

# 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](http://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](http://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](http://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

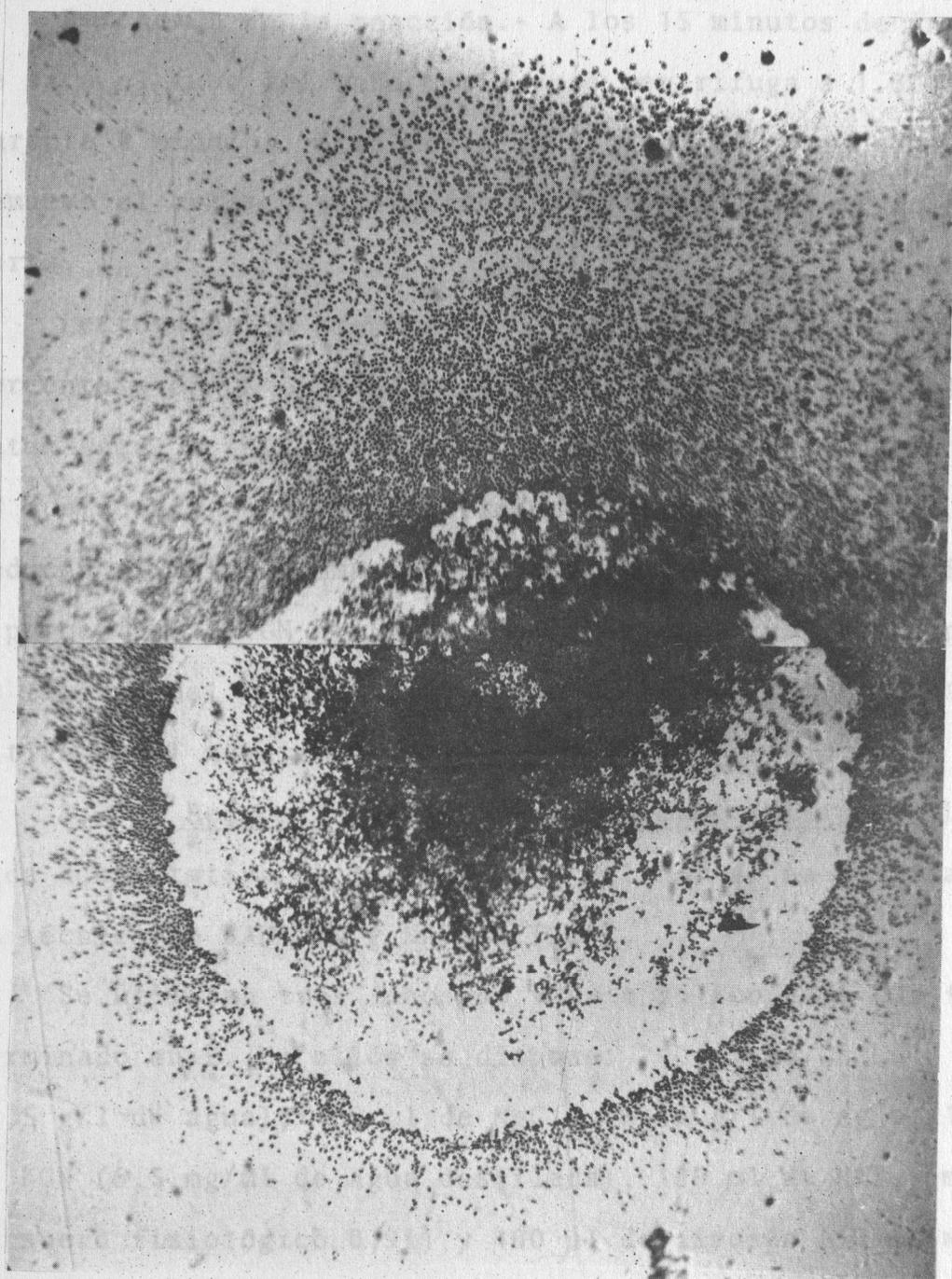


Fig. 25.- Aspecto al microscopio óptico de una quimiotaxis (100x).

Inicio de la reacción.- En el segundo (blanco 2) y tercer (problema) tubos se añaden 100 µl de la suspensión de EN y en el primero (blanco 1) 100 µl de tampón Krebs-Henseleit.

Detención de la reacción.- A los 15 minutos de incubación se saca el tubo del baño maría y se centrifuga a 1.000 r.p.m. durante 8 minutos. Finalmente se decanta el sobrenadante, se remueve el culot y se efectúa una extensión del mismo sobre un porta.

Lectura de la preparación.- Los resultados se expresan en porcentaje de GN que han ingerido un número de partículas de látex igual o superior a 10 (GN látex positivo); porcentaje de GN que además de haber ingerido dicho número de partículas reducen el NAT a formazán (GN látex positivo y NAT positivo), y porcentaje de GN que habiendo ingerido un número de partículas de látex igual o superior a 10 no reducen el NAT (GN látex positivo y NAT negativo).

5.2.5. Reducción del NAT. Método colorimétrico.- La medida cuantitativa de la reducción del NAT se ha realizado según la técnica de BAEHNER y NATHAN (203).

Se utilizan tres tubos de vidrio siliconados con fondo terminado en V. En ellos se dispone: 200  $\mu$ l de  $CL_2Ca$  (1,5 g/l de agua), 150  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (0,75 g/l de agua) 15  $\mu$ l de KCN (6,5 mg/ml de agua destilada), 100  $\mu$ l de NAT (6mg/3 ml de suero fisiológico 0,9%) y 100  $\mu$ l de zimosán (10 mg/ml de Krebs con 72 mg/10 ml) sólo en el primer y tercer tubos. Se preincuba a 37°C durante 5 minutos junto con la suspensión de GN, que se halla a una concentración de 10.000/ $\mu$ l aproximadamente.

Inicio de la reacción.- En el segundo (blanco 2) y tercer (problema) tubos se añaden 100  $\mu$ l de la suspensión de GN y en el primero (blanco 1) 100  $\mu$ l de tampón Krebs-Henseleit.

Se agita suavemente y se somete a agitación horizontal a 37°C durante 15 minutos.

Detención de la reacción.- A los 15 minutos se sacan los tubos del baño maría y se para la reacción con 10 ml de ClH 0,5 N en cada tubo. Se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 8 minutos, al cabo de los cuales se decanta el sobrenadante, se añaden 2 ml. de Piridina a los tres tubos y se ponen en ebullición 10 minutos al baño maría. Finalmente, se centrifuga de nuevo a 3.500 r.p.m. durante 8 minutos y se efectúa la lectura de los sobrenadantes con espectrofotómetro Hitachi modelo 100-60. La lectura se realiza frente a piridina a una longitud de onda de 515 nm, tras disponer los sobrenadantes en cuvas de cuarzo. El primer tubo (blanco 1) debe ser prácticamente cero, pues valora la reducción espontánea del NAT, el segundo tubo (blanco 2) expresa la reducción del NAT por los GN en reposo (sin fagocitar zimosán), y el tercero (problema) mide la reducción del NAT activada (GN fagocitando zimosán).

Expresión de los resultados.-

$$\text{Reducción del NAT} = \frac{\text{DO} \times 2,5 \times 10^6}{\text{n}^\circ \text{total de GN}} \quad \text{DO}/2,5 \times 10^6 \text{GN/min}$$

DO = diferencia de densidad óptica entre el blanco y el problema

$$\text{n}^\circ \text{total de GN} = \text{GN}/\mu\text{l} \times 10 \text{ ml}$$

5.2.6. Producción de radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Método de la reducción del ferricitocromo C.- Según la técnica de CURNUTTE y BABIOR (204), modificada por WEENING y cols. (260). Se numeran 6 tubos de plástico con las siglas 5, 10 y 15 minutos. En cada uno de ellos se depositan 50  $\mu\text{l}$  de zimosán A

(10 mg/ml en tampón Krebs-Henseleit con glucosa 72 mg/10 ml), 150  $\mu$ l de suero autólogo, 150  $\mu$ l de tampón Krebs-Henseleit y 150  $\mu$ l de citocromo C tipo IV (9,9 mg/ml en dicho tampón). Se preincuba el sistema y los GN durante 5' a 37°C en baño maría. Los GN se han aislado según el método anteriormente descrito y se ajustan a una concentración de 350 a 400 GN/ $\mu$ l en tampón Krebs-Henseleit.

Inicio de la reacción.- Añadir 1 ml de GN a los tres tubos marcados con 5, 10 y 15 minutos. Se incuban a 37°C con agitación horizontal. Los tres tubos que servirán como blancos también son sometidos al mismo proceso de incubación y agitación, pero sin haberles añadido los GN.

Detención de la reacción.- La reacción es detenida por un descenso brusco de la temperatura. A los tiempos correspondientes (5, 10 y 15 minutos), se extraen del baño maría ambos tubos, el blanco y el problema, y se dejan en un recipiente con hielo y agua cuya temperatura es alrededor de 4°C. Los 6 tubos se dejan en el recipiente con hielo por espacio de 15 minutos, al cabo de los cuales se añade 1 ml de GN de la suspensión original a cada uno de los blancos con el fin de que la lectura espectrofotométrica se realice en las mismas condiciones que los tubos problema.

El  $O_2^-$  producido reduce el ferricitocromo C presente en el medio reaccional y lo convierte en ferrocitocromo C, según la siguiente reacción:

$$O_2^- + \text{Ferricitocromo C (cit C Fe}^{+++}) \rightarrow O_2 + \text{Ferrocitocromo C (cit. C Fe}^{++})$$

en donde  $O_2^-$  cede un electrón al ferricitocromo C y por tanto lo reduce.

A continuación se centrifugan los 6 tubos a 3.500 r.p.m. durante 8 minutos con centrífuga refrigerada con la finalidad de precipitar los GN y las partículas de zimosán. Finalmente, se extraen los sobrenadantes, se depositan en cuvas de cuarzo, y se efectúa la lectura con espectrofotómetro Hitachi modelo 100-60 a una longitud de cada 350 nm y contra una cuva de agua destilada.

La primera lectura de 6 cuvas corresponde al citocromo C reducido formado. Una vez efectuada la misma se añade a cada una de ellas uno o dos granos de ferrocianuro potásico con el fin de reoxidar todo el citocromo C existente en cada cuva, que debe ser el mismo. Seguidamente se efectúa una nueva lectura en las mismas condiciones citadas anteriormente, cuyos resultados serán de valor inferior a los de la primera estimación espectrofotométrica, e iguales entre sí dado que se dispuso la misma cantidad de citocromo C en cada tubo (150 µl).

Cálculo de los resultados

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
Cit C reducido	$x_A(x-x')$	$y_B(y-x')$	$x_C(z-x')$
Cit C oxidado	$x'$	$x'$	$x'$
	B1 5 min	B1 10 min	B1 15 min
Cit C reducido	$r_D(r-x')$	$s_D(s-x')$	$t_D(t-x')$
Cit C oxidado	$x'$	$x'$	$x'$
	$\Delta 5' = A-D$	$\Delta 10' = B-D$	$\Delta 15' = C-D$

$\Delta$  = incremento de densidad óptica ( $\Delta DO$ )

Cálculo - coeficiente de extensión molar del citocromo C =  $21,1 \times 10^3 M/1$

$$\text{Producción de anión superóxido} = \frac{\Delta \text{DO} \times 1,5 \times 10^6}{21,1 \times 10^{-3} \times n^\circ \text{GN/nm}^3 \times 1000 \times t}$$

siendo  $t$  el tiempo de incubación en minutos

El resultado viene expresado en nMoles de citocromo C reducido/minuto/ $10^6$ GN.

5.2.7 Yodación.- Se ha realizado según la técnica de PINCUS y KLEBANOFF (261) modificada por HAKIM y cols. (228).

Se numeran una serie de nueve tubos de plástico de la siguiente forma: tres "estándar", dos "blancos", dos "diez minutos" y dos "veinte minutos". En todos ellos se depositan 100  $\mu$ l de una solución de  $^{125}\text{I}$  en INa (15 mg/l), cuya radiactividad se ha ajustado alrededor de 500.000 c/minuto por 100  $\mu$ l de la solución. A continuación, en todos los tubos excepto en los estándar se depositan 50  $\mu$ l de zimosán (10 mg/ml en tampón Krebs-Henseleit con 72 mg. de glucosa en 10 ml de tampón), 50  $\mu$ l de suero autólogo y 100  $\mu$ l de tampón fosfato Krebs-Henseleit. Este sistema se preincuba en un baño maría a 37°C durante 5 minutos para opsonizar el zimosán. Al mismo tiempo se preincubaban también los GN aislados según el método descrito anteriormente, ajustados a una concentración de 2.500/ $\mu$ l de tampón.

Inicio de la reacción.- Se añaden 200  $\mu$ l de GN a los tubos enumerados con las siglas 10 min y 20 min, y 200  $\mu$ l de tampón a los tubos marcados con la sigla "blanco". El sistema se agita de forma horizontal en baño maría a 37°C durante todo el tiempo que dura la reacción.

Detención de la reacción.- A los tiempos correspondientes se extraen los tubos del baño maría y se detiene la

reacción añadiendo 100 ul de tiosulfato sódico (246 mg en 10 ml de agua destilada) y 2 ml de ácido tricloroacético al 5% en agua destilada. A continuación se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 8 minutos en centrífuga refrigerada, y se realizan dos lavados con ácido tricloroacético al 5%. Finalmente, se decanta el sobrenadante, se añaden 2 ml. de agua destilada y se mide la radiactividad de los tubos en un contador de dos canales Auto-gamma Packard, modelo 5130.

Cálculo de los resultados

$$\text{Yodación} = \frac{R_p^b \times N \times 60 \times 10^7}{R_s \times t \times n^\circ \text{GN}} \text{ nMoles de yodo fijado/}10^7 \text{ GN/hora}$$

$R_p^b$  = diferencia entre la radiactividad emitida a los 10 minutos o 20 minutos y la radiactividad emitida por el blanco

N = número de nanomoles de yodo presentes en el medio reaccional

$\frac{60}{t}$  = correlación del tiempo para expresar el resultado por hora

$R_s$  = radiactividad del estándar

$n^\circ$  de GN = número total de GN presentes en el medio de incubación

5.2.8. Análisis estadístico.- En todos los grupos estudiados (GN del grupo control, GN de los donantes después de haber administrado la medicación, GN obtenidos por el método de centrifugación y GN obtenidos por el método de filtración), se ha realizado la media aritmética ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (s) de cada aspecto funcional.

Para comprobar que las muestras estudiadas no eran significativamente distintas a la normalidad, se ha aplicado el test de Kolmogorov-Smirnov.

La valoración estadística se ha efectuado mediante la aplicación del test de la t de Student, según la fórmula

$$t = x_1 - x_2 \sqrt{\frac{N_1 N_2 (N_1 + N_2 - 2)}{(N_1 + N_2) (Dza_1 = Dza_2)}}$$

Se han considerado significativos los valores de  $p < 0,05$ .

## VI. RESULTADOS

### 6.1. ESTUDIO MORFOLOGICO

#### 6.1.1. Examen óptico de los GN en cortes semifinos

(Tabla VIII).- El análisis óptico de los GN obtenidos por el procedimiento de centrifugación apenas demostró la existencia de células con alteraciones morfológicas (0,2%) sobre 3.000 GN examinados (Fig. 26). Por el contrario, en los GN obtenidos por el sistema de filtración, el porcentaje de células alteradas fue muy superior (14,1%) sobre el mismo número de GN valorados. La diferencia entre ambos fue significativa ( $p < 0,001$ ). Asimismo, la comparación de los resultados obtenidos en el estudio de los GN procesados por el método de filtración antes y después de ser sometidos a la compresión mecánica manual, demostró una evidente diferencia con significado estadístico, por cuanto en la primera situación el tanto por cien de células alteradas fue escaso (0,26%).

En los GN obtenidos directamente del donante y procesados a las tres horas de su extracción, no se apreciaron alteraciones morfológicas.

TABLA VIII

ESTUDIO OPTICO

	LEUCAFERESIS			CONTROLES		
	CENTRIFUGACION	FILTRACION	A	B	C	
N° de casos	6	6	6	6	10	
N° de GN valorados	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	
N° de GN con alteraciones	6 (0,2%)	424 (14,1%)	8 (0,26%)	4	1	
	$p < 0,001$		$p < 0,001$			

A = GN obtenidos directamente del interior del filtro sin efectuar compresión manual

B = GN aislados a partir de la sangre de los donantes, una vez administrada la premedicación y procesados para su estudio ultraestructural después de permanecer tres horas a temperatura ambiente

C = GN de donantes normales y procesados para su estudio ultraestructural inmediatamente después de su extracción

6.1.2. Examen ultraestructural (Tabla IX)

6.1.2.1. Alteraciones nucleares (Tabla X): Entre las características nucleares más evidentes que hemos observado, destaca la presencia de "pockets" o vesículos nucleares (Fig. 27) en un número de GN semejante para ambos procesos de separación y que también hemos hallado en los GN obtenidos directamente del donante. La existencia de alteraciones de estructura-

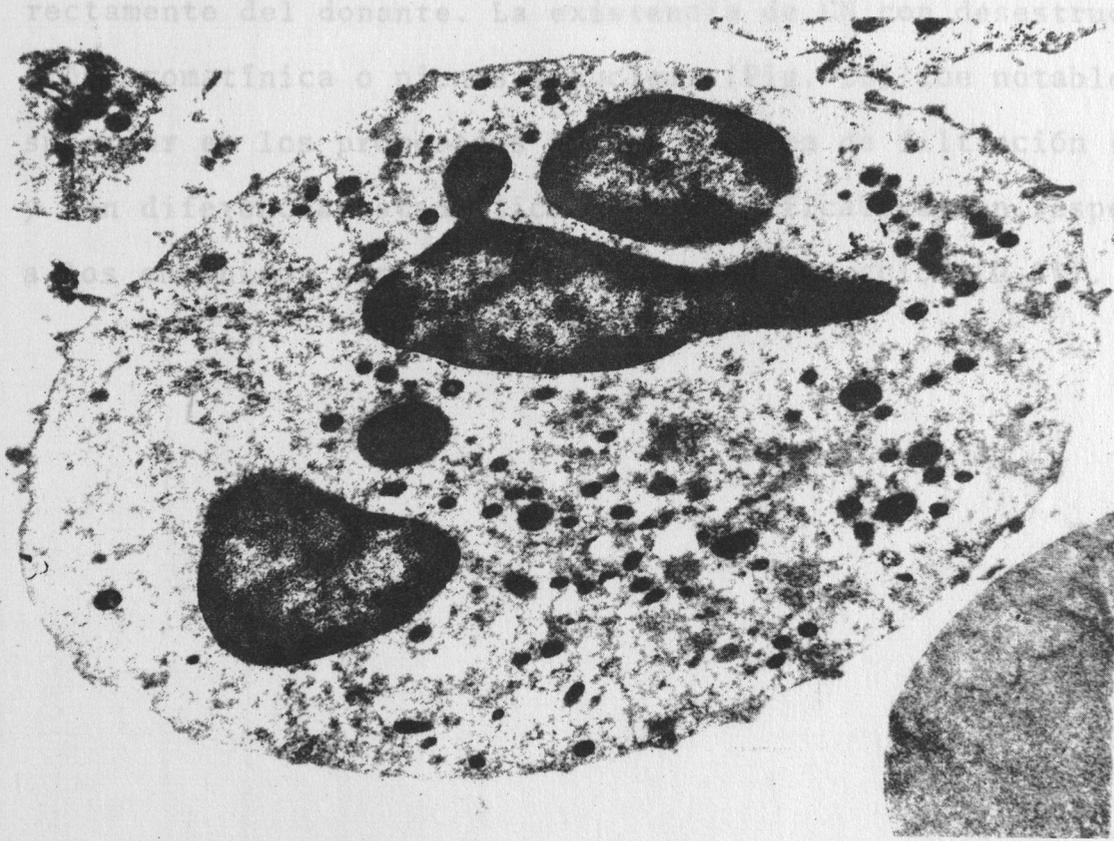


Fig. 26.- Granulocito neutrófilo procesado por centrifugación. Adviértase la ausencia de "microvilli" y el aspecto desgranulado del citoplasma (Aumento original 5000x)

6.1.2. Examen ultraestructural (Tabla IX)

6.1.2.1. Alteraciones nucleares (Tabla X): Entre las características nucleares más evidentes que hemos observado, destaca la presencia de "pockets" o bolsillos nucleares (Fig. 27) en un número de GN semejante para ambos procesos de separación y que también hemos hallado en los GN obtenidos directamente del donante. La existencia de GN con desestructuración cromatínica o picnosis nuclear (Fig. 28) fue notablemente superior en los procesados por el sistema de filtración (7%) y con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los obtenidos por el sistema de centrifugación (0,3%).

TABLA IX

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL

	LEUCAFERESIS			CONTROLES		
	CENTRIFUGACION	FILTRACION		A	B	C
N° de casos	6	6		6	6	10
N° de GN valorados	300	300		300	300	250
N° de GN sin alteraciones morfológicas	194 (64%)	27		146	226	226
				p < 0,001		
				p < 0,001		

TABLA X

ALTERACIONES NUCLEARES

ASPECTOS MORFOLOGICOS	NUMERO DE GRANULOCITOS					
	LEUCAFERESIS			CONTROLES		
	CENTRIFUGACION	FILTRACION	A	B	C	
"Pockets"	13	14	10	5	14	
"Clefts"	0	0	0	0	0	
ALTERACION CROMATINICA	1 (0,3%)	22 (7%)	1	1	0	
	p < 0,001					p < 0,001
NUCLEOS DESNUDOS	0	1	0	0	0	

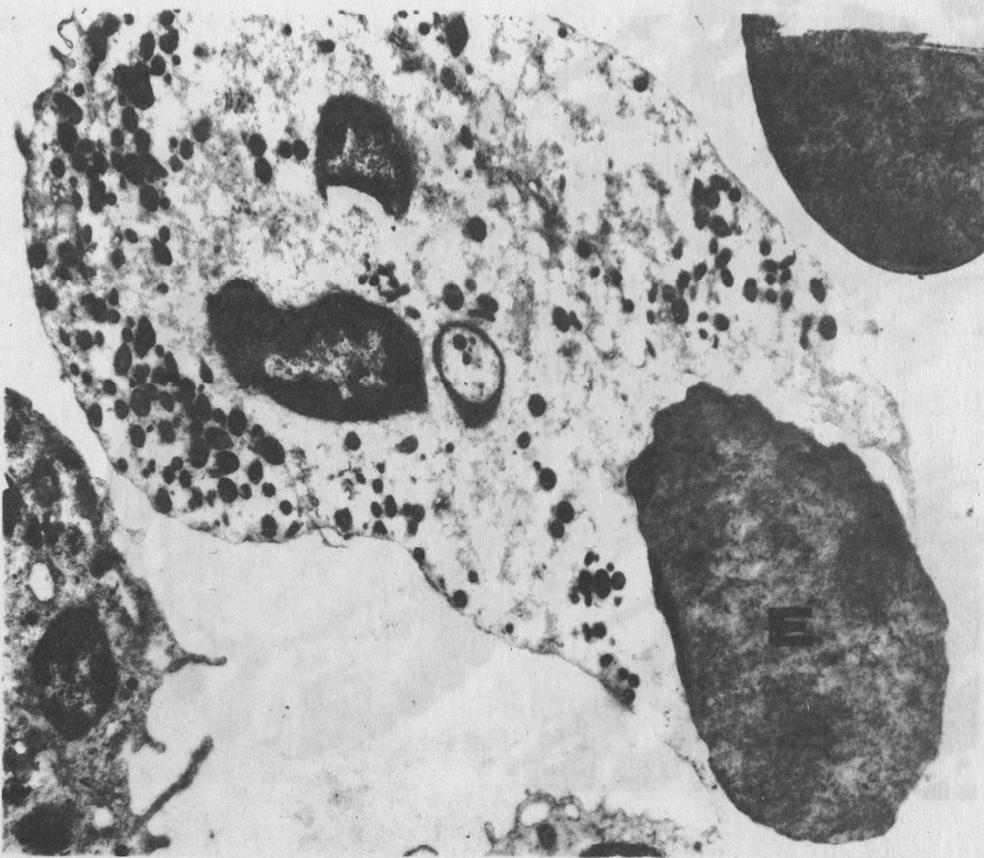


Fig. 27.- Granulocito neutrófilo parcialmente desgranulado, con presencia de un bolsillo nuclear y activación membranaria e intento de englobamiento de un eritrocito (E). (Aumento original 5000x)

6.1.2.2. Alteraciones citoplasmáticas (Tabla XI): Los GN obtenidos por el procedimiento de filtración presentaron con mayor frecuencia vacuolas degenerativas (Fig. 29), "microvilli" (Figs. 30, 31 y 32) y desgranulación (Figs. 27 y 33) que



los obtenidos por el sistema de centrifugación que en los últimos lo que preserva la distribución de los granulos. La mayoría solamente en los resultados referidos a la distribución. La descripción de las alteraciones descritas en un número menor por la evidencia de las células de pinocitosis y procesos a las tres horas de la observación se observó ningún tipo de alteración citoplasmática, salvo la presencia de un pequeño porcentaje de células con signos de desgranulación. Apenas objetivamos anomalías en los GN obtenidos a partir de donantes sanos y procesados sin demora.

La cuantificación global de los GN sin alteraciones morfológicas.  
Fig. 28.- Granulocito neutrófilo profundamente alterado en el que destaca especialmente la pérdida de su estructura cromatínica. En la parte inferior de la figura se observa un fragmento celular cuyo núcleo está perfectamente conservado. (Aumento original 8.000x)

6.1.2.2. Alteraciones citoplasmáticas (Tabla XI): Los GN obtenidos por el procedimiento de filtración presentaron con mayor frecuencia vacuolas degenerativas (Fig. 29), "microvilli" (Figs. 30, 31 y 32) y desgranulación (Figs. 27 y 33) que los obtenidos por el sistema de centrifugación, mientras que en los últimos lo que predominó fue una anomalía en la distribución de las granulaciones (Fig. 34). Sin embargo, existía solamente una diferencia significativa al comparar los resultados referentes a la presencia de "microvilli" y desgranulación.

En los GN desprendidos del filtro previamente a la compresión mecánica, no se observó ninguna de las alteraciones descritas, salvo la presencia de "microvilli", aunque en un menor porcentaje de células y en menor intensidad. En ellos se evidenció también la presencia de múltiples microvesículas de pinocitosis (Fig. 35) en la periferia citoplasmática.

En los GN obtenidos directamente de los donantes y procesados a las tres horas de la extracción de sangre, no se observó ningún tipo de alteración citoplasmática, salvo la presencia de un pequeño porcentaje de células con signos de desgranulación. Apenas objetivamos anomalías en los GN obtenidos a partir de donantes sanos y procesados sin demora.

La cuantificación global de los GN sin alteraciones morfológicas puso de manifiesto que su número era mayor en los

GN procesados por el sistema de centrifugación (64%) que en los procesados por el sistema de filtración (33,3%), siendo la diferencia estadísticamente significativa (Tabla IX).

Como observaciones adicionales deben ser destacadas la presencia de mayores alteraciones estructurales en los granulocitos eosinófilos obtenidos por ambos procedimientos de separación celular y cuya cuantificación sobrepasa los límites del presente estudio. Asimismo, se observaron algunos GN cuyo aspecto morfológico sugería un estado de activación con tendencia a ingerir determinadas células (hematíes) (Fig. 27). También se apreció en algunos GN procesados por el sistema de filtración la formación de auténticas mallas intercitoplasmáticas constituidas por contactos entre los numerosos "microvilli" presentes en estas células.

TABLA XI

ALTERACIONES CITOPLASMATICAS

TIPOS DE ALTERACION	NUMERO DE GRANULOCITOS				
	LEUCAFERESIS	CONTROLES			
	CENTRIFUGACION	FILTRACION	A	B	C
VACUOLAS DEGENERATIVAS	16	30	3	3	3
"MICROVILLI"	37	228	89	6	0
DESGRANULACION	52	117	10	8	5
DISTRIBUCION IRREGULAR DE LAS GRANULACIONES	20	13	10	8	0
FIGURAS MIELINICAS	0	0	0	0	0
MITOCONDRIAS DEGENERATIVAS	0	0	0	0	0

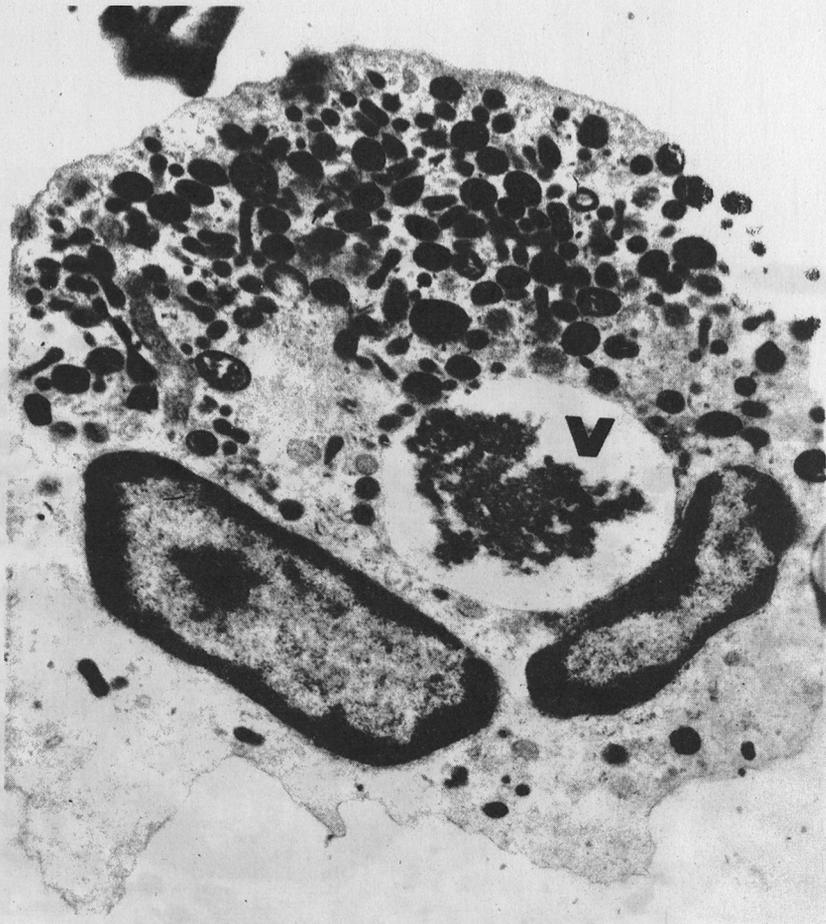


Fig. 29.- Aspecto parcial de un granulocito neutrófilo en cuya región centrosómica se advierte una gran vacuola (V) con un contenido floconoso en su interior. Varios gránulos se concentran en la periferia de la vacuola. (Aumento original 10.000x)

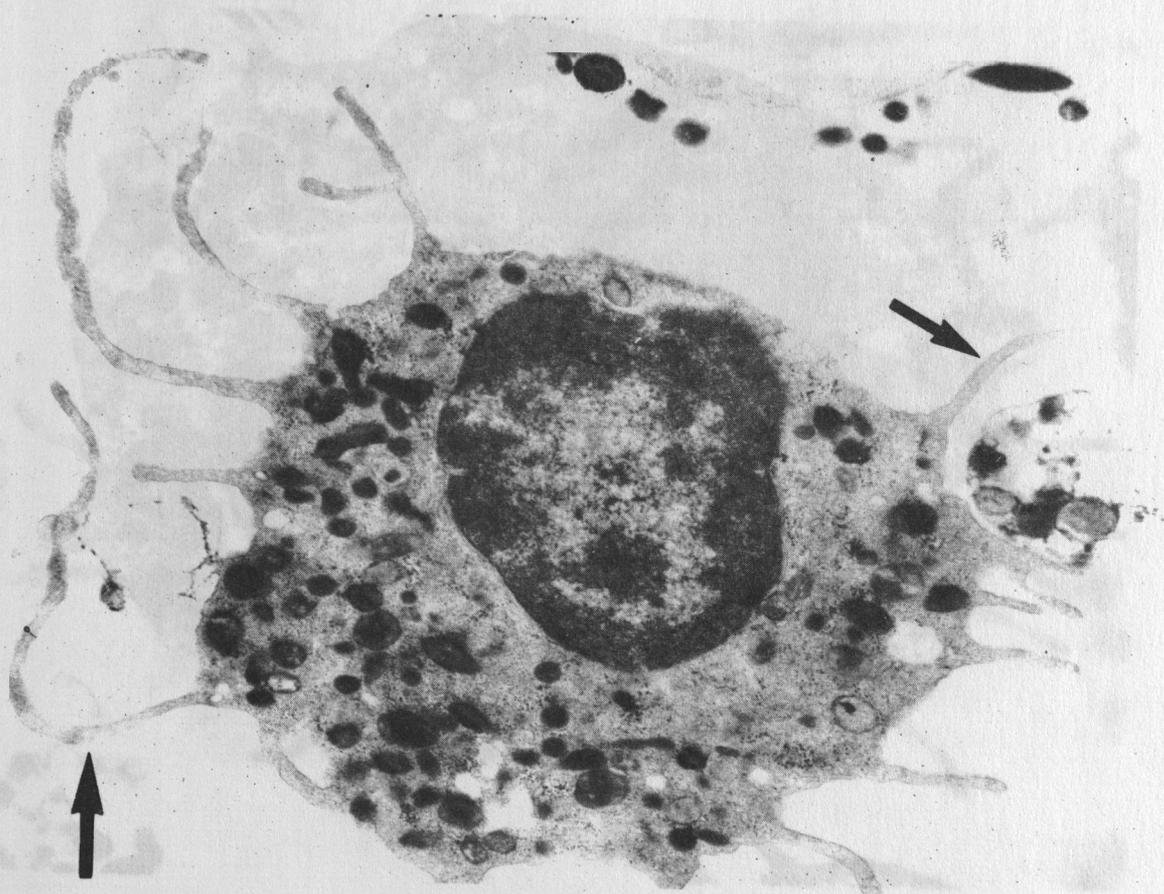


Fig. 30.- Granulocito neutrófilo obtenido por filtración. Obsérvese diversas prolongaciones citoplasmáticas ("microvilli"), algunas ramificadas y de gran extensión (flechas). (Aumento original 10.000x)

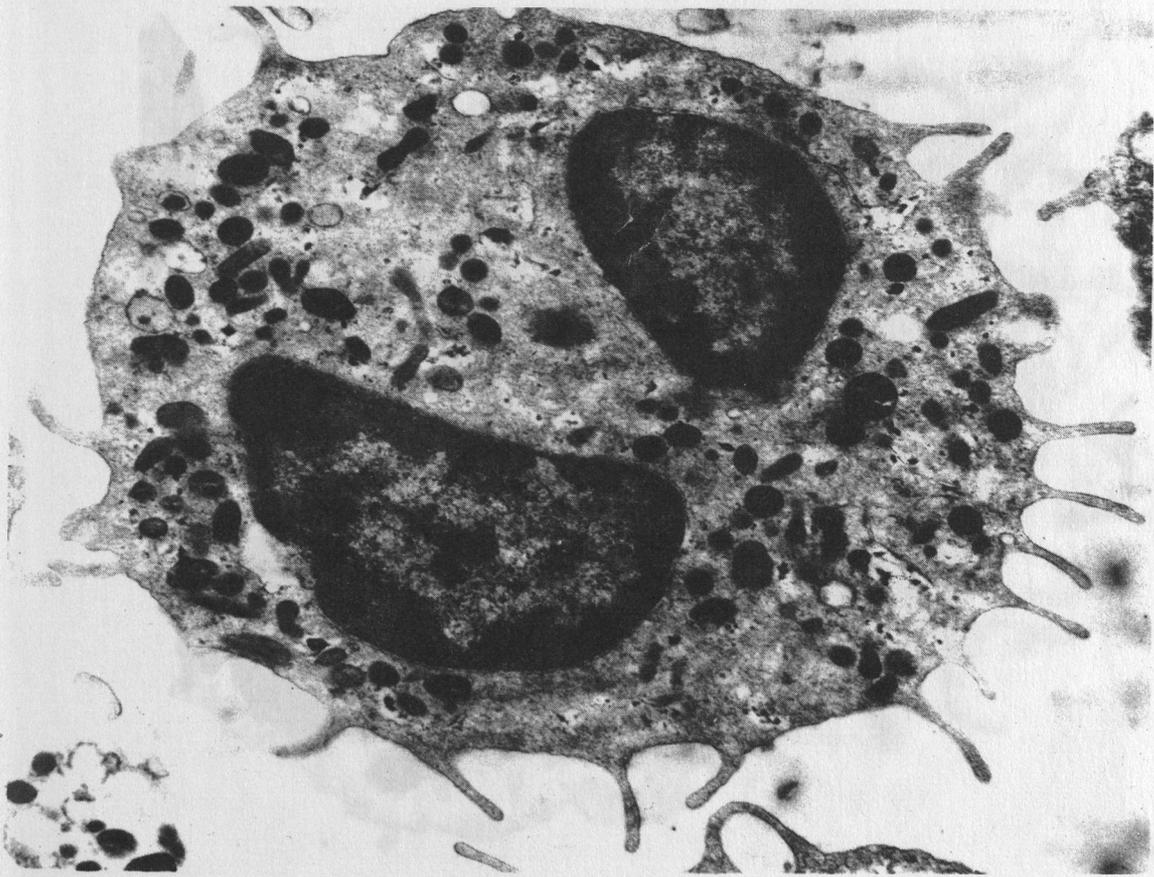


Fig. 31.- Granulocito neutrófilo obtenido por filtración  
con "microvilli" en distinto grado de formación. (Aumento  
original 10.000x)