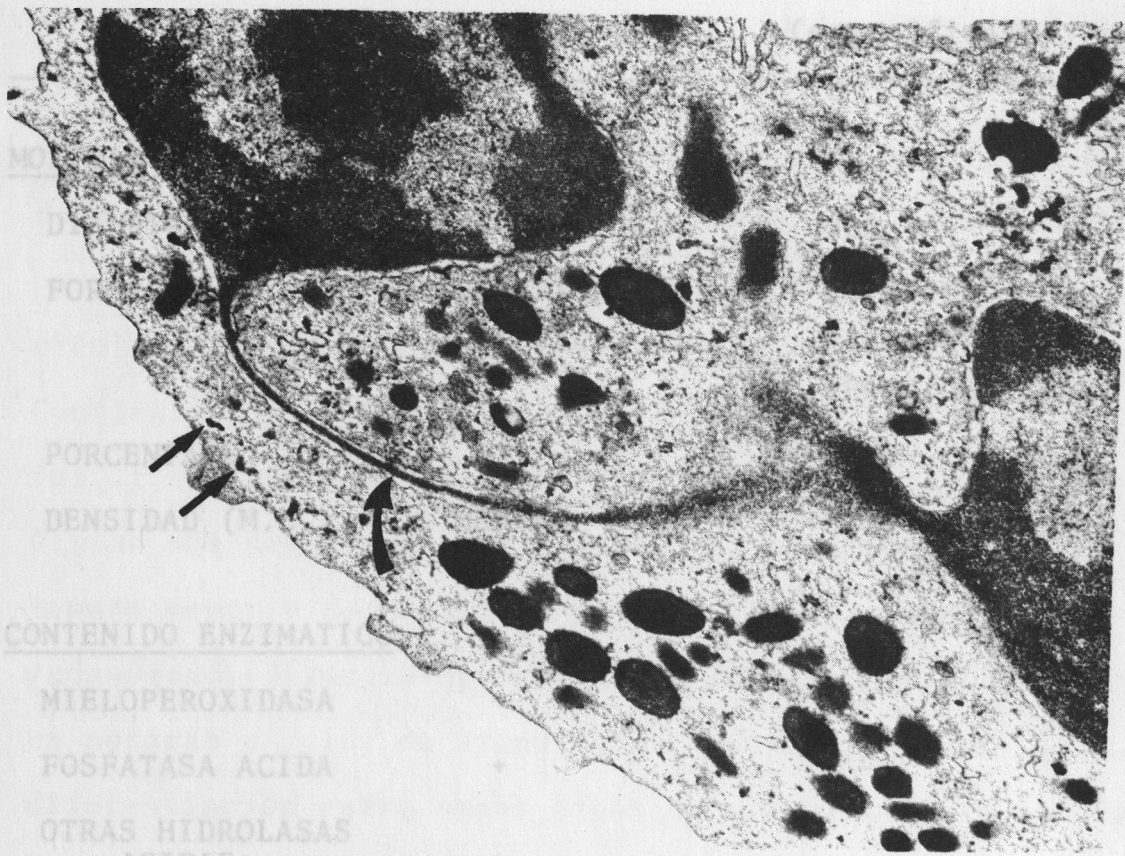
Fig. 2.- Imagen de un GN en sección, visto al MET. En el interior de esta célula destacan tres segmentos nucleares (N) y abundante granulación citoplásmica de distinto tamaño, forma y densidad. (Aumento original 16.000x)

TABLA I

TIPOS DE GRANULACIONES CONTENIDAS EN LOS GN

PRIMARIAS

SECUNDARIAS



CONTENIDO ENZIMÁTICO

- MIELOPEROXIDASA
- FOSFATASA ACIDA
- OTRAS HIDROLASAS ACIDAS
- MUCOSUSTANCIAS A. Y PROETINAS CATIONICAS
- LISOZIMA
- LACTOFERRINA Y COLAGENASA

Fig. 3.- Los dos segmentos nucleares están unidos entre sí por un fino puente de heterocromatina (flecha curva), rodeado de cisterna perinuclear. Junto a la granulación, cabe reconocer en el citoplasma numerosas partículas de glucógeno, algunas de ellas señaladas con flechas rectas. (Aumento original 30.000x)

TABLA I

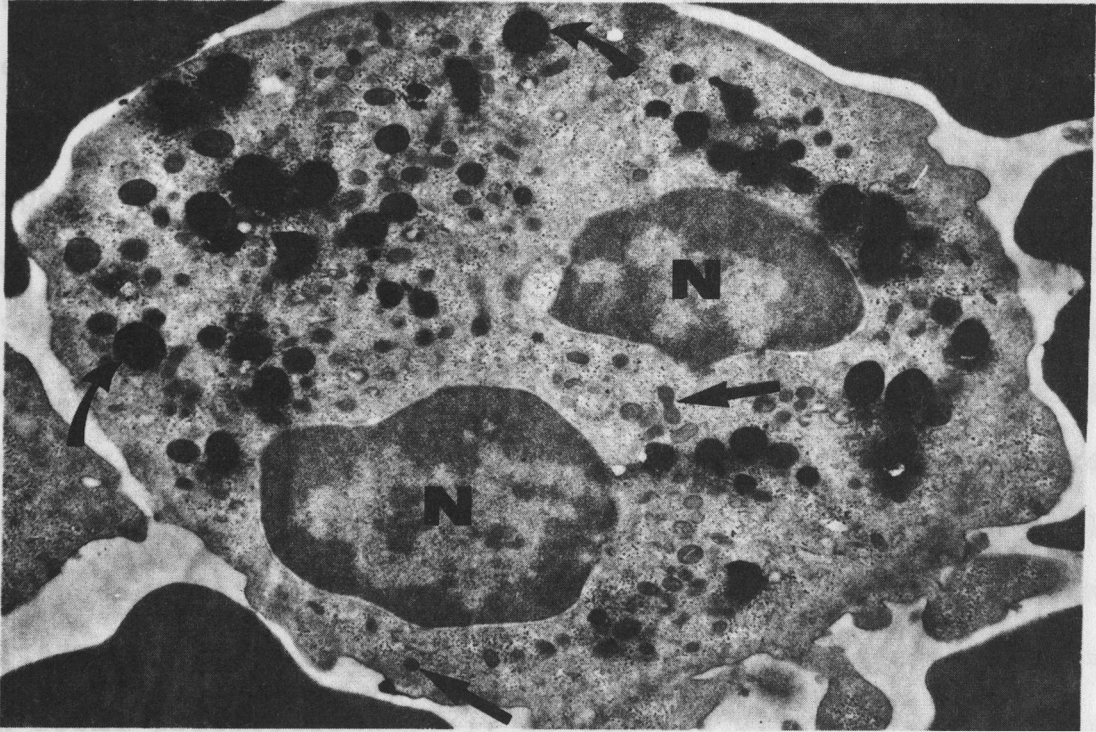
TIPOS DE GRANULACIONES CONTENIDAS EN LOS GN

	PRIMARIAS (azurófilas)	SECUNDARIAS (específicas)
<u>MORFOLOGIA</u>		
DIAMETRO (nm)	500	200
FORMA	ESFERICA ELIPTICA	ESFERICA CILINDRICA RELOJ DE ARENA
PORCENTAJE	33%	67%
DENSIDAD (M.E.)	MEDIA	MAYOR
<u>CONTENIDO ENZIMATICO</u>		
MIELOPEROXIDASA	+	-
FOSFATASA ACIDA	+	-
OTRAS HIDROLASAS ACIDAS	+	-
MUCOSUSTANCIAS A. Y PROETINAS CATIONICAS	+	-
LISOZIMA	+	+
LACTOFERRINA Y COLAGENASA	-	+
FOSFATASA ALCALINA	-	¿+?

b) Granulación específica o secundaria. Los gránulos azurófilos constituyen aproximadamente una tercera parte de toda la granulación (65, 66) y contienen: mieloperoxidasa, fosfatasa ácida y otras hidrolasas ácidas, proteínas catiónicas antibacterianas, mucosustancias ácidas y lisozima. Ofrecen, por tanto, las características de auténticos lisosomas. Son en general de tamaño bastante grande (unos 500 nm) y de forma redondeada o elipsoide. Su contenido es de densidad electrónica mediana. Los gránulos específicos constituyen 2/3 partes de la granulación y carecen de mieloperoxidasa y de hidrolasas ácidas. Contienen, en cambio, lactoferrina, colagenasa, lisozima y, tal vez, fosfatasa alcalina, si bien la localización exacta de esta última aún se discute (67-69). La granulación específica es de tamaño menor y de contenido más electrodenso. Muestra un perfil redondeado (diámetro aproximado de 200 nm) o bien baciliforme, en pesario o reloj de arena (unos 130 por 1.000 nm) (66). La diferenciación entre ambos tipos de granulación se consigue por los criterios morfológicos expuestos, pero es más precisa recurriendo a la demostración citoquímica de la actividad peroxidásica (70) que muestran los gránulos azurófilos (71) (Fig. 4).

Además de la granulación azurófila y específica se ha demostrado en los GN la existencia de orgánulos más pequeños que contienen catalasa y que han sido designados como peroxisomas (72,73). Por último se discute si existiría aún otro tipo de granulación, llamada terciaria, la cual contendría hidrolasas ácidas (67, 73-75).

4.2.4. Centriolo y microtúbulos. El centriolo del GN no difiere del de otras células y su función, al igual que en ellas, estriba en regular el proceso de la división celular. Pero,



capaces de despolimerizar y polimerizar, respectivamente, a la tubulina y, por tanto, de "desmontar" y "montar" los microtúbulos. Funcionalmente constituyen una parte importante del citoesqueleto e intervienen en la adhesión (78,79), quimiotaxis (80,81), formación de pseudópodos y desgranulación (32).

Fig. 4.- Reacción de la peroxidasa (con contraste muy débil). Se observan dos segmentos nucleares (N) y en el citoplasma, gránulos peroxidasa-positivos (azurófilos o primarios) (flechas curvas) y otros peroxidasa-negativos (específicos o secundarios) (flechas rectas). Los hematíes circundantes muestran también reacción positiva debido a su actividad pseudoperoxidásica. (Aumento original 16.000x).

4.2.4. Centriolo y microtúbulos.- El centriolo del GN no difiere del de otras células y su función, al igual que en ellas, estriba en regular el proceso de la división celular. Pero, además, y en estrecha unión con los microtúbulos, parece intervenir como vector de la migración dirigida o quimiotaxis.

Los microtúbulos presentan, en sección longitudinal, el aspecto de un canalículo (Fig. 5) de longitud variable y de unos 24 nm de diámetro. En sección transversal aparecen como círculos. Suelen organizarse de forma radial alrededor del centriolo, a cuyos satélites se adhieren pero cabe hallarlos también en otras zonas del citoplasma, sobre todo en la región submembranosa. En ésta se insertarían preferentemente en los puntos de contacto de la membrana con alguna superficie externa (76). Están compuestos por una proteína llamada tubulina, en forma polimerizada (77). Se conocen diversas sustancias capaces de despolimerizar y polimerizar, respectivamente, a la tubulina y, por tanto, de "desmontar" y "montar" los microtúbulos. Funcionalmente constituyen una parte importante del citoesqueleto e intervienen en la adhesión (78,79), quimiotaxis (80,81), formación de pseudópodos y desgranulación (82).

4.2.5. Microfilamentos.- Difíciles de detectar mediante las técnicas habituales, son finas estructuras fibrilares (Fig. 6). Los más importantes funcionalmente son los microfilamentos de actina, de unos 6 nm de diámetro (83) que forman una malla irregular en la zona submembranosa. Cabe evidenciarlos de modo más ostensible mediante la incubación con meromiosi-

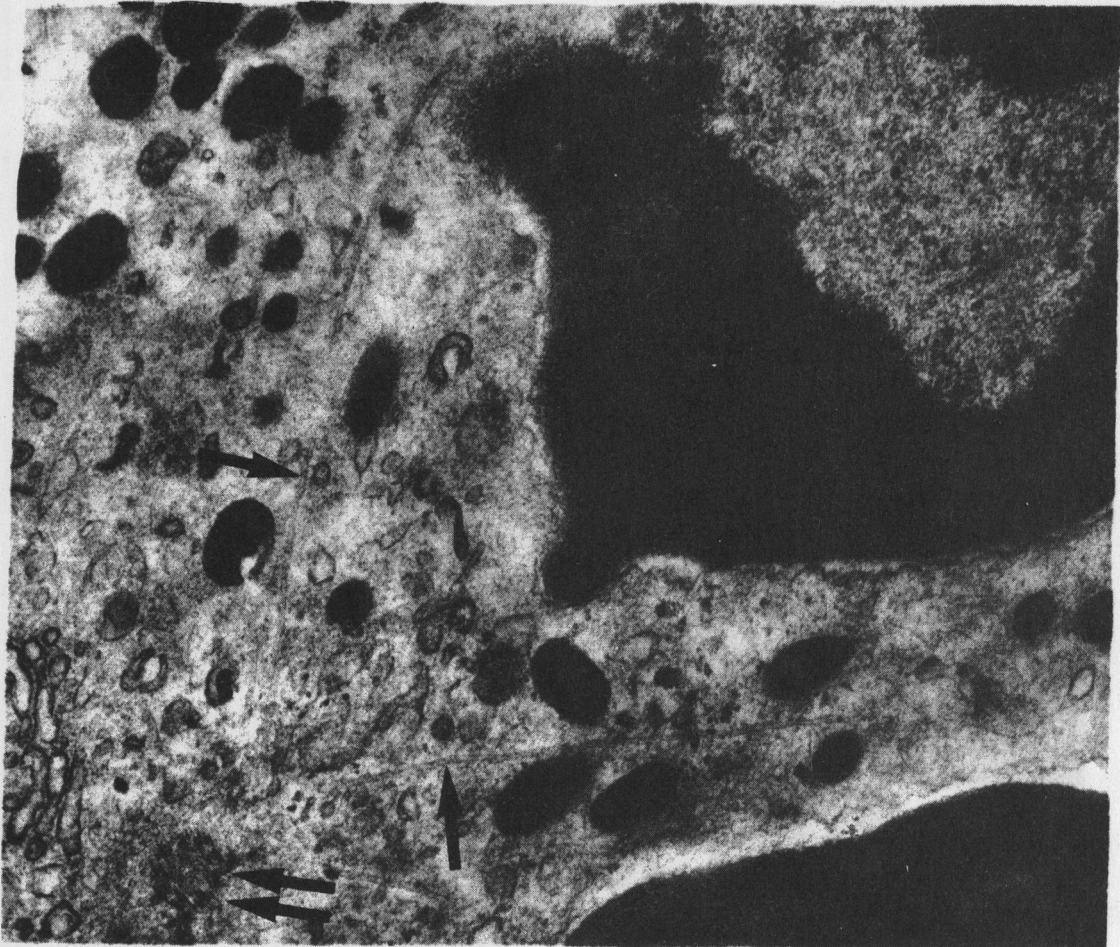


Fig. 5.- A partir del centriolo (doble flecha) surgen de forma radial varios microtúbulos (flechas). (Aumento original 30.000x)

Fig. 6.- Franja citoplásmica de un GN adherida a un hemstio (H) y rodeando a un fagosoma (F). Con las flechas se señalan algunos microfilamentos en la zona submembranosa. (Aumento original 70.000x)

na pesada, proceso que genera estructuras fibrilares en punta de flecha (84). Los filamentos de actina están íntimamente relacionados, desde el punto de vista funcional, con otras dos proteínas contráctiles, la miosina y la protefina ligadora de actina. Sin embargo, estas dos últimas proteínas ocupan además de la demostración ultraestructural mediante técnicas con-

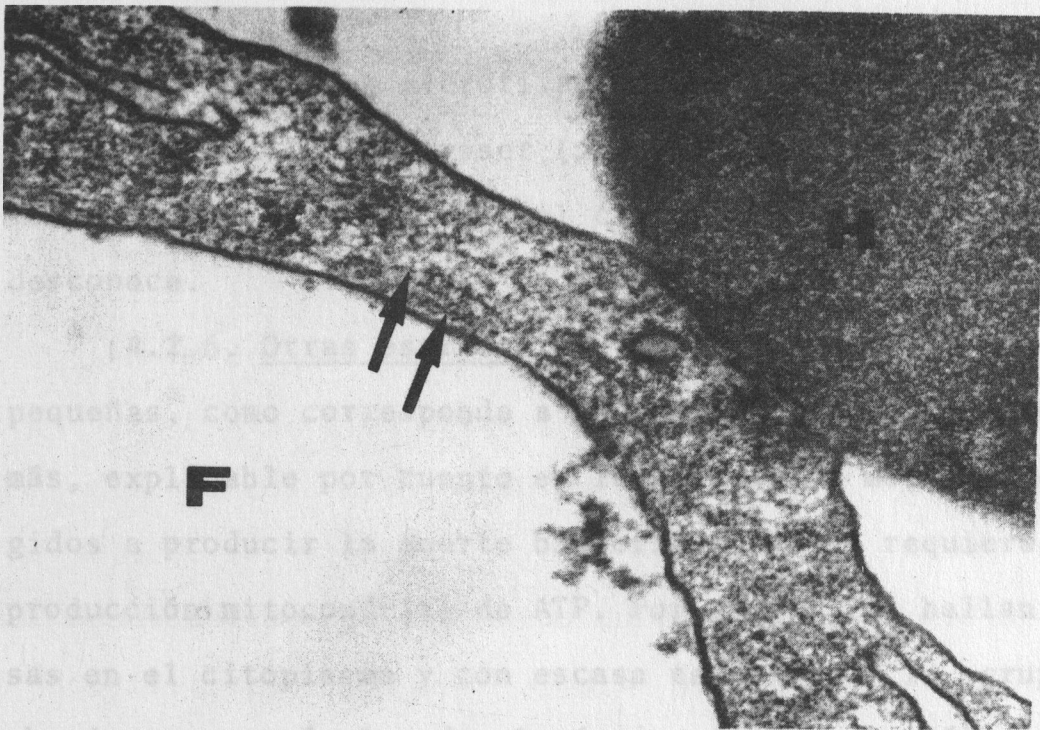


Fig. 6.- Franja citoplásmica de un GN adherida a un hematíe (H) y rodeando a un fagosoma (F). Con las flechas se señalan algunos microfilamentos en la zona submembranosa. (Aumento original 70.000x)

4.3. ASPECTOS ULTRABSTRUCTURALES DEL GN EN ESTADO FUNCIONAL

La misión del GN se desarrolla en una serie de pasos

na pesada, proceso que genera estructuras fibrilares en punta de flecha (84). Los filamentos de actina están íntimamente relacionados, desde el punto de vista funcional, con otras dos proteínas contráctiles, la miosina y la proteína ligadora de actina. Sin embargo, estas dos últimas proteínas escapan aún más de la demostración ultraestructural mediante técnicas convencionales.

Además de los microfilamentos de actina, cabe hallar en el GN otros de mayor grosor (unos 10 nm), distribuidos de modo más uniforme por todo el citoplasma (81). Su función se desconoce.

4.2.6. Otras estructuras.- Las mitocondrias son escasas y pequeñas, como corresponde a una célula terminal. Ello es, además, explicable por cuanto en los fenómenos metabólicos dirigidos a producir la muerte bacteriana, no se requiere de la producción mitocondrial de ATP. Por contra, se hallan dispersas en el citoplasma y con escasa tendencia a la agrupación, abundantes partículas de glucógeno, fuente energética esencial de los fenómenos de ingestión bacteriana (85). En algunos GN, particularmente tras incubación, cabe demostrar en el citoplasma gotas lipídicas (Fig. 7), probable depósito de triglicéridos requeridos en la síntesis de las membranas en la fase post-fagocítica (86). Por último, el GN no muestra RER ni ribosomas libres y el aparato de Golgi tiene aspecto inactivo.

4.3. ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DEL GN EN ESTADO FUNCIONAL

La misión del GN se desarrolla en una serie de pasos