

CCB-128

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



METODO DE AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMOR- FONUCLEARES EN EL ESTUDIO DE RECEPTORES BETA ADRENERGICOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A

MARIANA NUÑEZ ZUÑIGA

MEXICO, D. F.

1984

A mi siempre bien querida
Familia Núñez Zúñiga.

A mis compañeros, maestros y amigos,
cuya dedicación y cariño al trabajo he
disfrutado y compartido.

El presente trabajo formó parte de un proyecto de investigación del departamento de endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología, bajo la dirección del Dr. Carlos Posadas Romero y del Q.F.I. José Luis Boyer Martínez, y se llevó a término bajo la dirección y supervisión del Dr. Carlos García Moreira, jefe de la división de informática del mencionado Instituto Nacional de Cardiología, y profesor titular de Biofísica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, y del M.en C. Luis Ignacio Mireles Rangel, investigador y profesor de Bioquímica y de Biología Celular de dicha Facultad de Ciencias de la U.N.A.M.

A TODOS ELLOS MI SINCERO RECONOCIMIENTO

I N D I C E

Agradecimientos

Introducción

Antecedentes y Generalidades

1

1. Propiedades de los leucocitos.
2. Importancia del leucocito como herramienta experimental.
 - 2.1 Aplicación en diversas áreas de investigación
 - 2.2 Importancia de los adrenoceptores beta de los leucocitos en la investigación clínica.
 - 2.3 Necesidad de separar a los leucocitos polimorfonucleares de las demás poblaciones celulares sanguíneas.
3. Métodos y Aislamiento.
 - 3.1 Métodos posibles
 - 3.2 Principios de la sedimentación.
 - 3.3 Principios de la centrifugación.
 - principios teóricos y bases de operación.
 - técnicas de centrifugación.
 - uso de rotores
 - gradientes y materiales de gradiente
 - criterios para la planificación de separaciones por centrifugación: gráfica s-p
 - 3.4 Método de Boyum

Materiales y Métodos Generales

49

Diseños experimentales:

55

- Etapa I: Método de Boyum
- Etapa II: Método de separación de interfases.
- Etapa III: Metodo del cloruro de amonio 0.83%

Resultados:

65

Tablas de los resultados obtenidos con cada uno de los métodos.

Tabla comparativa de los resultados obtenidos en el Método de Boyum y con el Método del Cloruro de Amonio 0.83%.

Aspectos Morfológicos

Discusión y Conclusiones.

80

Bibliografía

92

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a las personas que de una u otra manera colaboraron conmigo en la realización de este trabajo:

A mis maestros y directores el Dr. Carlos García Moreira y el M. en C. Luís Ignacio Mireles Rangel, su asesoría, apoyo y estímulo en la elaboración de esta tesis.

A mis profesores y sinodales el Dr. Jesús Manuel León Cázares, al M. en C. Roberto Gamboa Aldeco, y a la Q. F.B. Helgy Jung Cook, su interés, revisión crítica, consejos y comentarios para mejorar este trabajo.

Al personal de los Departamentos de Endocrinología e Informática, del Instituto Nacional de Cardiología, particularmente al Dr. Carlos Posadas Romero y al Q.F.I. José Luís Boyer Martínez, por las atenciones y facilidades brindadas durante la realización del trabajo.

A la Srta. Q.F.B. Lidia Margarita Alanís García, Química adscrita al Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cardiología, su amabilidad y cuidado en los conteos celulares diferenciales de los frotis.

Al Biólogo Alejandro Martínez y al Biólogo Pablo Robles Majaras del laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme emplear el Fotomicroscopio.

Finalmente, a mis padres, a Rafael y a Darío, y a mis amigos, por sus constantes consejos y demás muestras de compañía, cariño y solidaridad.

INTRODUCCION

Un gran número de experimentos e investigaciones se han realizado tanto *in vivo* como *in vitro* en las células y tejidos de muchas especies; sin embargo, los estudios en el hombre han sido obstaculizados por la dificultad de obtener tejidos y células para realizar ensayos. Los adipocitos y las células sanguíneas, forman parte de tejidos humanos cuya adquisición es relativamente fácil y con los cuales es factible realizar estudios directos en células humanas.

Junto con los eritrocitos y las plaquetas, los leucocitos constituyen los elementos sanguíneos figurados. Los leucocitos pueden ser considerados como un solo órgano sumamente disperso, constituido por tres tipos celulares principales, los granulocitos o polimorfonucleares, los linfocitos y los fagocitos mononucleares, cuya función común es la defensa del organismo contra agentes invasores, y que están relacionados por sus orígenes embrionarios. Debido a sus características especiales y a la facilidad con que se puede trabajar con ellos, los leucocitos han sido utilizados como una herramienta experimental en una gran variedad de áreas de investigación; diversos aspectos han sido sometidos a estudio, brindando una extensa información en diferentes y muy variadas especialidades.

Entre las múltiples características y propiedades de los leucocitos, está la presencia de adrenoceptores beta, que ha

sido extensamente demostrada tanto en linfocitos como en polimorfonucleares. El hallazgo de este tipo de receptores adrenérgicos en los leucocitos, abrió un vasto campo para investigación.

Dentro del área de investigación clínica, la presencia de adrenoceptores beta en leucocitos es de especial importancia. Se han descrito una gran variedad de situaciones clínicas como alteraciones patológicas, condiciones fisiológicas e influencias farmacológicas, en las cuales los adrenoceptores pueden estar modificados. Se acepta que el estado de los adrenoceptores beta de los leucocitos, puede ser considerado como un índice del estado o modificaciones de los adrenoceptores beta de las células de tejidos y órganos internos difícilmente accesibles para realizar estudios de rutina. El estudio del estado de los receptores y los fenómenos de enlace con sus ligandos, se realiza mediante ensayos de unión con ligandos radiactivos.

Existen antecedentes de trabajos en los que se ha utilizado en los ensayos la unión de un agonista radiactivo, como una herramienta para estudiar a los receptores de la insulina así como a los receptores de otras hormonas. Varias investigaciones han brindado mucha información sobre los mecanismos de la acción hormonal, y también sobre la relación entre los desórdenes clínicos y las alteraciones en los receptores hormonales.

En numerosas publicaciones se plantea que los estudios de unión con adrenoceptores beta en leucocitos, pueden ser empleados como modelos para entender los mecanismos y alteraciones

patológicas reguladas por adrenoceptores beta, sin embargo para poder realizar estos trabajos, es necesario disponer de un método de aislamiento que separe eficientemente a la población celular deseada de las demás células sanguíneas, causando el mínimo posible de alteraciones y perturbaciones celulares.

La importancia de este método de aislamiento salta a la vista, puesto que puede contribuir en numerosas y múltiples áreas de investigación clínica y básica, siempre y cuando sea suficientemente confiable para poder ser utilizado como una herramienta, para diferenciar situaciones normales de alteraciones patológicas, teniendo la seguridad de que no se trata de un artefacto.

La revisión de los trabajos publicados recientemente con temas referentes a leucocitos, tanto en humanos como en otras especies animales, indica que los métodos empleados para separar a las distintas poblaciones celulares sanguíneas son, en general, aplicaciones o modificaciones del método clásico de separación de leucocitos a partir de sangre total, publicado por Arné Böyum en 1968.

Con la técnica reportada por Böyum, se logra separar a los distintos tipos de leucocitos, con base en sus distintas velocidades de sedimentación, así como por los diferentes gradientes de densidad derivados del uso de macromoléculas como el Ficoll-paque y el Dextrán T 500.

En la mayoría de los trabajos publicados sobre adrenoceptores beta de leucocitos polimorfonucleares se utiliza el método de Böyum como método de aislamiento. Sin embargo, pese a que con este método se obtienen células con un alto porcentaje de viabilidad y poblaciones celulares homogéneas, este método no satisface plenamente los requerimientos para realizar estudios de unión de agonistas radioactivos, ya que para cada ensayo se necesitan paquetes celulares de 9 mg, constituidos por poblaciones celulares sumamente homogéneas en óptimas condiciones de viabilidad; y los paquetes celulares de leucocitos polimorfonucleares obtenidos mediante el método de Böyum tienen una elevada contaminación de eritrocitos. Aunado a esto, para obtener paquetes celulares de 9 mg de costo aproximado por ensayo es de \$31,400.00 (MN) pues el Ficol-paque y el Dextrán T 500 son reactivos muy costosos y de difícil adquisición en nuestro país.

El presente trabajo, surgió a partir de un proyecto de investigación del Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología de la Ciudad de México, en el cual se planteó un estudio global acerca de la hipertensión arterial esencial, uno de cuyos objetivos era la determinación de la densidad y constante de afinidad de los adrenoceptores beta de los leucocitos polimorfonucleares, en personas con hipertensión arterial esencial.

Para poder realizar dicho proyecto, hubo de desarrollar un método alternativo al de Böyum para aislar a los leucocitos polimorfonucleares, que fuese significativamente más económico que dicho método, que permitiese obtener un rendimiento

célular por mililitro de sangre equiparable o mayor, que mantuviera elevada la viabilidad celular y que garantizará un alto grado de pureza en la población celular aislada.

En consecuencia, en el presente trabajo se hace una descripción detallada de las bases de operación de las técnicas gravimétricas y de centrifugación y de cómo se implementó el método alternativo de aislamiento de leucocitos polimorfonucleares, por medio de centrifugaciones y el uso de la solución de cloruro de amonio.

Esta implementación del método del cloruro de amonio 0.83% se desarrolló en tres etapas. En la primera etapa se realizaron varios ensayos con la técnica descrita por Böyum. En la segunda etapa se logró prescindir del Ficoll-paque para separar a los distintos tipos de leucocitos, más no del Dextrán T 500. Finalmente en la tercera etapa se implementó un método de aislamiento de leucocitos polimorfonucleares por medio de centrifugaciones diferenciales y el uso de la solución de cloruro de amonio 0.83%.

La morfología, la viabilidad, el rendimiento y el número celular son puntos centrales para evaluar un método de aislamiento.

Para evaluar los parámetros mencionados, en cada una de las etapas se realizaron ensayos con los siguientes métodos:

- 1.- Método de exclusión del colorante azul de tripano.

- 2.- Conteos celulares diferenciales.
- 3.- Determinación de proteínas mediante el método de Lowry.
- 4.- Análisis de morfología mediante el estudio de foto micrograffas.

Se presentan tablas comparativas de los resultados obtenidos con el método del Cloruro de Amonio 0.83% y los obtenidos con el Método tradicional de Böyum, en cuanto a rendimiento celular, pureza de la preparación final, viabilidad celular, costo por ensayos y facilidad de obtención.

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

1.- Propiedades de los leucocitos:

Los leucocitos o glóbulos blancos, son corpúsculos incoloros cuyo número por milímetro cúbico es decir, por microlitro de sangre, en el adulto normal es de 5,000 a 10,000 (Junqueira y Carneiro, 1973; Cline, 1975).

Los leucocitos son células efectoras del sistema inmunitivo, que se clasifican según su estructura, afinidad respecto de los diversos colorantes y forma del núcleo, en dos categorías principales: los agranulocitos o mononucleares y los granulocitos o polimorfonucleares.

mononucleares:

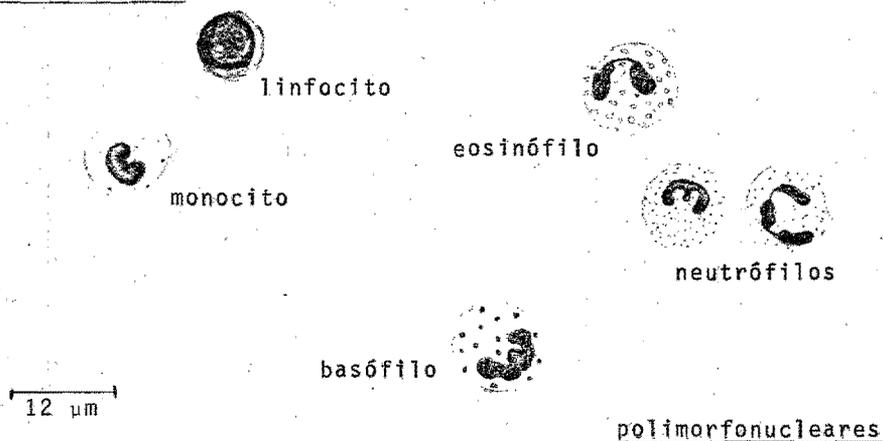


Fig. 1 Los cinco tipos de leucocitos de la sangre humana

La primera categoría está constituida por los agranulocitos, cuyo núcleo tiene una forma regular y el citoplasma

no presenta granulaciones específicas, pudiendo, sin embargo, exhibir gránulos inespecíficos, presentes también en otros tipos celulares. Hay dos tipos de agranulocitos, los linfocitos y los monocitos.

La segunda categoría de leucocitos la constituyen los granulocitos polimorfonucleares, estas células tienen núcleos lobulados y muestran abundantes gránulos específicos en el citoplasma. De acuerdo con la afinidad tintórea de los gránulos citoplasmáticos, se distinguen tres tipos de leucocitos polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. El gránulo citoplasmático es específico cuando tiene características propias como dimensiones, forma, afinidad tintórea, ultraestructura, y está presente de modo constante en un determinado tipo de leucocitos y sus precursores.

Los porcentajes de los diferentes tipos de leucocitos en la sangre humana normal son los siguientes:

	TIPO DE LEUCOCITO	PORCENTAJE DEL NUMERO TOTAL DE LEUCOCITOS.
Células - polimorfonucleares:	Neutrófilos	55 a 65 %
	Eosinófilos	2 a 3 %
	Basófilos	cerca de 0.5 %
Células-Mononucleares:	Linfocitos	25 a 35 %
	Monocitos	3 a 10 %

(Junqueira, y Carneiro, 1973)

La densidad de los distintos tipos de leucocitos no se ha determinado exactamente, pues el tamaño celular y por lo tanto la densidad, no son cantidades bien definidas, pues dependen de la composición del medio en que están suspendidas las células (Böyum, 1968). Sin embargo, se sabe que la densidad de los leucocitos es menor que la de los eritrocitos, se estima que probablemente sea de 1.08 gm/ml, mientras que la de los eritrocitos, pese a su pequeño tamaño (su diámetro es de $7.2\mu\text{m}$ y el espesor es de $2.1\mu\text{m}$) (Junqueira y Carneiro, 1973), es de 1,093 gm/ml, aunque hay eritrocitos que presentan desviaciones considerables con respecto a este valor promedio (Böyum, 1968)

Leucocitos granulocitos o polimorfonucleares:

Neutrofilos.

Su diámetro promedio es cerca de 12 micras. Su citoplasma contiene numerosas granulaciones de 0.3 a 0.8 micras identificadas como lisosomas, que contienen numerosas enzimas hidrolíticas.

Los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos de mamíferos, presentan grandes diferencias en cuanto a tamaño y propiedades tintóreas; por lo cual a estos granulocitos se les llama también heterófilos por su afinidad por mezclas complejas.

El núcleo de las células maduras está formado por 2 a 5 lóbulos con más frecuencia 3, unidos entre sí por puentes de cromatina.

Los neutrófilos constituyen uno de los sistemas de defensa más importantes del cuerpo, contra la invasión de microorganismos patógenos, su función principal es la localización y destrucción del material en forma de partículas. También intervienen en procesos inflamatorios pues cuando liberan sus numerosas enzimas hidrolíticas al medio extracelular, incrementan la inflamación.

Eosinófilos.

Su diámetro es de cerca de 9 μm , el núcleo es bilobulado, presentan granulaciones ovoides que se tiñen con el colorante rojo eosina; es decir, son granulaciones acidófilas. Estas granulaciones son mayores que las de los neutrófilos pues miden de 0.5 a 1.5 μm , en su eje mayor.

Los eosinófilos también son fagocitos; pero son sumamente selectivos. Un aumento en el número absoluto de eosinófilos están directamente relacionado con reacciones alérgicas del organismo. Los eosinófilos fagocitan complejos de antígenos con sus anticuerpos, limitando las reacciones inflamatorias que podrían iniciar estos complejos inmunológicos.

Basófilos.

Miden cerca de 12 μm de diámetro y tienen un núcleo voluminoso con forma retorcida e irregular, generalmente con aspecto de "S". Su citoplasma contiene gránulos mayores que los de los otros granulocitos. Estos gránulos de los basófilos contienen heparina e histamina.

La histamina es uno de los principales mediadores químicos de los cambios vasculares producidos en respuestas inflamatorias no-específicas; cuando es liberada por rompimiento de los basófilos provoca vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar a las proteínas.

Estos cambios vasculares aseguran un suministro adecuado de leucocitos fagocíticos y de proteínas plasmáticas, cuya importancia es vital para la respuesta inmunológica del área inflamada.

Los leucocitos utilizan el sistema circulatorio tan sólo como vía para llegar a un área lesionada o invadida. Una vez allí, abandonan los vasos sanguíneos para entrar al tejido lesionado y ahí realizar sus funciones. De hecho para las formas maduras de leucocitos polimorfonucleares, el tiempo promedio de tránsito en la sangre es de 6 horas (Cline, 1975).

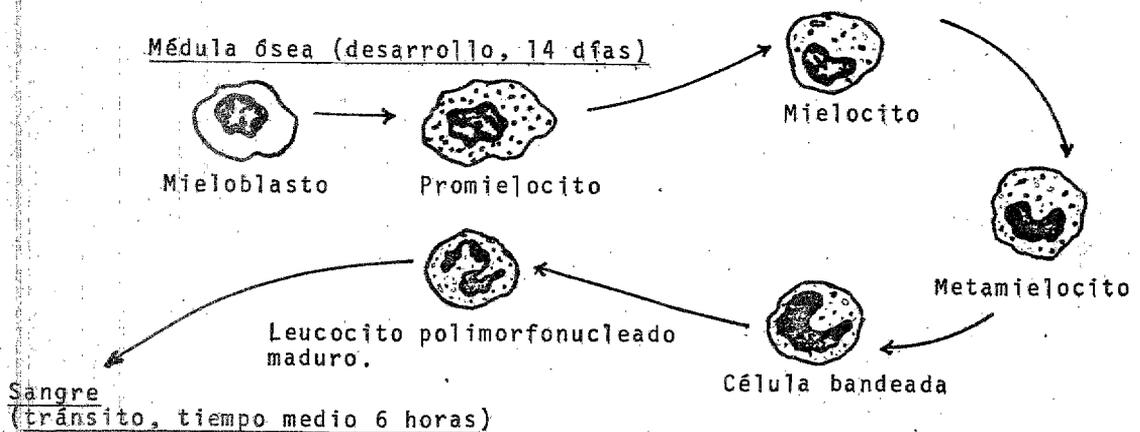


Fig. 2. Ciclo de vida y los estados de maduración de los leucocitos polimorfonucleares (Cline, 1975).

Así en la sangre de una persona normal solamente se encuentra neutrófilos maduros y formas bandeadas, con porcentajes bajos de eosinófilos y escasos o raros basófilos. De estos leucocitos polimorfonucleares, algunos están circulando libremente, mientras que otros se encuentran adheridos a las paredes de los vasos sanguíneos. Normalmente una vez que el neutrófilo entra en tejido sólido, ya no regresa a la circulación (Cline, 1975).

Leucocitos agranulocitos o mononucleares.

Linfocitos.

Son células esféricas con diámetro variable entre 6 y 8 μ .

El núcleo de los linfocitos es esférico, la cromatina se dispone en grumos gruesos de manera que el núcleo aparece obscuro en las preparaciones usuales. El citoplasma es escaso, y se observa como un anillo delgado alrededor del núcleo.

El tiempo de vida promedio de los linfocitos es variable ya que se trata de una población celular heterogénea, algunos duran tan solo unos días, mientras que otros tienen larga vida.

Después de ser liberados de la médula ósea, un conjunto de linfocitos viajan al timo en donde se diferencian y se convierten en células T. Los linfocitos restantes están destinados a ser células B. Existen pues dos subpoblaciones de linfocitos diferenciados en su morfología, fisiología y tiempo de vida. (Vander, Sherman y Luciano, 1978).

En personas sanas el 20% de los linfocitos son células B, y las demás son células T.

Los linfocitos B confieren inmunidad específica, pues secretan anticuerpos contra la mayoría de las bacterias. Su superficie celular presenta proyecciones de forma dactilar.

Los linfocitos T están asociados con proceso de inmunidad de mediación celular y confieren inmunidad contra hongos, virus y ciertas bacterias que logran vivir dentro de las células; también median en la destrucción de las células cancerosas y en el rechazo de los trasplantes de tejidos sólidos. Su superficie no tiene tantas proyecciones como la de las células B. (Vander, Sherman y Luciano, 1978) Los linfocitos T tienen una vida realmente larga.

Mediante transfusiones de sangre que contenía linfocitos con marcas cromosómicas identificables, se pudo determinar que estos linfocitos logran sobrevivir durante varios años.

Monocitos.

Estos agranulocitos tienen diámetro variable entre 9 y 10 μ m su núcleo es ovoide en forma de riñón o en herradura; la cromatina se presenta distribuida más laxamente que la de los linfocitos, y debido a esta menor densidad, el núcleo de los monocitos es más claro que el de los linfocitos, lo cual es una característica distintiva entre ambos utilizada para su identificación.

A) entrar a una área que ha sido invadida o vulnerada, los monocitos se transforman en macrófagos que son fagocitos sumamente activos.

Los monocitos fagocitan principalmente virus, hongos y protozoarios.

2. Importancia del leucocito como herramienta experimental.

2.1 Aplicaciones en diversas áreas de investigación.

La enorme cantidad de trabajos y publicaciones referentes a leucocitos señala la importancia de estas células.

Los leucocitos constituyen un tejido de adquisición relativamente fácil, que permite realizar estudios directos en tejidos humanos. Debido a sus características especiales y a la comodidad con la que se puede trabajar con ellos, los leucocitos conforman una herramienta experimental ideal para realizar una gran variedad de estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* en células humanas, en numerosas áreas de investigación.

2.2 Importancia de los adrenoceptores beta de los leucocitos en la investigación clínica.

a) Generalidades:

El receptor beta adrenérgico es un importante modulador bioquímico de las funciones celulares. Así, la interacción de las catecolaminas con estos receptores desencadena toda una secuencia de eventos (Serrano, 1981).

Las catecolaminas como muchas hormonas no intervienen directamente en los procesos metabólicos celulares; sino que actúan a través de un 'segundo mensajero', la hormona se une a un receptor que activa a una enzima unida a la membrana, la adenil-ciclase, que cataliza la formación intracelular del AMPc a partir del ATP.

Los efectos fisiológicos que antes eran formalmente atribuidos a la propia hormona, ahora se sabe que son provocados por este intermediario. Un gran número de hormonas de diferentes glándulas endócrinas operan a través del segundo mensajero en muchos tipos de células blanco.

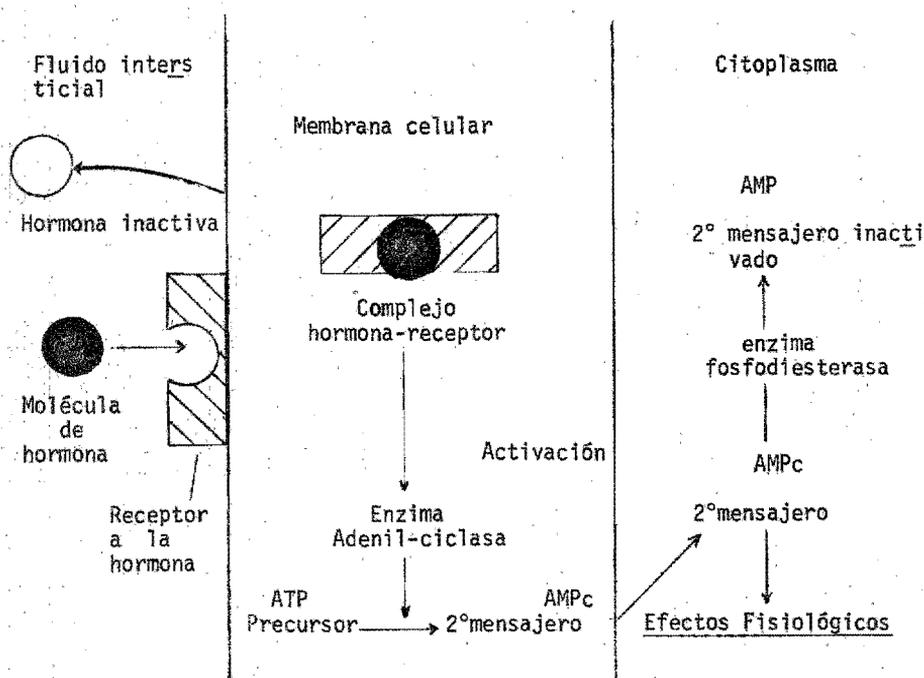


Fig. 3 Mecanismo de la acción hormonal, mediante el 2º mensajero (Weller y Wiley, 1979).

Función de los adrenoceptores beta de los leucocitos:

Pese a que las funciones fisiológicas de los adrenoceptores beta en leucocitos, no han sido satisfactoriamente delucidadas; se ha informado de varios efectos fisiológicos relacionados con el incremento del AMP cíclico intracelular, debido a la estimulación beta adrenérgica de los leucocitos.

Para los linfocitos, Cline (1975) propone que provoca:

- La modulación de la actividad citolítica.
- La producción de anticuerpos
- La estimulación de la mitogénesis.

En los leucocitos polimorfonucleares la adenil-ciclase es mucho más activa que en los linfocitos (Cline, 1975), y su activación provoca alteración en la actividad microbicida de los neutrófilos pues inhibe la liberación de las enzimas hidrolíticas (Motulsky e Insel, 1982).

b) Descubrimiento de la presencia de adrenoceptores beta en leucocitos:

La presencia de adrenoceptores beta en leucocitos humanos, fue indirectamente demostrada por los estudios de activación de la adenil-ciclase, usando agonistas y antagonistas beta-adrenérgicos, realizados por Hadden y colaboradores en 1970 y posteriormente por Bourne y Melmon en 1971. Los leucocitos, al ser estimulados con agonistas y antagonistas adrenérgicos, presentan activación de la adenil-ciclase con la consecuente generación de AMP cíclico.

En 1976, Williams, Snyderman y Lefkowitz, publicaron un trabajo sobre la identificación y caracterización de los adrenoceptores beta en linfocitos humanos. Dos años más tarde, en 1978 Galant y sus colaboradores publicaron un trabajo sobre la caracterización de los adrenoceptores beta en leucocitos polimorfonucleares. (Galant *et al*, 1978/a). Así, estos dos grupos de investigadores determinaron que los ensayos de unión a ligandos adrenérgicos en leucocitos polimorfonucleares, así como en linfocitos, satisfacen completamente los criterios esperados para la interacción con un adrenoceptor beta, en términos de cinética, saturación, estereoselectividad y afinidad relativas a agonistas y antagonistas adrenérgicos.

Para los eritrocitos, Lefkowitz y su grupo informaron no haber detectado unión ni respuesta beta adrenérgica a las catecolaminas (Williams, Snyderman y Lefkowitz, 1976).

A estos primeros trabajos les sucedieron una serie de investigaciones dirigidas a la caracterización y experimentación sobre diferentes aspectos de estos receptores adrenérgicos en leucocitos humanos (Tohmeh y Cryer, 1980; Galant *et al*, 1980; Chatelain *et al*, 1980; Galant *et al*, 1980/a; Watanabe *et al*, 1981; Fraser *et al*, 1981; Galant y Allred, 1981; Lee *et al*, 1981; Davies y Lefkowitz, 1980; Hallengren *et al*, 1982; Aarons y Molinoff, 1982; entre otros autores).

c) Importancia e interés en caracterizar a los adrenoceptores beta de los leucocitos.

El interés demostrado en caracterizar a los adrenoceptores beta de los leucocitos, responde a que a partir de estas investigaciones se puede obtener mucha información de los mecanismos de la acción hormonal, y de la relación entre los efectos fisiológicos observados en una condición clínica dada y las modificaciones de la densidad y afinidad de los receptores adrenérgicos, ya que en diversos síndromes clínicos existen alteraciones en las respuestas reguladas por adrenoceptores beta (Serrano, 1981).

i) Antecedentes:

Dentro del área de la patología, se ha demostrado que muchos desórdenes clínicos pueden ser provocados no sólo por secreciones anormales de determinadas hormonas, sino también por alteraciones en su acción, como resultado de modificaciones cualitativas o cuantitativas de los receptores hormonales, así como por alteraciones en los mecanismos bioquímicos intracelulares, mediadores de dicha acción hormonal. Estas alteraciones se han interpretado como cambios en la afinidad del receptor por la hormona, cambios en el número de receptores, o debidas a la formación espontánea de un anticuerpo al receptor hormonal (Felig *et al*, 1981).

Los trabajos realizados para estudiar receptores hormonales utilizando las técnicas de ensayo de unión a ligandos radiactivos, han tenido mucho éxito y han brindado mucha infor

mación respecto a los mecanismos de la acción hormonal, así también como a las modificaciones de los receptores en diferentes situaciones clínicas. Tal es el caso de las investigaciones sobre diabetes y alteraciones de los receptores insulínicos (Galant *et al.*, 1978/b; Motulsky e Insel, 1982).

ii) Uso práctico de la identificación y caracterización de los adrenoceptores beta de los leucocitos:

Los ensayos de unión con agentes adrenérgicos, han permitido estudios directos en los receptores de muchas especies. Sin embargo, la investigación de los adrenoceptores beta en el hombre, había sido impedida por la dificultad de obtener fácilmente, tejidos blanco para los ensayos.

El descubrimiento y caracterización de los adrenoceptores en leucocitos, abrieron muchas posibilidades de investigación ya que constituyen una herramienta experimental para estudiar a los receptores adrenérgicos directamente en tejido humano.

De manera análoga al problema de diabetes, la sensibilidad a las catecolaminas está alterada en varios estados fisiológicos, situaciones patológicas y también durante la ingestión de fármacos (Williams, Snyderman y Lefkowitz, 1976).

La facilidad para caracterizar y cuantificar a los adrenoceptores en células humanas, ha permitido el planteamiento de investigaciones para determinar si estos receptores están involucrados en las situaciones clínicas mencionadas.

Las catecolaminas endógenas, un buen número de agonistas hormonales, así como ciertas drogas adrenérgicas como el propranolol y la terbutalina, ejercen una regulación de las respuestas mediadas por adrenoreceptores (Galant *et al*, 1978/b; Aarons y Molinof, 1982). Los estudios con diferentes modelos experimentales, incluyendo animales intactos así como tejidos y células aisladas, indican que un posible mecanismo que explica este estado es una reducción del número de receptores a estas aminas en las membranas celulares (Galant, *et al*, 1978/b). Estos datos son acordes con los resultados de estudios previos que muestran una reducción en la acumulación de AMP cíclico en sujetos que han recibido un tratamiento adrenérgico (Galant *et al*, 1978/b; Williams *et al*, 1979).

Existe la hipótesis de que los cambios en los adrenoreceptores beta de los leucocitos son similares a las alteraciones beta de los adrenoreceptores beta producidas en las células de tejidos y órganos internos de difícil acceso para ensayos de rutina (Aarons y Molinoff, 1982). Se ha supuesto que el estado de estos adrenoreceptores beta de los leucocitos puede ser considerado como un índice de la situación de los adrenoreceptores beta de otras células del organismo (Motulsky e Insel, 1982).

La posibilidad de que los adrenoreceptores beta de los leucocitos pudieran ser considerados como un índice del estado de estos receptores en otras células del organismo parece correcto pues se sabe que el tratamiento con drogas adrenérgicas que a

menudo regulan la respuesta de las células de los órganos blanco y por tanto sus efectos fisiológicos, también producen modificaciones en los adrenoceptores beta de los leucocitos (Galant *et al*, 1978/b; Aarons y Molinof, 1982; Hallengren *et al*, 1982).

Sin embargo, no todos los investigadores han observado disminución en las respuestas a las catecolaminas después de terapias adrenérgicas (Larsson y Svedmyr, 1976). Por tanto es necesario realizar investigaciones posteriores para determinar tanto el mecanismo como las implicaciones clínicas de la reducción de los adrenoceptores beta en leucocitos polimorfonucleares, provocada por las drogas adrenérgicas, así como si existe una modulación similar del número de receptores en otros tejidos "blanco".

Una de estas situaciones patológicas en las cuales es muy probable que las modificaciones de los adrenoceptores beta de los leucocitos tengan implicaciones importantes, es la hipertensión arterial esencial.

En los casos de hipertensión arterial bien establecida, la anomalía principal es el aumento de la resistencia periférica debida a una reducción anormal del diámetro arteriolar. En la mayoría de los casos de hipertensión arterial, se ignora la causa del estrechamiento arteriolar, por lo cual se le ha denominado hipertensión arterial esencial, es decir hipertensión de causa desconocida (Vander, Sherman y Luciano, 1978).

Pese a que se han propuesto muchas hipótesis en relación con la etiología de la hipertensión arterial esencial, aún no se ha demostrado ninguna. Sin embargo, entre las hipótesis más aceptadas se encuentra la que considera las variaciones de los niveles de catecolaminas plasmáticas y las alteraciones de los adrenoreceptores (Galant *et al*, 1978/b; Davies *et al*, 1981; Bredde, *et al*, 1982; Fraser *et al*, 1981; Motulsky e Insel, 1982; Williams, Snyderman y Lefkowitz, 1976).

De manera análoga al caso de la regulación de los receptores insulínicos por la insulina plasmática, un exceso de catecolaminas plasmáticas puede provocar síntomas de hipertensión. Este fenómeno ha sido demostrado en los casos de pacientes que presentan tumores en las glándulas suprarrenales o tumores derivados de las células cromafines, conocidos como feocromocitomas, que secretan cantidades excesivas de catecolaminas (Felig *et al*, 1981; Goldstein, 1981; Kjeldsen *et al*, 1981), por lo cual podría pensarse que la hipertensión arterial esencial es provocada por un excedente de catecolaminas plasmáticas.

No obstante, aunque la hipertensión podría estar relacionada con un estado hiperadrenérgico, se ha encontrado que está asociada solamente con un ligero aumento en las concentraciones de catecolamina plasmáticas (Motulsky e Insel, 1982; Bredde *et al*, 1982; Landman, 1982; Corradi *et al*, 1981).

Por consiguiente se piensa que la causa se debe a posibles cambios en los receptores adrenérgicos.

Así, en el caso de la hipertensión arterial esencial, se ha propuesto que existe un defecto genético a nivel de los adrenoceptores beta de los diferentes tejidos u órganos-blancos involucrados, lo que predispondría respuestas vasopresoras y cardiovasculares más intensas y persistentes frente a los estímulos ambientales normales.

Se ha propuesto que en situaciones patológicas como la hipertensión arterial esencial, las alteraciones entre hormonas y receptor también se manifiestan en los adrenoceptores beta de los leucocitos. (Williams, Snyderman y Lefkowitz, 1976; Galant *et al*, 1978/b; Motulsky e Insel, 1982)

Los cambios en el número de receptores parecen corresponder a los cambios en la sensibilidad del sistema cardiovascular por la estimulación beta adrenérgica, indican que la regulación negativa observada de los leucocitos, puede reflejar cambios similares en otros tejidos (Tohmeh y Cryer, 1980).

Las investigaciones realizadas utilizando las técnicas de radioligandos, han brindado mucha información acerca de la etiología de varias enfermedades asociadas con alteraciones de los adrenoceptores, asimismo han ayudado a entender los mecanismos de acción de diversos fármacos empleados en sus tratamientos.

2.3 Necesidad de separar a los leucocitos polimorfonucleares de las demás poblaciones celulares sanguíneas:

Los estudios que se han realizado en leucocitos de personas sanas para determinar tanto el número como la afinidad de sus receptores adrenérgicos muestran grandes variaciones, como se puede apreciar en la tabla 1:

TABLA 1: COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR DIFERENTES INVESTIGADORES ACERCA DE LA DENSIDAD Y CONSTANTE DE AFINIDAD POR EL LIGANDO (-)-3H-DIHIIDROALPRENOLOL (3H-DHA) DE LOS ADRENOCEPTORES BETA DE LEUCOCITOS DE SUJETOS NORMALES Y SANOS.

POLIMORFONUCLEARES Autores	Año	DENSIDAD DE RECEPTORES (número de sitios de unión por célula)	CONSTANTE DE DISOCIACION KD (nM)
Galant <i>et al</i> (a)	1978	863 [±] 67	no publicaron resultados
Ruoho <i>et al</i>	1980	1200 a 1600	2
Davies y Lefkowitz	1980	476 [±] 23	0.57 [±] 0.0.3
Galant <i>et al</i> (a)	1980	1000	1 a 5
Galant <i>et al</i> (b)	1980	900	0.6
Dulis y Wilson	1980	1800	0.4 a 0.5
<u>MONUNUCLEARES</u>			
Williams <i>et al</i>	1976	2000	10
Tohmeh y Cruyer	1980	810	0.1 a 0.2
Davies y Lefkowitz	1980	493 [±] 23	0.58 [±] 0.03
Watanabe <i>et al</i>	1981	14800 [±] 5700	15
Ginsberg <i>et al</i>	1981	967 [±] 134	1.1 [±] 0.2
Bredde <i>et al</i>	1982	950	no publicaron resultados
Motulsky e Insel	1982	100 a 2000	no publicaron resultados

Esta tabla pone de manifiesto que aún no se ha logrado ca racterizar adecuadamente a la población de adrenoceptores beta de los leucocitos de personas normales sanas. Constituye un serio problema el no contar con un grupo control cuyos parámetros y variables se conozcan con precisión pues se carece de un marco de referencia confiable.

Es muy importante realizar estudios preliminares para solucionar este problema, antes de plantear investigaciones y proyectos que involucren más variables, pues de otro modo la validez de los resultados y conclusiones a las que se llegue será dudosa.

Varios autores han señalado que estos resultados tan inconstantes pueden ser reflejo de los distintos métodos empleados por los investigadores para separar las células (Niaudet *et al*, 1976; Sheppard *et al*, 1977; Mendelsohn y Nordberg, 1979; Motulsky e Insel, 1982).

Motulsky e Insel (1982) sugieren que estas variaciones pueden deberse a que las poblaciones celulares utilizadas para estudiar a los adrenoceptores a menudo representan una mezcla de diferentes poblaciones de leucocitos, es decir, que se deben a que se carece de un método de aislamiento que brinde poblaciones celulares realmente homogéneas.

Como ya ha sido mencionado el estudio de los adrenoceptores beta se realiza mediante ensayos de unión a ligandos radioactivos. Para cada ensayo se requiere 9 mg de proteína constituida por poblaciones celulares homogéneas y en condiciones óptimas de viabilidad (Williams, Snyderman y Lefkowitz, 1976; Galant y Allred, 1980/a).

Es necesario, por lo tanto, prestar detenida atención al método de aislamiento de leucocitos, para obtener los paquetes celulares requeridos y poder realizar posteriormente los estudios mencionados.

Con base en dichos objetivos, en esta primera fase del proyecto se decidió trabajar con los leucocitos polimorfonucleares pues la población de linfocitos es muy heterogénea (ver sección 1). Además, estas células son las más numerosas ya que la población de leucocitos polimorfonucleares en la sangre de una persona normal representa del 64.7% de la población total de leucocitos, de los cuales el 95.8% son neutrófilos, el 3.5% son eosinófilos y el 0.7% son basófilos, así que prácticamente el 96% de los leucocitos polimorfonucleares son neutrófilos. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que el tiempo de vida media de estos leucocitos es de 6 horas (Cline, 1975).

3. METODOS DE AISLAMIENTO

3.1 Métodos posibles

El objetivo fundamental del método es separar la mayor cantidad posible de leucocitos PMN con un elevado grado de pureza y viabilidad.

Los leucocitos en la sangre pueden ser considerados como una mezcla de partículas en suspensión.

Existe toda una serie de técnicas analíticas y preparativas adecuados para separar partículas en suspensión, sin embargo la

técnica a emplear debe brindar la más alta resolución posible con pequeñas cantidades de material de partida en este caso sangre, y así proporcionar el mayor porcentaje de recuperación y viabilidad celular posible a partir de una mínima cantidad de ésta. Asimismo, este método debe ser rápido y tener un mínimo de etapas de purificación para evitar pérdidas de material y deterioro celular.

El límite de resolución de cada uno de los métodos para purificar partículas en suspensión depende de sus bases de operación. Las técnicas cromatográficas y electroforéticas son métodos muy sensibles y de alta resolución, pero generalmente tienen una capacidad limitada por lo que no son utilizables para separar grandes cantidades de material (Birnie y Rickwood, 1978).

Los límites de resolución obtenidos mediante sedimentación y centrifugación dependen principalmente de las diferencias entre los tamaños, densidades y coeficientes friccionales de los distintos componentes de la mezcla que se va a separar. Las técnicas de centrifugación tienen una capacidad mucho mayor que cualquier técnica electroforética o cromatográfica, por lo cual la centrifugación es el método preferido para separar mezclas de partículas y micromoléculas (Birnie y Rickwood, 1978).

Los distintos tipos de células sanguíneas pueden ser separados mediante sedimentación y centrifugación con base en sus diferencias en tamaño y densidad; en estas condiciones, las velocidades de sedimentación relativas entre los distintos grupos celulares son muy importantes, como se verá más adelante.

3.2 PRINCIPIOS DE LA SEDIMENTACION:

Bases de operación.

La sedimentación es el proceso por el cual una especie corpuscular en suspensión denominada fase dispersa se separa del seno de una fase dispersante, por acción de la gravedad. Este proceso está determinado por la existencia de una diferencia en densidad entre los corpúsculos y el dispersante.

Dada esta diferencia en densidad las partículas presentes en suspensión, descenderán a una velocidad proporcional a las fuerzas antagónicas actuantes sobre ellas (Mireles, en prensa). Estas fuerzas son la gravedad, dirigida verticalmente "hacia abajo", y las fuerzas de roce y flotación, dirigidas "hacia arriba".

1. Peso fuerza de gravedad.

La acción del campo gravitatorio actúa sobre las partículas, ya que la fuerza de gravedad, produce una aceleración en su caída:

$$F_g = mg$$

2. Fuerza de fricción.

El medio a través del cual sedimenta la partícula, le presenta una resistencia de manera que la partícula se aproxima a una velocidad de caída límite, como se puede apreciar en la siguiente gráfica:

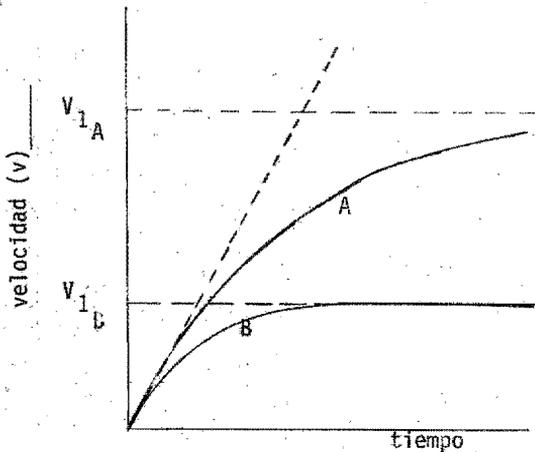


Fig. 4. Relación entre el tiempo y la velocidad para objetos que sedimentan a través de un medio que ofrece resistencia. Un objeto pesado (A) se aproxima a una velocidad límite en un período más largo que un objeto ligero (B).

A esta resistencia de roce se le llama fuerza de roce o fuerza de fricción.

Cuando la fuerza causante del movimiento, en este caso la fuerza de gravedad y la fuerza de resistencia adquieren el mismo valor, la aceleración de caída de la partícula será cero, y ahora continuará avanzando con una velocidad constante en tanto la fuerza se mantenga activa, es decir, avanzará a su velocidad terminal, y es la velocidad a la cual se llevan a cabo la mayoría de los procesos de sedimentación.

La resistencia que le ofrece un fluido a una partícula que se desplaza a través de él, depende de un conjunto de variables; el tamaño y forma de la partícula, la viscosidad y la densidad del fluido, la velocidad y aceleración de la partícula, y la cercanía de las partículas entre sí y con respecto a las paredes del recipiente.

En el caso de partículas esféricas de radio " r ", que sean rígidas y que no se hidraten, la fuerza de fricción que expe

rimente el moverse a través de un fluido viscoso, toma un valor definido por la ecuación:

$$F_f = 6\pi\eta r \left(\frac{dx}{dt}\right) \quad \text{donde: } \eta = \text{viscosidad absoluta del fluido.}$$

r = radio de una partícula esférica.

(2.) $\frac{dx}{dt}$ = velocidad instantánea de la partícula

que es la ley de Stokes y es aplicable cuando las partículas son grandes en comparación con las moléculas de líquido de modo que ocurran muchas colisiones moleculares con ellas, cuando la concentración de dichas partículas no es tan grande como para afectar la viscosidad del medio, y la velocidad es suficientemente baja como para que no haya turbulencia.

Para partículas no esféricas, dado que la resistencia de roce varía de acuerdo con la forma y el volumen de la partícula, para calcular la fuerza de fricción en estos casos, es necesario hacer ciertas consideraciones. Como gran cantidad de "partículas" de interés en biología y medicina, como células, organelos e inclusiones subcelulares o moléculas de gran tamaño, tienen formas comparables con elipsoides de revolución, es necesario agregar a la ecuación anterior, la relación $\frac{f}{f_0}$, que es el cociente de la resistencia de roce que encuentra un elipsoide el valor de f , con respecto al que encuentra una esfera, el valor f_0 , de igual volumen.

De manera que la ecuación de Stokes para partículas de formas elipsoidales, define a la fuerza de fricción como:

$$F_f = 6 \pi \eta r \frac{dx}{dt} \frac{f}{f_0} \quad (3.)$$

3. Fuerza de flotación: Empuje hidráulico de Arquímedes:

La fuerza de flotación es una fuerza vertical dirigida hacia arriba, cuya magnitud es igual al peso de fluido desplazado cuando el cuerpo se sumerge o flota en el fluido.

Se define como:

$$F_B = V_p (\rho_m) g \quad \text{donde: } V_p = \text{volumen del cuerpo o partícula}$$

(4.)

ρ_m = densidad del fluido desplazado

g = fuerza de gravedad.

Esta fuerza es independiente de la forma de la partícula. Como el volumen de la partícula es igual al cociente de su masa entre su densidad ρ_p , la ecuación anterior puede escribirse como:

$$F_B = \frac{m}{\rho_p} (\rho_m) g \quad (5.)$$

Cálculo de la velocidad de sedimentación.

La fuerza resultante, es la suma de estas fuerzas consideradas:

$$F_{\Sigma} = F_f + F_B - F_g \quad (6.)$$

$$F_{\Sigma} = 6 \pi \eta r \frac{dx}{dy} \frac{f}{f_0} + \frac{m}{\rho_p} (\rho_m) g - mg \quad (7.)$$

Cuando la fuerza causante del movimiento descendente de la partícula (Peso), y las fuerzas que se oponen a su sedimentación se igualan, la partícula alcanzará una velocidad constante que es la velocidad terminal a la cual se llevará a cabo la sedimentación.

$$F_g = F_f + F_B \quad (8.)$$

Así entonces:

$$mg = 6 \pi nr \frac{dx}{dt} \frac{f}{f_0} + \frac{m}{\rho_p} \rho_M g \quad (9.)$$

Sustituyendo la masa de la esfera por su volumen multiplicado por su densidad, se obtiene:

$$\frac{4}{3} \pi r^3 \rho_p g = 6 \pi nr \frac{dx}{dt} \frac{f}{f_0} + \frac{4}{3} \pi r^3 \rho_M g \quad (10.)$$

$$\frac{4}{3} \pi r^3 \rho_p g - \frac{4}{3} \pi r^3 \rho_M g = 6 \pi nr \frac{dx}{dt} \frac{f}{f_0} \quad (11.)$$

$$\frac{4}{3} \pi r^3 g (\rho_p - \rho_M) = 6 \pi nr \frac{dx}{dt} \frac{f}{f_0} \quad (12.)$$

Despejando la velocidad:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\frac{4}{3} \pi r^3 g (\rho_p - \rho_M)}{6 \pi nr \frac{f}{f_0}} \quad (13.)$$

Que se reduce a:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2r^2 (\rho_p - \rho_M) g}{9\eta \frac{f}{f_0}} \quad (14.)$$

Que es la forma más conocida de la Ley de Stokes, y que también puede escribirse como:

$$v = \left(\frac{2}{9}\right) \left(\frac{1}{\eta}\right) (\rho\rho - \rho m) g \left(\frac{r^2}{R}\right) \quad \text{donde:}$$

(15.)

v= velocidad de sedimentación
R= cociente de la resistencia de roce.

La Ley de Stokes no puede ser empleada para precisar de manera cuantitativa las velocidades de sedimentación de las células sanguíneas, porque como ya ha sido mencionado en las propiedades de los leucocitos, el tamaño celular y por tanto la densidad, no son cantidades bien definidas. Sin embargo, la ley de sedimentación es útil para comprender el comportamiento celular en un campo gravitatorio y se pueden predecir sus velocidades aproximadas de sedimentación.

Al observar las velocidades de sedimentación de los diferentes tipos celulares sanguíneos en plasma, calculadas con los datos disponibles de tamaño y densidad celular, se puede concluir que los granulocitos y quizás los monocitos cuyos tamaños son de 9 a 12 μm , se desplazan más rápido a través del plasma que los eritrocitos, debido a la diferencia de tamaños. Los linfocitos se pueden desplazar a la misma o aún a menor velocidad que los eritrocitos.

La velocidad de sedimentación de los leucocitos se favorece aún más pues se asemejan más que los eritrocitos a una par

tícula esférica.

Sin embargo si se deja sedimentar a la sangre con anticoagulante en un tubo de ensayo y se permite que continúe la sedimentación hasta que se establezca un estado de equilibrio, se observa que los eritrocitos quedan más abajo de los leucocitos. Esto se debe a que los eritrocitos presentan una tendencia espontánea a aglomerarse, y en estas condiciones su "r" aumenta (ecuación 14).

Los diferentes tipos de células sanguíneas son especialmente difíciles de aislar debido a que sus valores de ρ_p son muy semejantes entre sí.

La densidad aproximada de los eritrocitos es de 1.093 gm/ml y la densidad de los leucocitos es de 1.080 gm/ml, además, siempre existe cierto solapamiento entre las células respecto a su tamaño y densidad, lo que implica que diferentes tipos celulares se desplazarán parcialmente juntos. En general es muy difícil lograr una alta resolución al tratar de separar los diferentes tipos celulares basándose solamente en sus propiedades físicas. Por tanto, es necesario introducir al sistema un factor que modifique selectivamente a uno o a más grupos celulares, y que no altere a los restantes para que la separación pueda realizarse. En este sentido se pueden considerar varias opciones:

A. Introducir al sistema un agente que provoque aglutinación de un grupo celular, así estas células formarán agregados celulares que se desplazarán más rápido, ya que bajo esta condición, el radio de la "partícula en sedimentación", es mayor.

Este principio puede ser utilizado para aislar células de una población heterogénea, si la agregación es selectiva, afectando a uno o más tipos celulares, pero no a todos.

Aquí es importante comentar que la tendencia de los eritrocitos a aglomerarse es más notoria en la sangre periférica debido a la gran concentración de eritrocitos*

El grado de aglutinación puede ser regulado variando el tipo o la concentración del agente aglutinante celular. El potencial de las células para aglutinarse y la viscosidad del medio pueden variar en intervalos amplios usando alternativamente metilcelulosa, dextrán y Ficoll. La metilcelulosa y el dextrán son muy efectivos para separar eritrocitos mediante agregación y sedimentación a 1g.

B. Introducir un agente que modifique el tamaño y la densidad celular. Por ejemplo, un incremento en la osmolaridad del medio de suspensión disminuye el tamaño celular e incrementa su densidad. Si el efecto sobre la densidad predomina, las células sedimentan a mayor velocidad y la duración del proceso de separación disminuye. Si la sensibilidad osmótica

* La concentración normal de eritrocitos en la sangre es aproximadamente de 4.5 y 5.5 millones de células por milímetro cúbico (microlitro) en la mujer y en el hombre respectivamente; mientras que el número de leucocitos por milímetro cúbico de sangre en el adulto normal es de 5,000 a 10,000 (Junqueira y Carneiro, 1973).

de las células difiere, sus velocidades de sedimentación relativas también cambian.

C. Aplicar procedimientos que provoquen la destrucción selectiva de un tipo celular específico.

D. Combinar dos o más de estas posibilidades.

3.3. Principios de la centrifugación:

Principios teóricos y bases de operación:

Cuando la sedimentación por gravedad (1g) resulta demasiado lenta, la alternativa es someter a las partículas a la influencia de un campo centrífugo. Bajo estas condiciones, la partícula recibe la influencia no sólo de la fuerza de gravedad, sino de una fuerza centrífuga:

$$F_c = mw^2x$$

donde:

F_c = fuerza centrífuga

m = masa de la partícula

w^2 = velocidad angular

x = radio del círculo descrito en la trayectoria circular.

El producto w^2x es la aceleración centrípeta que experimenta la partícula, sin embargo como la partícula sometida a centrifugación en un tubo de ensayo no está conectada al eje de rotación, esta aceleración tiene dirección opuesta a dicho eje.

La partícula sometida a centrifugación "sale disparada" en dirección tangente al círculo descrito en la trayectoria circular, como resultado de la interacción de las fuerzas centrípeta y centrífuga.

Si la partícula no encontrara resistencia a su desplazamiento llegaría al fondo muy rápidamente, pero el fluido en el cual está contenida la hace viajar mucho más lentamente debido a la presencia de las fuerzas de fricción y de flotación, como se puede observar en el siguiente esquema:

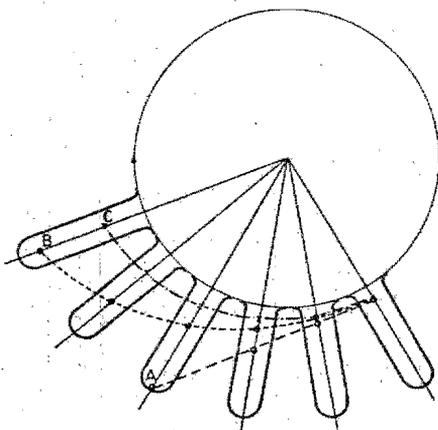


Fig. 5 Sedimentación de una partícula en ausencia de fuerzas de roce (A) y en medios con fuerzas de roce en aumentos progresivos (B y C). (Mireles, en prensa)

Durante la centrifugación, una partícula en proceso de sedimentación se encuentra sujeta a los efectos introducidos por fuerzas centrífuga y de roce, ya que bajo estas con

diciones la partícula tiende a sedimentar por la acción de la fuerza centrífuga (ecuación 16); pero la fuerza de flotación que actúa sobre las partículas (ecuación 5) también aumenta su influencia en proporción al cuadrado de la velocidad angular y la distancia al centro de rotación, de manera que bajo estas condiciones:

$$F_B = \frac{m}{\rho p} (\rho m) w^2 x \quad (17.)$$

En una solución sometida a centrifugación, la velocidad de sedimentación estará por lo tanto determinada también por las condiciones físicas de la centrifugación, es decir por los valores de la velocidad angular (w) y de la distancia a la que se encuentre la partícula (x) al centro de rotación.

Así la partícula alcanzará su velocidad límite cuando la fuerza centrífuga se balancee con las fuerzas de fricción y de flotación (Mireles, en prensa).

$$F_c = F_f + F_B \quad (18.)$$

$$mw^2 x = 6\pi nr \frac{dx}{dt} + \frac{m}{\rho p} \rho M w^2 x \quad (19.)$$

Siguiendo un procedimiento similar al descrito para la deducción de la velocidad de sedimentación de partículas por efecto gravitatorio se llega a:

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{2r^2 (\rho p - \rho M)}{9\eta \left(\frac{r}{f_0}\right)} w^2 x \quad (20.)$$

esta ecuación es la Ley de Stokes que predice la velocidad límite para partículas que sedimentan bajo efecto de un campo centrífugo, e indica que los parámetros que determinan la velocidad de sedimentación (dx/dt) pueden agruparse en tres categorías.

- 1.- Las condiciones físicas de la centrifugación es decir, los valores de w y x .
- 2.- La naturaleza del medio de suspensión, específicamente, su densidad y su viscosidad.
- 3.- Las propiedades de las partículas en suspensión (tamaños y densidades).

- Técnicas de centrifugación.

La centrifugación preparativa es la conveniente al aislamiento de grandes cantidades de material, a continuación, se describen las técnicas de centrifugación comprendidas en esta categoría.

1) Centrifugación diferencial (Separación normal por velocidad)

Esta técnica se refiere a la sedimentación de partículas bajo la influencia de un campo centrífugo que se desplaza obedeciendo en primer término a la diferencia en su tamaño, cuando la densidad y la viscosidad del medio son fijas.

Al someter la solución a centrifugación, la acción de la FCR* produce el desplazamiento de las partículas a lo lar

* Fuerza Centrífuga Relativa

go del recipiente con la velocidad determinada por su tamaño, su forma y por la intensidad del campo centrífugo aplicado (ecuación 20). Cada clase o familia de partículas adquiere una velocidad de sedimentación que le es propia en ese sistema, por esta razón el método es conocido como centrifugación diferencial y se reserva para el caso en que la solución se compone de partículas que muestran diferencias en su peso molecular, es decir, soluciones polidispersas. Cuando se trabaja con una mezcla heterogénea, el componente más pesado será el primero en sedimentar. Así se puede separar a cada fracción en etapas sucesivas, siempre y cuando cada centrifugación dure el tiempo necesario para su separación.

Sin embargo, la composición de la pastilla obtenida puede resultar heterogénea, ya que puede existir contaminación por partículas de fracciones más pequeñas. La separación conseguida por centrifugación diferencial puede mejorarse si se "lavan" las pastillas 2 ó 3 veces.

Este método es útil para el aislamiento de partículas que difieren en una o más órdenes de magnitud, es decir, 10 ó mas veces en velocidad de sedimentación, debajo de este límite no es de utilidad práctica. (Mireles, en prensa).

2) Centrifugación en gradientes de densidad.

Todos los métodos de centrifugación en gradientes de densidad, requieren de una columna líquida de soporte cuya densidad aumenta hacia el fondo de un tubo o celda en que

se halla contenida. El gradiente de densidad es un gradiente de concentración de un soluto, entre mayor la concentración de soluto, mayor la densidad de la solución.

Si las partículas de una mezcla heterogénea difieren en coeficientes de sedimentación y/o densidad, y se someten a centrifugación en un gradiente de densidad, los distintos componentes podrán ser separados de acuerdo con estas propiedades, en forma de zonas o bandas de material muy puro (Mireles, en prensa).

Las dos variantes principales de esta técnica en gradiente de densidad son la centrifugación zonal por velocidad y la centrifugación isopícnica.

2.1) Centrifugación zonal por velocidad:

La mezcla de partículas que se va a fraccionar se deposita cuidadosamente sobre la superficie de un gradiente preformado.

La columna es capaz de soportar a la muestra en condiciones de reposo porque aún cuando las partículas en suspensión son más densas que el medio de dispersión, la densidad promedio de la capa formada por la muestra es menor que la densidad de la del renglón subyacente. Esto ayuda a evitar una sedimentación prematura (Mireles, en prensa).

El propósito de la centrifugación zonal por velocidad, consiste en separar partículas cuyos tamaños difieren, y por tanto sus velocidades de sedimentación también son distintas. El valor de la densidad del medio debe ser menor

que los valores de las densidades de las partículas que se desea separar.

Si la sedimentación durara un tiempo suficientemente largo, todas las partículas se irían al fondo, por esto, la centrifugación debe interrumpirse a un tiempo preciso (ver Figura 6).

Al terminar la centrifugación, se tiene una serie de zonas-dispuestas a lo largo de la columna- en cada una de las cuales se concentra el material purificado de una fracción, siempre que la mezcla original no incluya familias de partículas con el mismo coeficiente de sedimentación. Las zonas pueden ser recuperadas y sometidas a diversos análisis.

El método permite la separación de partículas que difieren al menos en un 20% en su velocidad de sedimentación (Mireles, en prensa).

2.2) Centrifugación isopícnica.

Los métodos isopínicos se emplean para aislar partículas que difieren en densidad. Una partícula que sedimente en un gradiente de densidad, dejará de hacerlo si en algún punto de la columna la densidad del medio se iguala con la suya, es decir, cuando alcanza su densidad de bandeo o densidad de flotación. Esto ocurrirá, si el gradiente comprende el intervalo completo de densidad de las partículas en la muestra y si la centrifugación dura suficiente tiempo para que se establezca el conjunto gradiente-bandas (Mireles, en prensa).

En la posición de densidad de bandeo, el término:

$(\rho_p - \rho_M)$ se iguala a cero:

$$\rho_p - \rho_M = 0$$

por tanto:

$$\frac{dx}{df} = \frac{2 r^2 (\rho_p - \rho_M)}{9n \left(\frac{f}{f_0}\right)} w_2^2 x$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2 r^2 (0)}{9n \left(\frac{f}{f_0}\right)} w_2^2 x$$

$$\frac{dx}{dt} = 0$$

La velocidad también se hace cero y la partícula queda inmóvil.

Importancia de la duración del proceso de centrifugación.

La duración del proceso de separación depende de la distancia que han de recorrer las células; para normalizar una técnica el volumen y el diámetro del tubo deben ser determinados desde el principio. Estos factores definen la altura de la columna de sangre y en consecuencia la duración del proceso. En consecuencia, es posible elegir una duración adecuada para el proceso de separación, mediante el control de la altura de la columna de sangre. Aparentemente la separación no es afectada apreciablemente por el diámetro del tubo, y puede separarse un volumen mayor en tubos de mayor diámetro, manteniendo la altura de la columna de sangre y por tanto también el tiempo de separación.

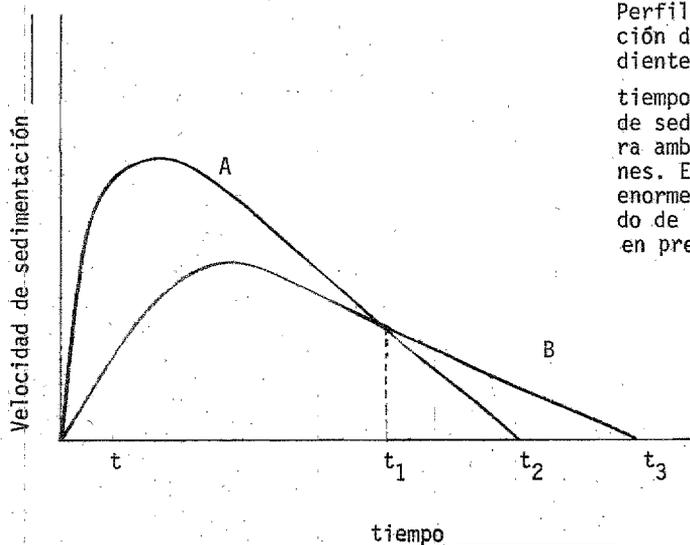
Esto parece ser menos relevante para técnicas de centrifugación donde las células, suspendidas en un fluido de baja densidad, son depositadas en un fluido de alta densidad. Durante la centrifugación, las células migran rápidamente a través de la fase de baja densidad y llegan a la interfase en un tiempo corto. A partir de entonces, ellas sedimentan lentamente y la separación está determinada principalmente por su sedimentación a través de la fase basal.

En un determinado soluto de gradiente, la densidad bandeo de una partícula es más o menos constante. Sin embargo, cuando se realizan separaciones por velocidad es muy importante considerar que el valor de s^* cambia conforme la partícula va encontrando viscosidades y densidades crecientes en el gradiente.

De acuerdo con esto, dos partículas distintas que se encuentran en la misma zona después de centrifugación por velocidad, pueden separarse en el mismo gradiente de densidad si se aumenta o disminuye la FCR o la duración de la centrifugación. Asimismo, durante una centrifugación por velocidad, una zona de partículas que inicialmente haya ido a la zaga de otra debido a que su valor de s fuera menor en la primera parte de la columna, puede eventualmente darle alcance y pasarla cuando ésta se encuentre en una región en la que su valor de s disminuya rápidamente.

* El coeficiente de sedimentación " s " es una aproximación del tiempo que le toma a una partícula acercarse a su velocidad límite (ver Fig. 4). Se expresa en unidades Svedberg. Una unidad Svedberg equivale a la constante 10^{-13} . De este coeficiente se puede obtener información sobre el peso de una partícula determinada.

Fig. 6



Perfil del patrón de sedimentación de dos partículas en un gradiente de densidad. t_1 es el tiempo en el cual la velocidad de sedimentación es la misma para ambos, pero no sus posiciones. Este comportamiento es de enorme importancia en todo método de centrifugación (Mireles, en prensa).

- Uso de rotores.

Una vez que ha sido elegida una técnica de centrifugación, es muy importante considerar el tipo de rotor con el cual se va a trabajar.

La velocidad de sedimentación de las partículas está determinada por las condiciones físicas de la centrifugación, es decir por la velocidad angular y por el radio de rotación al cual se encuentra la partícula. Estas condiciones pueden ajustarse y reproducirse para un tipo de rotor dado si se conoce la fuerza centrífuga relativa (FCR). La FCR es una comparación entre la fuerza de centrifugación y la fuerza que la gravedad

terrestre ejercería sobre las mismas partículas en suspensión, se expresa como:

$$FCR = \frac{F \text{ centrifugación}}{F \text{ gravedad}} = \frac{mw^2x}{mg}$$

$$FCR = \frac{w^2x}{g}$$

Conociendo la FCR, puede determinarse la velocidad del rotor (rpm) necesaria para un cierto radio de rotación, mediante un nomograma. El nomograma es la relación gráfica entre la velocidad de rotación y la magnitud del campo centrifugo resultante. (Mireles, en prensa).

Sin embargo estas no son las únicas consideraciones que deben hacerse. Existen dos tipos de rotores, el rotor de columpio y el rotor angular, y es importante mencionar algunas de sus propiedades pues no deben usarse indistintamente.

Rotores angulares

Cuando un rotor se encuentra en movimiento, el campo centrifugo generado es radial. En un rotor de columpio sólo la componente que pasa por el centro del tubo es paralela a sus paredes, ya que cuando el rotor se acelera, los tubos se reorientan a la posición horizontal.

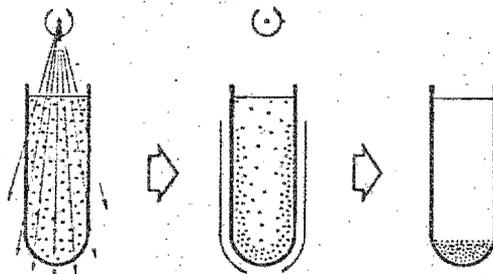


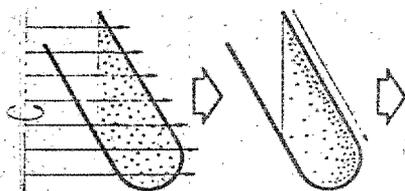
Fig.7 Convección en un rotor de columpio (Mireles,1983).

La centrifugación resultante se manifiesta como un movimiento masivo de partículas a lo largo de las paredes del tubo y hacia el fondo. Con frecuencia, la pastilla toma un aspecto anular cuando se le mira desde arriba.

El rotor de columpio es más usado en el trabajo con gradientes de densidad. Es más efectivo para las separaciones zonales por velocidad debido a que la distancia que la partícula recorre es mayor y da lugar a una mejor separación. Su "desventaja" reside en que las separaciones consumen más tiempo, pero esto se equilibra con el hecho de que se pueden fraccionar muestras con varios componentes. La contrariedad que supone el mayor tiempo de centrifugación se compensa cuando se recurre a la técnica de columna corta (Mireles, en prensa).

Rotores Angulares:

En este tipo de rotor los tubos se mantienen inclinados con respecto al eje de rotación en un ángulo específico y constante. Dicho ángulo de inclinación puede estar entre los 14° y los 40° .

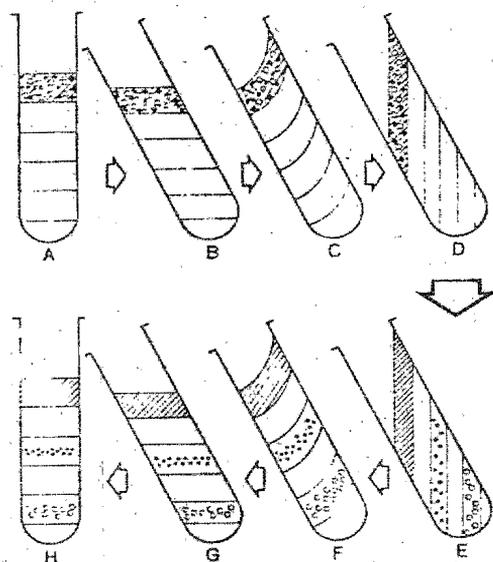


En los rotores angulares la convección es mayor que en los de columpio debido a que las partículas encuentran rápidamente la pared del tubo.

Fig. 8 Convección en un rotor angular. (Mireles, 1983)

Esto se conoce como efecto de pared y provoca que la compactación de partículas sea más rápida.

En estos rotores se pueden realizar buenas separaciones isopícnicas porque tanto las partículas que se mueven a través del gradiente como las que resbalan por la pared son inmobilizadas en cuanto alcanzan su densidad de bandedo.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM

Fig. 9 Centrifugación en gradiente de densidad con un rotor angular (Mireles, en prensa).

Observese que el contenido experimenta reorientación durante aceleración y la desaceleración. (Fig. 9).

Casi nunca se intenta llevar a cabo una separación zonal por velocidad en estos rotores, pues la convección "arrastra" las partículas al fondo más pronto de lo que lo harían a través del gradiente. (Mireles, en prensa).

- Gradientes y materiales de gradientes:-

La Ley de Stokes (ecuación 20) indica que las velocidades de sedimentación de las células, dependen su tamaño, su densidad, y de la viscosidad del medio en que están suspendidas.

Como ya ha sido mencionado (sección 3.2), una elección adecuada del soluto para preparar el gradiente y sus límites de concentración puede cambiar selectivamente las propiedades de algunos de los componentes de una mezcla.

El material de gradiente, debe permitir la preparación de soluciones en el intervalo de densidades de interés pero no debe presentar una elevada viscosidad ni ejercer una presión osmótica excesiva en dicho intervalo de densidades (Mireles, en prensa).

Además, no debe reaccionar con las células y tiene que ser fácilmente removible del paquete celular purificado. También debe tener un bajo costo de adquisición y ser de fácil obtención en las cantidades requeridas.

Los gradientes formados con polímeros pesados como el Ficoll, el Dextrán, y la albúmina son sumamente utilizados para la separación de células. Estos compuestos de alto peso molecular muestran una osmolaridad muy reducida aún en soluciones muy concentradas.

Ficoll:

Es un polímero sintético de sacarosa y de epíclorhidrina. Tiene un peso molecular de 400,000. Las moléculas de Ficoll 400 son sumamente ramificadas, pero su forma es aproximadamente esférica y tiene un radio de Stokes de aproximadamente 100 nm. El Ficoll 400 es muy soluble en agua y su viscosidad es relativamente baja (0.17 dl/g), comparada con la de otros polisacáridos lineales del mismo peso molecular, como el Dextrán T 500; (PM. 500,000, viscosidad 0.53 dl/g). A diferencia de los gradientes de densidad formados con sacarosa y sales como el CsCl, los gradientes de densidad formados con Ficoll 400 tienen presiones osmóticas bajas y gran densidad, por tanto afectan menos a las partículas biológicas y no inhiben enzimas. El problema del Ficoll es que su tonicidad crece exponencialmente con la concentración y aunque tiene efectos someros sobre la función de organelos celulares aislados, puede causar daño a algunas células vivas (Mireles, en prensa).

Dextrán:

El Dextrán "nativo" es una mezcla polidispersa de polisacáridos; cuyos pesos moleculares son desde el orden de pocos cientos, hasta decenas de millones. Estos polímeros son producidos por un conjunto de diferentes especies de bacterias

de la familia Lactobacillaceae. Mediante cuidadosos fraccionamientos repetitivos, se preparan fracciones de Dextrán T, cuyos pesos moleculares son conocidos.

Las separaciones conseguidas con gradientes de Dextrán son equiparables a las obtenidas con algunos gradientes de Ficoll. Similarmente el costo de los dextrans y del Ficoll difiere poco.

Albúmina:

Los gradientes formados con albúmina sérica son muy seguros pues no dañan a las células, sin embargo en el intervalo de densidades de 1.065 a 1.09 gm/ml las soluciones de albúmina son muy viscosas.

Las soluciones muy viscosas son inconvenientes, pues se requiere de una gran fuerza de centrifugación para mover a las células a través del fluido de separación, que puede lesionarlas.

Parece ser ventajoso usar un fluido de separación donde la viscosidad y la densidad puedan variar casi independientemente.

- Criterios para la planificación de separación por centrifugación: Gráfica $s-\rho$.

El conocimiento previo de las densidades y/o los coeficientes de sedimentación de las partículas presentes en una muestra, simplifica el diseño del gradiente y de las condiciones de la centrifugación (Mireles, en prensa). En la figura 10 se presenta un ejemplo de gráfica $s-\rho$ en las que se puede observar la relación entre los coeficientes de sedimentación y las densidades de bandeo de varias partículas biológicas en un gradiente de sacarosa.

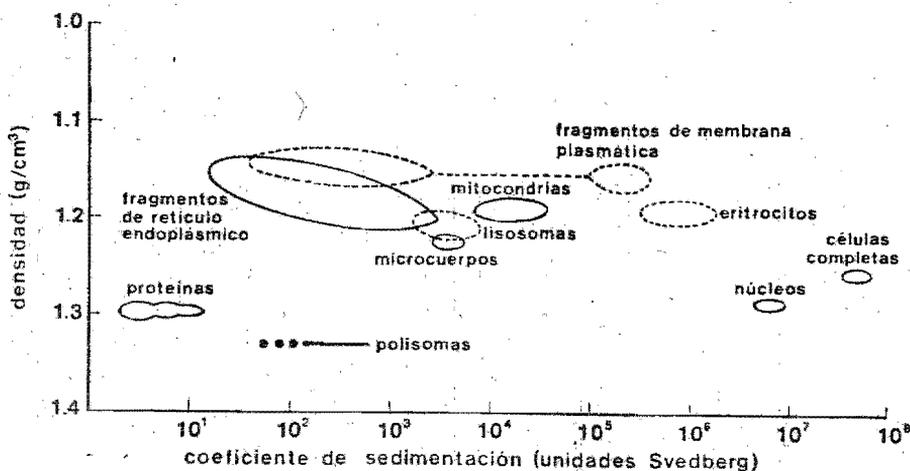


Fig. 10 gráfica $s-\rho$ para partículas en sacarosa (Mireles, en prensa).

En esta gráfica, las densidades de flotación ha sido determinadas en sacarosa. En este tipo de gradiente, la mayoría de las partículas biológicas tienen densidades de flotación parecidas, pero los coeficientes de sedimentación están espaciados, lo que permite la separación parcial con técnicas diferentes o zonales por velocidad.

3.4 El método de Boyum.

La revisión de los trabajos publicados recientemente con temas referentes a leucocitos, tanto de humanos como de otras especies animales, indica que los métodos para separar a las distintas poblaciones celulares sanguíneas son, en general, aplicaciones o modificaciones del método clásico de separación de leucocitos a partir de sangre total, publicado por Arné Böyum en 1968. (Böyum, 1982; Butta *et al*, 1981; Blank, 1980; Roberts, 1980).

En este trabajo, Böyum describe varios sistemas para separar leucocitos de la sangre y de la médula ósea, haciendo referencias especiales a los factores que influyen y modifican las propiedades de sedimentación de las células sanguíneas.

Los sistemas de separación descritos en el trabajo de Böyum, se basan en los mismos principios; todos ellos consisten en dos fases líquidas, donde una suspensión de células se coloca en un fluido de separación de densidad relativamente alta (gradiente). El resultado del proceso de separación está determinado por las velocidades de sedimentación de las células en las dos fases líquidas.

El sistema de Böyum para aislar a los leucocitos polimorfo nucleares consta de dos etapas:

En la primera etapa se coloca a la muestra de sangre sobre un gradiente de Ficoll-paque.

El Ficoll-paque es una solución acuosa de alta densidad, ya que contiene 5.7 gr de Ficoll 400 y 9 gr de diatrizoato de sodio por cada 100 ml. El diatrizoato de sodio forma soluciones de baja viscosidad y alta densidad con el Ficoll 400. Puesto que las soluciones acuosas de polímeros pesados como el Ficoll tienen baja osmolaridad, es necesario agregarle un compuesto de bajo peso molecular, p.ej., diatrizoato de sodio, para obtener un fluido de separación con osmolaridad similar al plasma sanguíneo. También es utilizado para ajustar la densidad del fluido de separación.

El gradiente de Ficoll-paque "atrapa" a los leucocitos en una interfase, mientras que los eritrocitos y los leucocitos polimorfonucleares sedimentan en el fondo del tubo. (ver sección 3.2 y 3.3).

En la segunda etapa se separa a los granulocitos (PMN) de los eritrocitos mezclando el paquete celular obtenido en la primera etapa, con una solución Dextrán T 500, y dejando sedimentar a esta mezcla a 1g, durante 40 minutos. La sedimentación debe llevarse a cabo muy lentamente, pues si ocurre muy rápido, la contaminación de eritrocitos entre los leucocitos aumenta. Como ya se mencionó, el Dextrán T 500 es un polímero de la glucosa, de alto peso molecular (500,000) que al igual que el Ficoll, provoca aglutinación de los eritrocitos.

MATERIAL Y METODOS GENERALES

Procedimientos generales:

1. Colección y manejo de muestras de sangre.

Las tomas de sangre se realizaron en sujetos sanos en ayunas una o dos horas después del desayuno. La sangre se colectó en una jeringa por medio de una cánula insertada en la vena antecubital del brazo; depositándola inmediatamente en un tubo previamente siliconizado* que contenía 10 UI de heparina por cada mililitro de sangre. La sangre se mezcló cuidadosamente con la heparina.

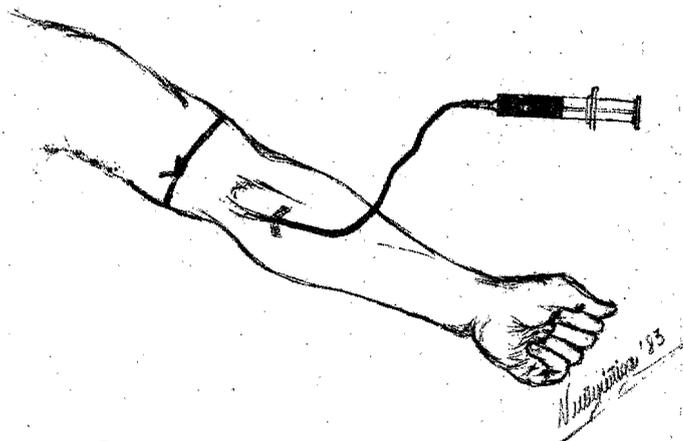


Fig. 11 Colecta de la muestra de sangre venosa.

* Todo el material de vidrio que llegue a estar en contacto con la muestra de sangre, deberá ser previamente siliconizado, sumergiéndolo en solución 1% de silicon, (marca silicad), y enjuagándolo seis veces con agua destilada.

2. Evaluación de la viabilidad celular:

La viabilidad celular se determinó mediante el método de exclusión celular del colorante azul de tripano (Sigma Chem Co.). Cuando dicho colorante se pone en contacto con las células, difunde hacia su interior, pero las células lo sacan mediante mecanismos de transporte activo; así, realizando conteos de las células que permanecen sin teñirse por invasión del colorante, se logra evaluar la viabilidad celular.

3. Determinación de la concentración de proteínas:

Se realizó mediante el método de Lowry para la estimación de la cantidad de proteínas (Lowry *et al*, 1951); utilizando albúmina de suero bovino (Sigma Chem.Co.), como estándar.

4. Técnica de tinción celular empleada:

Los frotis celulares se prepararon mediante la técnica de tinción de Wright (Merck, Méx.).

EQUIPO

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una Centrifuga refrigerada (International Equipment Company), mod. PR-2 y se utilizaron dos tipos de rotores:

- Rotor angular, 12 plazas (IEC 822) Radio: 6 pulgadas.
- Rotor horizontal, 4 plazas (IEC-284) Radio: 8 pulgadas.

Las lecturas de absorbancia para las cuantificaciones de proteína se realizaron en un fotómetro Coleman, mod. 6/20 A.

Para ajustar el pH de las soluciones se utilizó un potenciómetro, Corning mod. 10

Los conteos celulares diferenciales se realizaron utilizando un microscopio Zeiss.

Las fotomicrografías se tomaron en un Fotomicroscopio Carl. Zeiss.

REACTIVOS

Los reactivos empleados se obtuvieron de los siguientes proveedores.

El Dextrán T 500 (PM 500,000) y el Ficoll-paque se obtuvieron de los laboratorios Pharmacia Fine Chemicals. El cloruro de amonio del laboratorio J.T. Baker. La albúmina de suero bovino (Fracción V en polvo) se obtuvo de la compañía Sigma Chemical Co. El silicón de la compañía Silicad.

LISTA DE COSTOS

	Presentación	Costo (pesos M.N.)
Cloruro de Amonio	500 gr	\$ 340.00
Dextrán T 500	100 gr.	\$10,000.00
Ficoll-paque	250 ml	\$50,000.00

* Los precios presentados corresponden al mes de julio de 1982.

* A la fecha referida, las casas representantes del producto en México informan que ya no lo venden pues les resulta incosteable.

Método de Böyum:

Cálculo de los costos para los ensayos con Ficoll-paque.

Por cada ml de sangre se necesitan 1.5 ml de Ficoll-paque, de manera que en un tubo de ensayo cuyo diámetro sea de 8.5 mm el gradiente de ficoll-paque debe tener una altura de 2.4 cms, y la sangre diluida 3 cms.



Sangre 3 cms

Gradiente ficoll-paque

2.4 cms (escala 1:2)

Es muy importante mantener estas proporciones para que no se pierdan las propiedades de separación del gradiente (ver sección 3.2 antecedentes).

Si se trabaja con 100 ml de sangre, para reproducir estas condiciones consideremos que se utilizan 100 tubos como el descrito, para conservar la altura y proporciones de los gradientes, por tanto se necesitarían 150 ml de Ficoll-paque.

Dextrán:

Si en el mismo tipo de tubo de ensayo (10 ml), el botón de eritrocitos y granulocitos ocupa la tercera parte, su volumen aproximado será de 3.5 ml, de manera que se necesita 3.5 ml de la solución de Dextrán T 500 4.% por cada ml de sangre. Por lo tanto para 100 ml de sangre se necesitarían 350 ml de dicha solución, es decir 14 gramos de Dextrán por ensayo.

Costo por ensayo (100 ml de sangre)

150 ml Ficoll-paque:	\$30,000.00
14 gr Dextrán T 500:	<u>\$ 1,400.00</u>
	\$31,400.00

Método de Cloruro de Amonio 0.83%

Para trabajar con 100 ml de sangre se necesitan aproximadamente 600 ml de solución de NH_4Cl 0.83% por ensayo.

Por lo tanto se necesitan 5 gr de NH_4Cl por ensayo.

Si 500 gr --	\$390.00
5 gr --	3.40

costo por ensayo \$3.40

Notas sobre el informe del rendimiento celular obtenido:

i) La cantidad total de leucocitos en la sangre en el adulto normal es de 5000 a 10000 células por microlitro.

ii) El porcentaje de leucocitos polimorfonucleares es del 64.7% (Cline, 1975)

iii) Dado que los leucocitos polimorfonucleares corresponden a 64.7% del total de leucocitos en la sangre, si:

1 ml de sangre total contiene $7.5 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^6$ leucocitos, por tanto 1 ml de sangre total contiene aproximadamente $4.8 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ células.

iv) Galant y sus colaboradores informan que 1 mg de proteínas de leucocitos PMN, corresponden a 20×10^6 células, es decir, 20 millones de células (Galant *et al*, 1980/a).

Considerando estos datos, el rendimiento de proteínas se tradujo a rendimiento en cuanto a número de células, de la siguiente manera:

1 mg de proteína = 20×10^6 células.

"n" de proteína = número de células.

v) Como en 1 ml de sangre hay $4.8 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ leucocitos PMN, si la recuperación total fuera del 100% por cada mililitro de sangre se esperaría obtener los siguientes rendimientos en los paquetes celulares finales:

CANTIDAD DE SANGRE	NUMERO APROXIMADO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES	RENDIMIENTO ESPERADO EN MG DE PROTEINA
1	$4.8 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$	$.24 \pm 0.08$
10	$48 \times 10^6 \pm 16 \times 10^6$	2.4 ± 0.8
80	$384 \times 10^6 \pm 128 \times 10^6$	19.2 ± 6.4
100	$480 \times 10^6 \pm 160 \times 10^6$	24.0 ± 8.0

DISEÑOS EXPERIMENTALES

La implementación del método alternativo para aislar a los leucocitos polimorfonucleares, se desarrolló en 3 etapas:

- Etapa I Método de Böyum
- Etapa II Método de separación de interfases
- Etapa III Método del Cloruro de amonio 0.83.%

En este capítulo se presentan los diseños experimentales de cada método realizado en este trabajo.

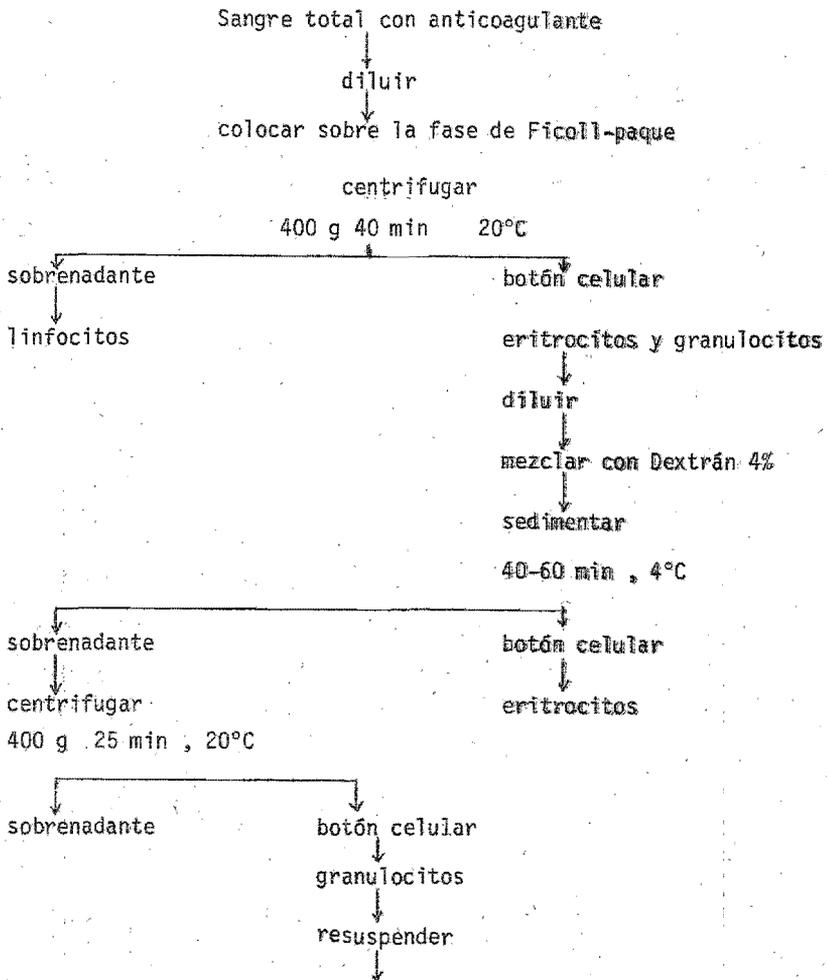
ETAPA I: METODO DE BÖYUM

La sangre anticoagulada y diluida (1:3) con solución de NaCl 0.9%, se coloca sobre la fase de Ficoll-paque, y se centrifuga a 400 g durante 40 minutos a 20°C.

Los elementos figurados se dividen en dos fracciones principales: los granulocitos y eritrocitos sedimentan en el fondo del tubo, mientras que los linfocitos y las plaquetas permanecen en la interfase de células mononucleares. Las células de la masa celular del fondo del tubo, se mezcla (vol:vol) con dextrán al 4%* y se separa la fase del sobrenadante cuando los eritrocitos se han depositado por sedimentación a 1g. Esta fase del sobrenadante contiene a los granulocitos (Fig. 12).

* La solución de Dextrán 4% se prepara utilizando solución de NaCl 9% como disolvente.

Separación de leucocitos polimorfonucleares: ETAPA I
 Protocolo experimental: Método de A. Böyum.



- pruebas de viabilidad celular
- determinación de proteína
- conteos celulares
- ensayos

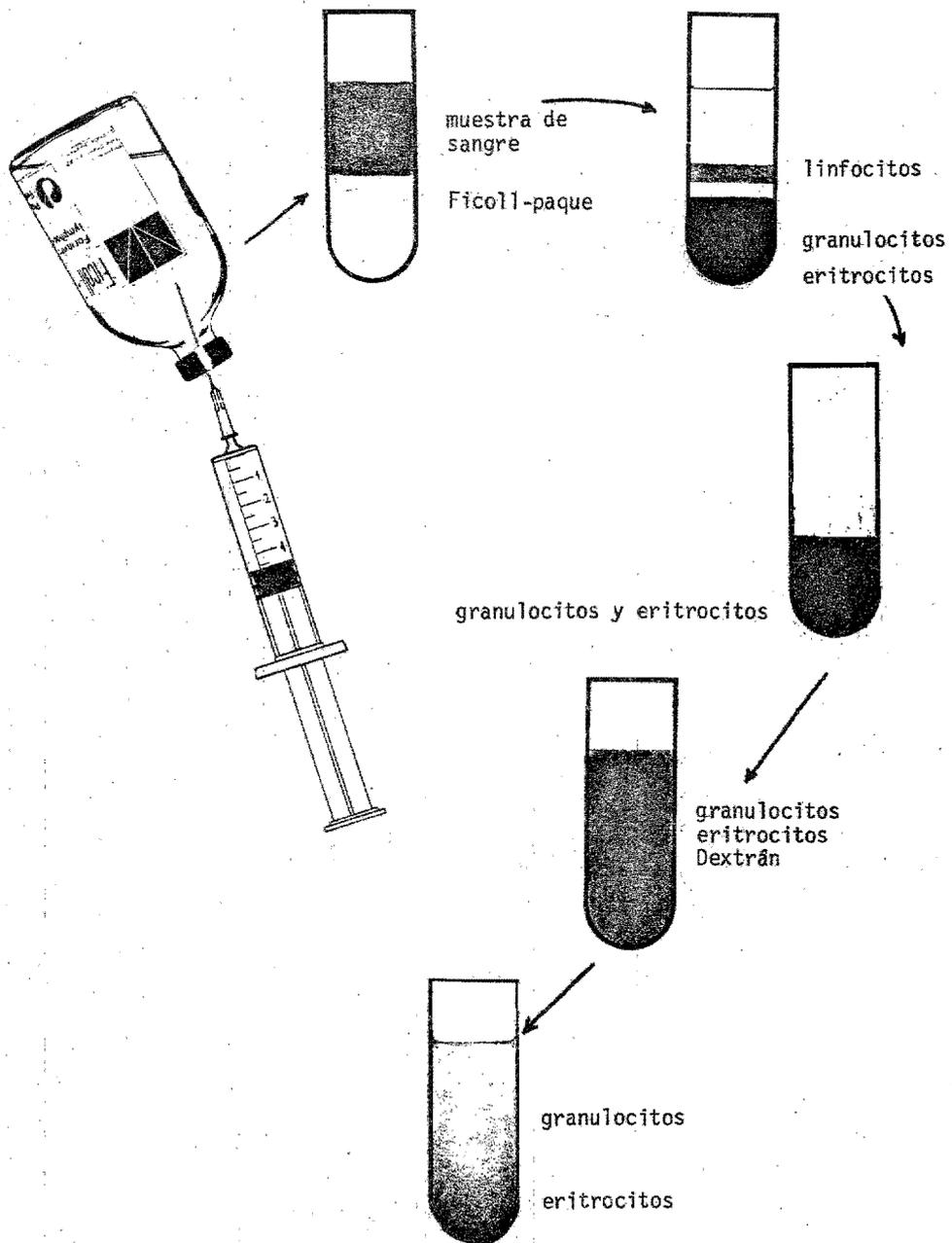


FIG. 12 METODO DE BOYUM PARA LA SEPARACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

ETAPA II: METODO DE SEPARACION DE INTERFASES

La muestra de sangre con anticuagulante se centrifuga a 400 g durante 20 minutos, a 20°C.

Al terminar, se extrae la interfase, y el plasma se mezcla con el paquete de eritrocitos y granulocitos.

Se centrifuga a 400 g, durante 20 minutos a 20°C.

Se descartan el sobrenadante y la interfase; el paquete de eritrocitos y granulocitos se transfiere a un tubo limpio y se diluye con solución de sales balanceadas, (Vol.1:1) Se le agrega Dextrán 4%, en un volumen igual al volumen del paquete resuspendido. Se deja sedimentar a temperatura ambiente, durante 1 hora, al cabo de la cual el sobrenadante se separa y se centrifuga a 400 g, durante 30 minutos, a 20°C

El paquete celular obtenido se resuspende con solución de sales balanceadas, se centrifuga a 400 g, durante 20 minutos a 20°C.

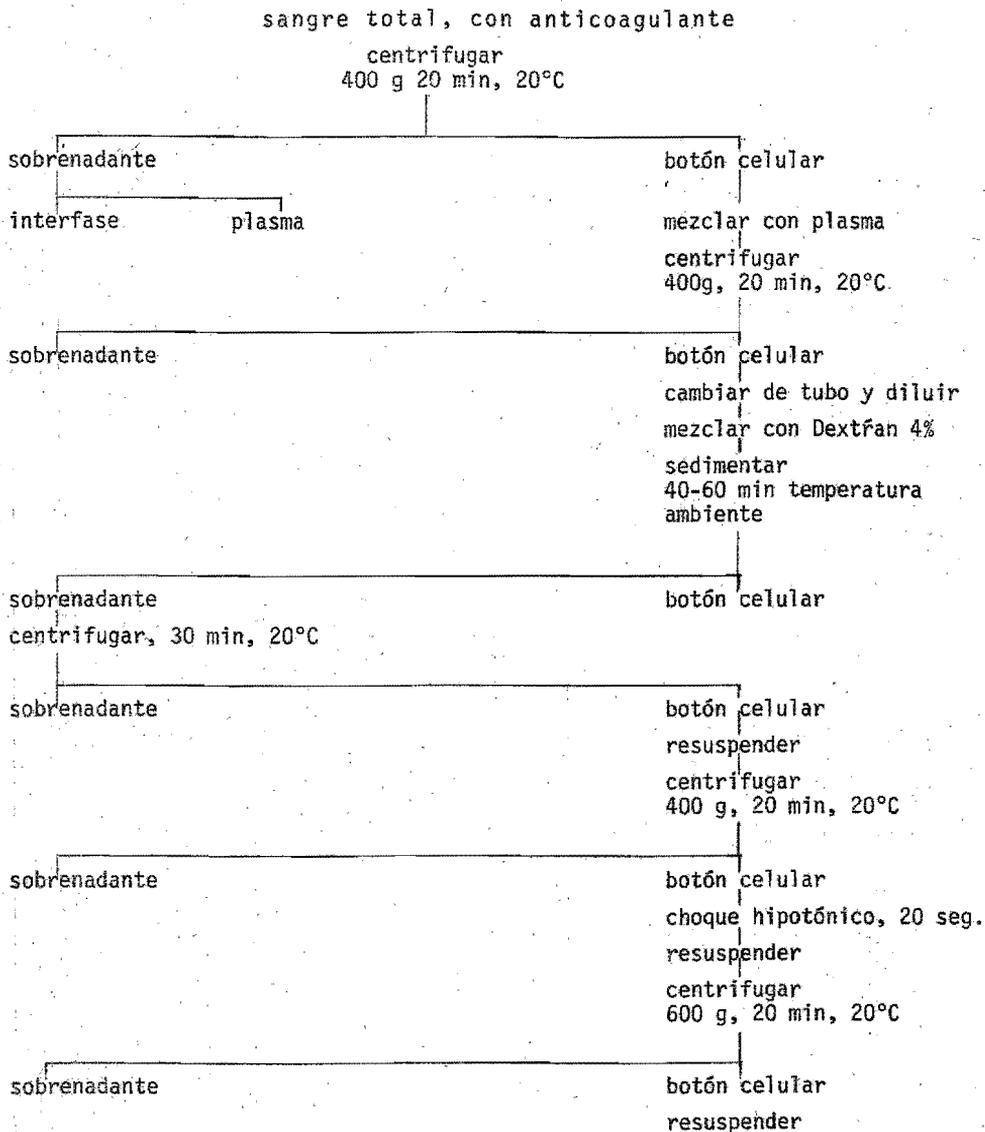
Se desecha el sobrenadante y se agregan 4 ml de solución de NaCl 0.2% para producir el choque hipotónico mezclando cuidadosamente durante 20 segundos.

Inmediatamente se le agrega solución 1.6% de NaCl

Se centrifuga a 600 g, durante 20 minutos a 20°C.

Se descarta el sobrenadante (Fig 13).

Separación de leucocitos polimorfonucleares; ETAPA II
 Protocolo experimental: Método de separación de interfases.



- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - pruebas de viabilidad celular - determinación de proteína - conteos celulares - ensayos |
|--|

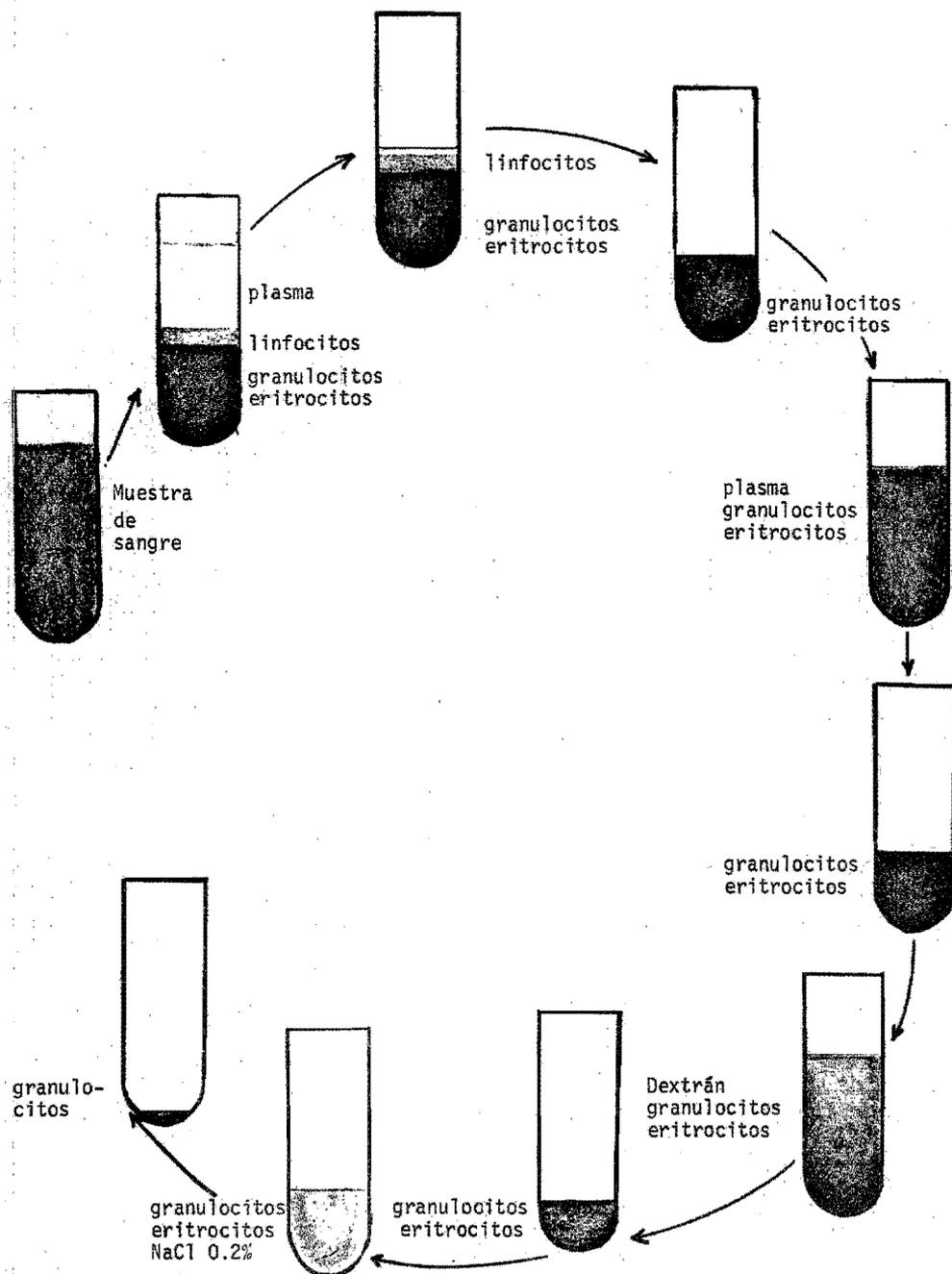


FIG. 13 METODO DE SEPARACION DE INTERFASES PARA LA OBTENCION DE LEUCOCITOS PMN

ETAPA III: METODO DEL CLORURO DE AMONIO 0.83%.

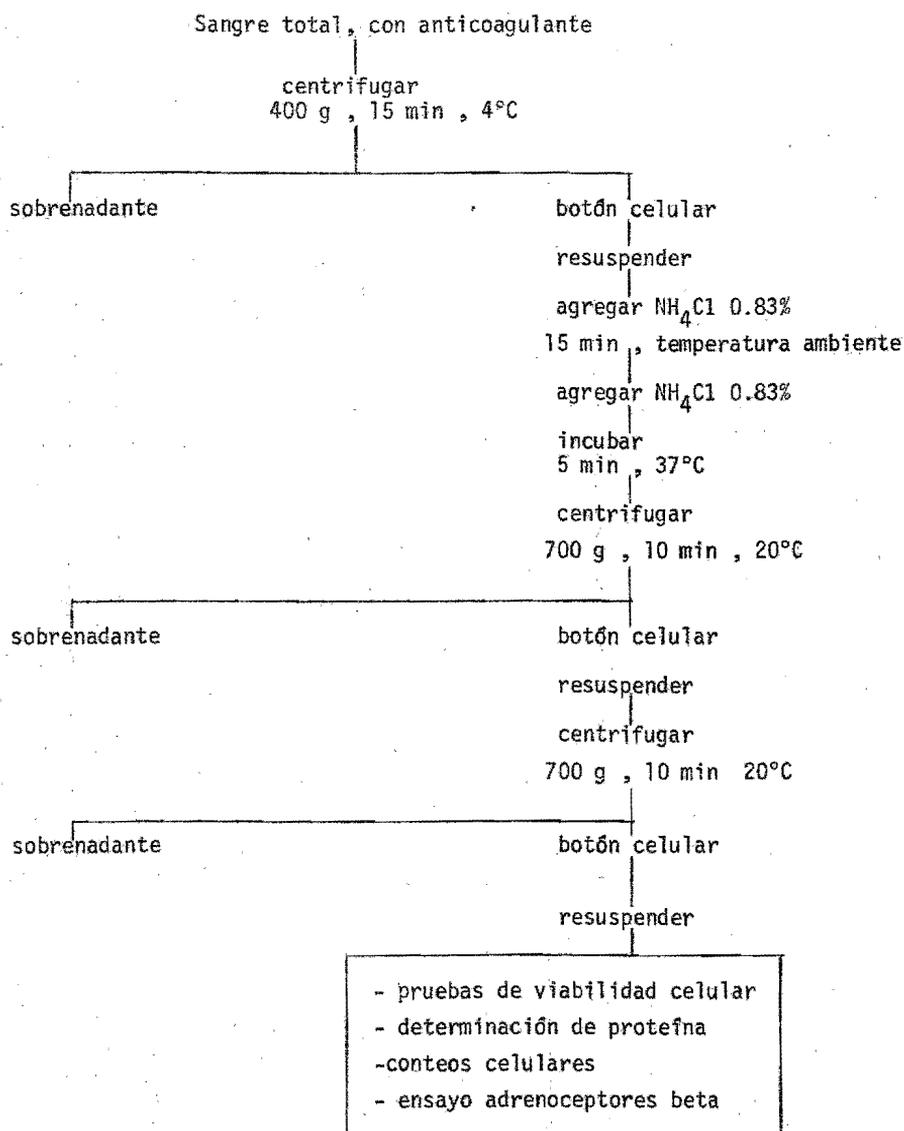
Se distribuyen 80 ml de sangre periférica con anticoagulante (10 UI de heparina por ml de sangre) en 4 tubos siliconizados, (20 ml/tubo). Se centrifuga a 400 g (1,500 rpm) a 4°C, durante 15 minutos. Se extrae el sobrenadante hasta 5 mm abajo del menisco del paquete celular, y se guarda. Cada paquete celular se transfiere a otro tubo, al cual se añaden 10 ml de la solución de sales balanceadas (Vol. 1:1 apróx.) se mezcla bien y se le agregan 30 ml de la solución de NH_4Cl 0.83% (vol.1:3 apróx.). Se deja incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se reúne el contenido de dos tubos, en un matraz y se afora a 250 ml con la solución de NH_4Cl 0.83%.

Se hace lo mismo con los demás tubos. Se incuba en baño a 37°C, agitando suave y constantemente durante 5 minutos.

Se distribuyen los 250 ml en tubo de 9.15 mm de diámetro interno, y se centrifugan a 2,600 rpm durante 10 minutos a 20°C. Se desecha el sobrenadante hasta 2 ó 3 mm arriba del menisco del paquete celular. Se reúnen los botones de todos los tubos en un solo tubo. Se centrifuga a 2,600 rpm, durante 10 minutos a 20°C. Se resuspende el paquete celular obtenido con solución de sales balanceadas (Tabla 2) (Fig. 14).

Separación de leucocitos polimorfonucleares: ETAPA III

Protocolo experimental: Método con cloruro de amonio



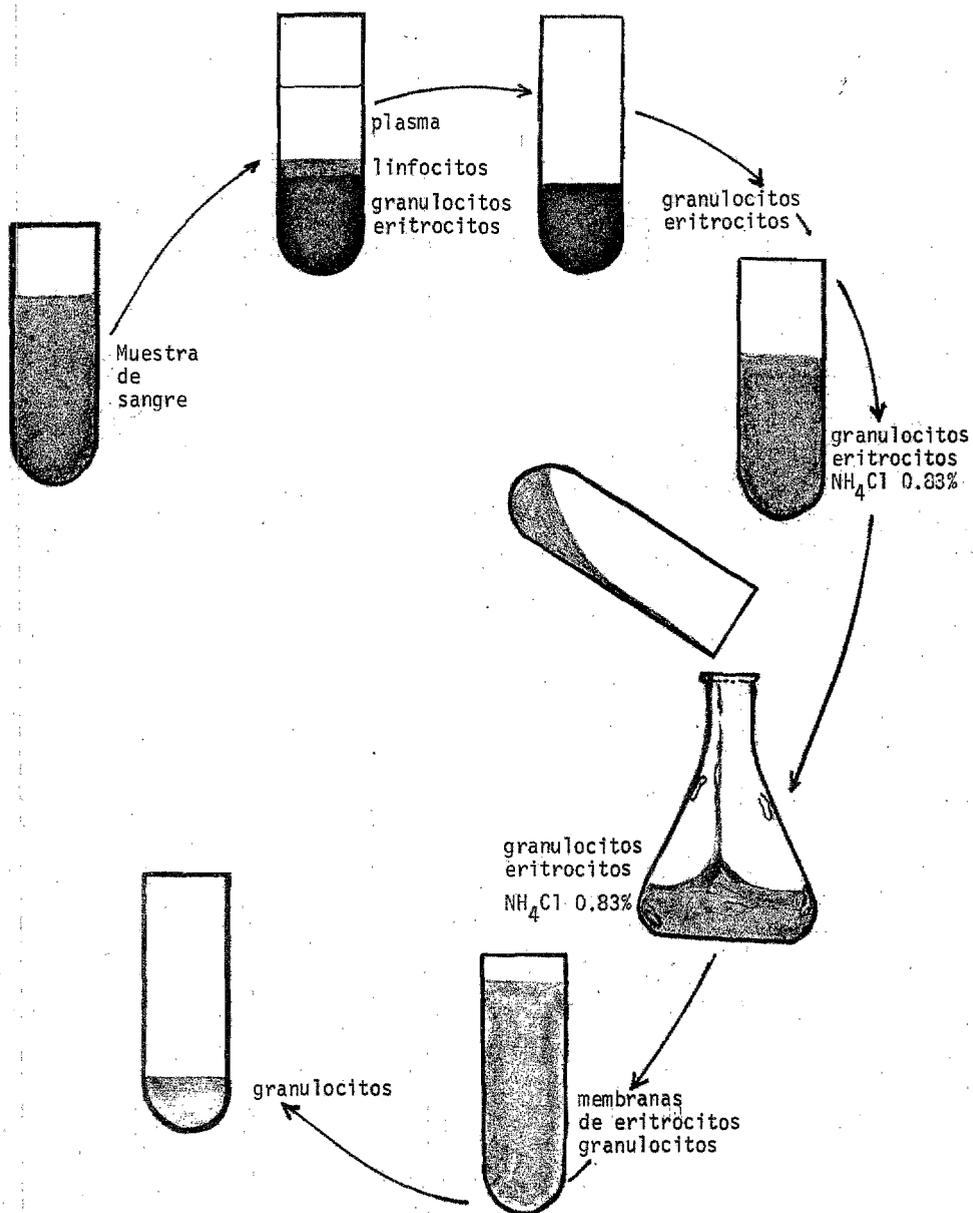


FIG. 14 METODO DEL CLORURO DE AMONIO 0.83% PARA LA SEPARACION DE LEUCOCITOS PMN

TABLA 2: Preparación de la solución de sales balanceadas. Esta solución se prepara a partir de dos soluciones originales:

SOLUCION A:	Concentración	para 1 lt. (gr)	para 100 ml. (gr)
Glucosa	0.1	1	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50.M	0.0074	0.00074
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.98 mM	0.1992	0.01992
KCL	5.4 mM	0.4026	0.04026
Tris	.145 M	17.565	1.7565

Se aforan las soluciones con agua destilada y el pH se ajusta a 7.6 con HCl 1N.

SOLUCION B:	Concentración	para 1 lt. (gr)	para 100 ml. (gr)
NaCl	0.14 M	8.19	0.819

Se prepara la solución de sales balanceadas, se mezcla un volumen de la solución A, con 9 volúmenes de la solución B.

R E S U L T A D O S

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas. Cada etapa corresponde a uno de los métodos:

- Etapa I: Método de Böyum.
- Etapa II: Método de separación de interfases.
- Etapa III: Método del Cloruro de Amonio 0.83%

Los parámetros evaluados son:

- Rendimiento celular.
- Viabilidad celular.
- Pureza del paquete celular obtenido (conteos celulares diferenciales).
- Análisis de la morfología.

TABLA 3: RESULTADOS OBTENIDOS APLICANDO EL METODO DE BOYUM

Referencia	Cantidad de sangre inicial (ml)	Rendimiento en mg de proteína	Rendimiento en mg.de proteína (referido a - 80 ml de sangre inicial).	Rendimiento en número de células	Viabilidad celular (%)
11-III-1982	45	interfase - botón 6.75	interfase - botón 11.7	interfase - botón 234×10^6	interfase - botón 70
15-III-1982	45	La fracción recuperada fue ínfima			interfase - botón <50
24-III-1982	45	La fracción recuperada fue ínfima			interfase - botón <50
1-IV -1982	40	interfase - botón 7.5	interfase 3.3 botón 15.0	botón 300×10^6	interfase - botón 97
6-IX -1982	10	interfase - botón 2.71	interfase - botón 21.7	botón 434×10^6	interfase - botón 90
14-IX -1982	80	interfase 0.52 botón 4.5	interfase 0.52 botón 4.5	botón 90×10^6	interfase - botón 70
20-IX- 1982	45	interfase - botón 6.0	interfase 0.9 botón 10.66	botón 213.2×10^6	interfase - botón 90
11- X -1982	80	interfase 0.54 botón 6.0	interfase 0.54 botón 6.0	botón 120×10^6	interfase - botón 70
23-IV- 1983					interfase - botón 70
28-IV -1983	80	interfase 0.48 botón 4.0	interfase 0.48 botón 4.0	botón 80×10^6	interfase - botón 100

TABLA 4: RESULTADOS OBTENIDOS APLICANDO EL METODO DE BOYUM

Referencia	Pureza de la preparación obtenida: Conteos diferenciales(%)					
		Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
11-III-1982	interfase botón	18	-	8	74	10
		96	-	2	2	-
15-III-1982	interfase botón	las células estaban muy dañadas, no se pudo identificarlas				
		81	-	-	17	2
24-III-1982	interfase botón	4	-	-	88	8
		50	-	-	39	11
1-IV -1982	interfase botón	10	-	-	88	2
		72	-	-	28	-
6-IX -1982	interfase botón	las células estaban muy dañadas, no se pudo identificarlas				
		97	-	-	2	1
14-IX -1982	interfase botón	las células estaban muy dañadas, no se pudo identificarlas				
		82	10	-	8	-
20- IX -1982	interfase botón	las células estaban muy dañadas, no se pudo identificarlas				
		99	1	-	-	-
11-IX -1982	interfase botón	las células estaban muy dañadas, no se pudo identificarlas				
		92	1	-	7	-
23-IV -1983	interfase botón	prácticamente no había células en la preparación				
		95	2	1	2	-
28-IV -1983	interfase botón	24	-	-	76	-
		100	-	-	-	-

TABLA 5: RESULTADOS OBTENIDOS CON EL METODO DE SEPARACION DE INTERFASES

Referencia	Rendimiento en mg de protefna	Viabilidad celular (5)	Pureza de la preparación obtenida			Conteos diferencias (%)	
			Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
5- IV-1982	interfase botón	-	45	2	2	34	17
			99	-	-	1	-
6- IV-1982	interfase botón 0.4	-	-	-	-	-	-
			83	-	-	14	3
12- IV-1982	interfase botón 0.84	-	70	-	-	30	-
			99	-	-	1	-
22- IV-1982	interfase botón 5.73	-	41	-	1	58	-
			92	-	-	8	-
29- IV-1982	interfase botón 4.85	-	-	-	-	-	-
			88	4	-	8	-
4- V -1982	interfase botón 1.4	-	48	1	-	50	1
			100	-	-	-	-
7- V -1982	interfase botón	-	33	-	-	66	1
			75	-	-	24	-
10- V -1982	interfase botón 5.1	-	39	2	-	58	1
			90	-	-	10	-
11- V -1982	interfase botón 3.48	-	10	-	-	88	2
			91	1	-	8	-
12- V -1982	interfase botón 5.7	-	56	3	-	41	-
			98	1	-	1	-
18- V -1982	interfase botón	-	-	-	-	-	-
			97	3	-	-	-
19- V -1982	interfase botón	-	-	-	-	-	-
			95	4	-	1	-

TABLA 6: RESULTADOS OBTENIDOS CON EL METODO DE SEPARACION DE INTERFASES

Referencia	Rendimiento en mg de protefna	Viabilidad celular (%)	Pureza de la preparaci3n obtenida			Conteos diferencias (%)	
			Neutr3filos	Eosin3filos	Bas3filos	Linfocitos	Monocitos
21- V -1982	bot3n 5.73	-	92	5	-	3	-
25- V -1982	bot3n 1.6	-	78	-	-	22	-
27- V -1982	bot3n 11.4	-	94	3	1	2	-
27- V -1982	bot3n 10.4	-	93	5	-	2	-
3-VI -1982	bot3n 2.89	-	93	6	-	1	-
10-VI -1982	bot3n 5.3	-	91	-	-	9	-
11-VI -1982	bot3n 3.45	-	96	3	-	-	1
21-VI -1982	bot3n	-	82	-	-	18	-
25-VI -1982	bot3n 1.2	c3lulas rotas	76	1	-	23	-
30-VI -1982	bot3n	-	100	-	-	-	-
6-VII-1982	interfase	-	64	-	-	38	-
	bot3n	-	86	-	-	14	-
12-VII-1982	bot3n 6.9	c3lulas muy da1adas	98	1	-	-	1
21-VII-1982	bot3n	-	98	1	-	1	-
23-VII-1982	interfase	-	2	-	-	98	-
	bot3n	-	100	-	-	-	-
26-VII-1982	bot3n 6.1	muchos eritrocitos	100	-	-	-	-
29-VII-1982	bot3n 5.97	muchos eritrocitos	97	3	-	-	-

TABLA 7: RESULTADOS OBTENIDOS APLICANDO EL METODO DEL CLORURO DE AMONIO

Referencia	Cantidad de sangre inicial (ml)	Rendimiento en mg de protefna	Rendimiento en número de células	Viabilidad celular (%)
3-VIII-1982	80	12.46	249.2 X 10 ⁶	-
5-VIII-1982	80	13.0	260. X 10 ⁶	98
10-VIII-1982	80	7.2	144. X 10 ⁶	95
12-VIII-1982	80	2.2	44. X 10 ⁶	94
13-VIII-1982	80	6.2	124. X 10 ⁶	92
17-VIII-1982	80	9.1	182. X 10 ⁶	60
19-VIII-1982	80	11.7	234. X 10 ⁶	85
23-VIII-1982	80	7.1	142. X 10 ⁶	88
23-VIII-1982	80	-	-	-
26-VIII-1982	80	6.2	124. X 10 ⁶	87
31-VIII-1982	80	5.4	108. X 10 ⁶	89
31-VIII-1982	80	-	-	-
2- IX -1982	80	10.9	218. X 10 ⁶	90
23- IX -1982	80	11.6	232. X 10 ⁶	90
28- IX -1982	80	10.49	209.8 X 10 ⁶	89
24- II -1983	80	13.3	266. X 10 ⁶	90
27- II -1983	80	14.1	282. X 10 ⁶	97

$\bar{x}=9.4$ mg
 $s=3.5$
 $cv=37.3\%$
 $S(\bar{x})=0.25$
 $\bar{x} \pm 2S(\bar{x}) = 8.9 \rightarrow 9.9$
 intervalo de confianza al 95%=85.6 \rightarrow 92.2

$\bar{x}=88.9\%$
 $s=5.97$
 $cv=6.7\%$
 $S(\bar{x})=1.65$
 $\bar{x} \pm 2S(\bar{x}) = 88.9 \rightarrow 92.2$
 $= 85.6 \rightarrow 92.2$

TABLA 8: RESULTADOS OBTENIDOS APLICANDO LA TECNICA DEL CLORURO DE AMONIO

Referencia	Pureza de la preparación final obtenida: conteos celulares diferenciales (%)				
	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
3-VIII-1982	95	-	-	5	-
5-VIII-1982	68	5	-	18	9
10-VIII-1982	94	3	-	3	-
12-VIII-1982	95	-	1	4	-
13-VIII-1982	96	1	-	3	-
17-VIII-1982	97	2	-	-	1
19-VIII-1982	88	3	-	7	2
23-VIII-1982	93	-	-	7	-
23-VIII-1982	97	-	-	3	-
26-VIII-1982	89	3	-	8	-
31-VIII-1982	92	-	-	6	2
31-VIII-1982	90	5	-	5	-
2- IX -1982	90	1	-	9	-
23- IX -1982	95	2	-	2	1
28- IX -1982	75	2	-	23	-
24- II -1983	92	-	-	8	-
27- V -1983	92	3	-	5	-

$$\bar{x} = 92.5\%$$

$$s = 7.09$$

$$cv = 7.66\%$$

$$S(x) = .44$$

$$\bar{x} \pm 2S(x) = 92.5 \pm .88$$

intervalo de confianza al 95% = 91.6 → 93.4

TABLA 9: COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL METODO DE BOYUM Y CON EL METODO DE CLORURO DE AMONIO 0.83%

	Porcentaje de recuperación del total de leucocitos de la sangre (%)	Viabilidad celular (%)	Pureza de la preparación. (%)	Contaminación por otros tipos celulares. (%)	Tiempo de obtención (aprox) (MIN)	Costo por ensayo (para 100 ml de sangre) (\$ M.N.)
<u>METODO DE BOYUM</u>						
(resultados publicados por Boyum en 1968, y por Pharmacia Fine Chemicals en 1974).						
i) obtención de linfocitos	35.%	90%	90%	35% PMN 10% eritrocitos	80	\$30000.00
ii) obtención de PMN	48.7%	99%	90%	1.1% monocitos 55.6% eritrocitos	170	\$30000.00 \$1400.00 <u>\$31400.00</u>
<u>METODO DEL NH₄Cl 0.83%</u>						
obtención de PMN	37.%	92.3%	89%	.9% monocitos 6.87 linfocitos membranas de eritrocitos	60	\$3.40

ASPECTOS MORFOLOGICOS

Las fotomicrografías que se presentan a continuación fueron tomadas con un microscopio Carl Zeiss con un sistema de campo claro. El tipo de película empleado fue pancromática Kodak Plus X. Cada fotomicrografía presentada tiene 3.3 aumentos posteriores, y todas se prepararon en frotis.

SANGRE TOTAL

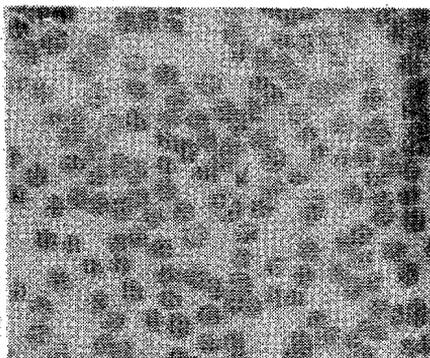
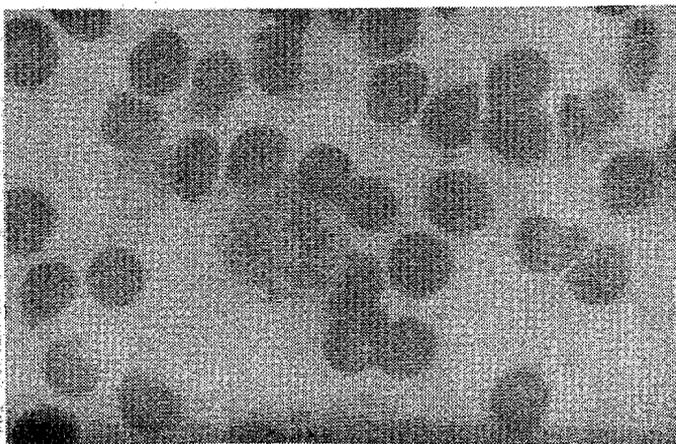


Fig. 15 Fotomicrografías de una extensión de sangre humana teñida con la solución de Wright. Se observan numerosos eritrocitos y un leucocito polimorfonuclear.

Fotomicrografía de la izquierda:
aumento: X 160.

Fotomicrografía inferior:
aumento: X 400.



12 μ m.

ETAPA I

METODO BOYUM

Interfase Ficoll-paque

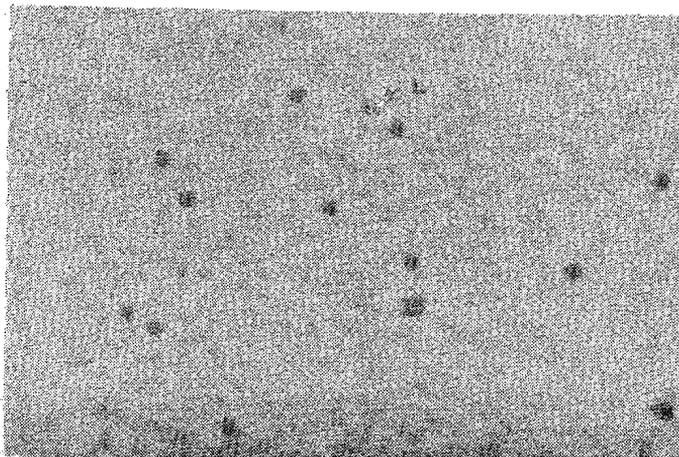
10 μ m

Fig. 16 Fotomicrografía que muestra el aspecto general de las células separadas en la interfase de Ficoll-paque. Se observan linfocitos. (L). Aparecen también una gran cantidad de eritrocitos contaminantes. Aumento 100 X.

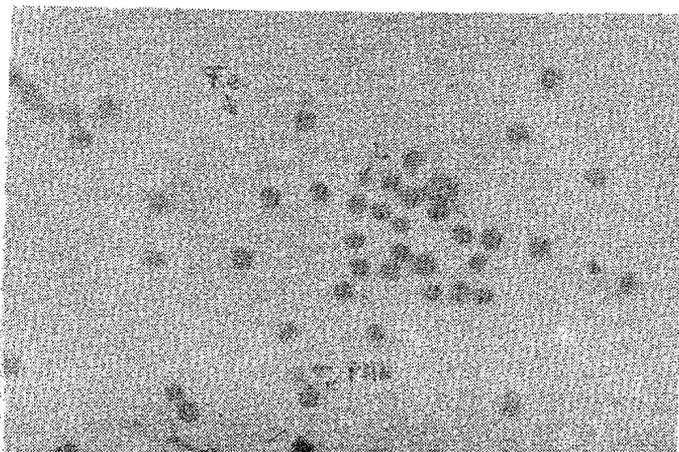
10 μ m.

Fig. 17 Leucocitos de la interfase de Ficoll-paque. Población celular constituida principalmente por linfocitos (L). Aparecen numerosos polimorfonucleares (PMN). La contaminación por eritrocitos ha sido considerablemente reducida, pero sus fantasmas celulares permanecen en la preparación (F.e). Aumento 100 X.

ETAPA I

METODO DE BOYUM

Sobrenadante de Dextrán

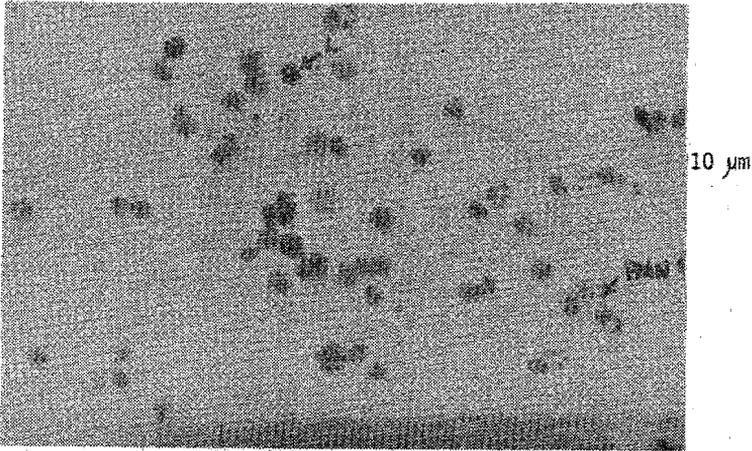


Fig. 18 Aspecto de los leucocitos separados en la fase del sobrenadante de Dextrán. Población constituida en más del 90% por leucocitos polimorfonucleares (PMN), sin embargo aparecen linfocitos (L). La contaminación por eritrocitos es prácticamente nula por la aplicación del choque hipotónico, los leucocitos también han sido dañados. Aumento 100X.

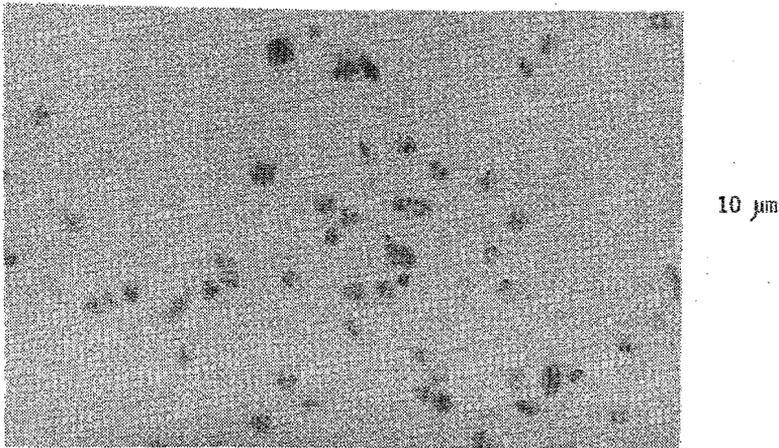


Fig. 19 población de leucocitos polimorfonucleares aislada mediante el método de Boyum. Nótese que la población es muy homogénea, pero las células están muy maltratadas. Aumento 100 X.

ETAPA II

METODO DE SEPARACION DE INTERFASES.

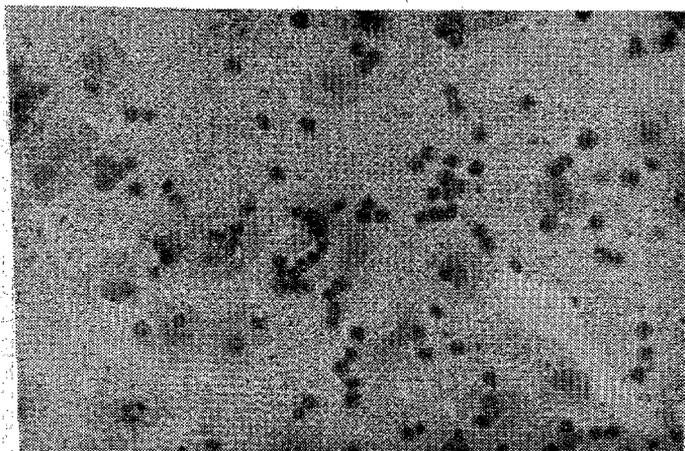


Fig. 20
 En este campo se observa a las células aisladas en la interfase. Es una población heterogénea constituida por linfocitos, numerosos eritrocitos (muy dañados) y PMN.
 Aumento 100 X.

10 μ m

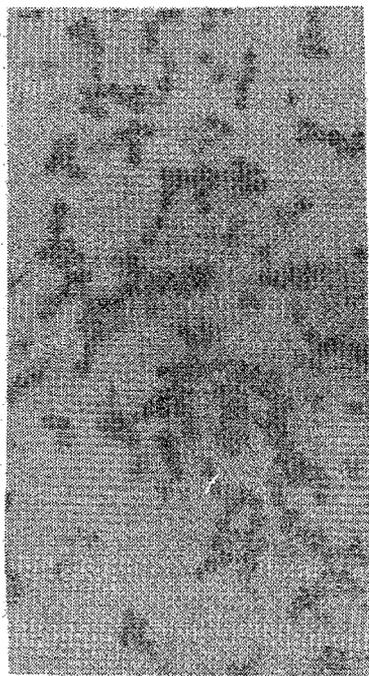
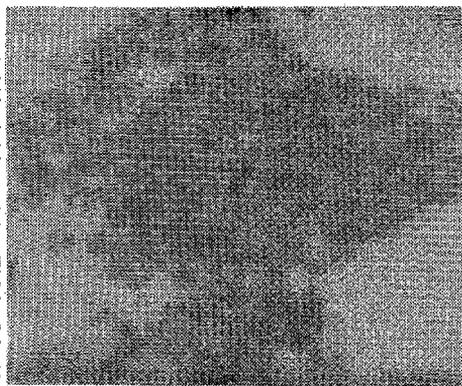


Fig. 21
 Aspecto general de la población de leucocitos polimorfonucleares atrapados en la fase del sobrenadante de Dextrán. Nótese la ausencia de linfocitos, pese a que no se utilizó Ficoll-paque. Se observan también numerosos fantasmas celulares. El daño celular aún es considerable. Fotomicrografía de izquierda aumento 40 X, abajo aumento 100 X

10 μ m



ETAPA III

METODO DEL CLORURO DE AMONIO 0.83 %

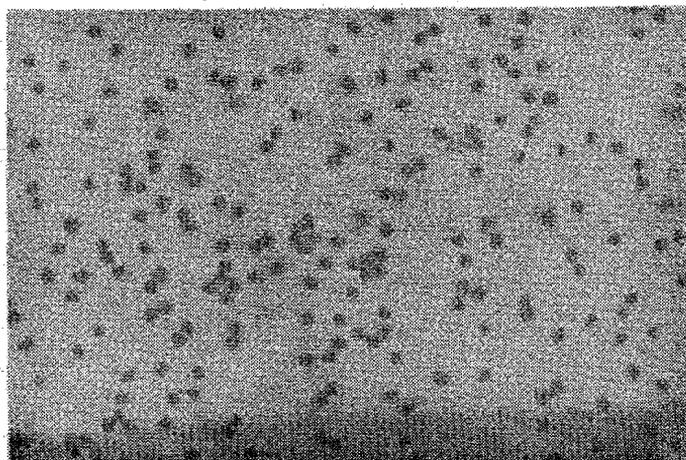
12 μ m

Fig. 22. Aspecto general de la población celular obtenida mediante el Método del cloruro de amonio 0.83%. Practicamente el 100% de las células son leucocitos polimorfonucleares. Aumento 40 X.

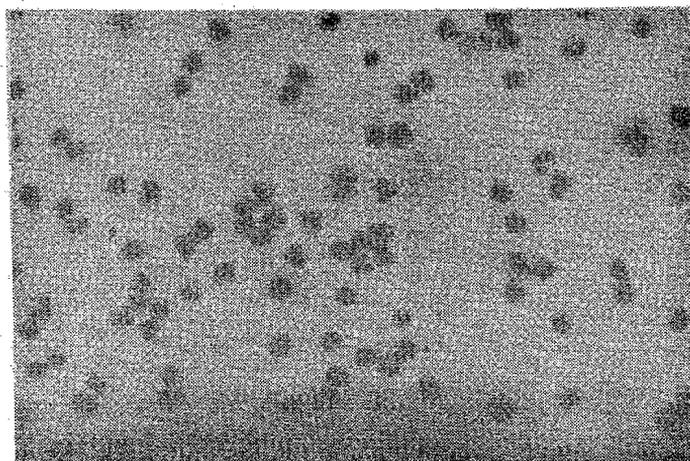
12 μ m

Fig. 23 Población de leucocitos polimorfonucleares obtenida mediante el método del cloruro de amonio 0.83%. Compárese el aspecto morfológico de las células de esta preparación con el aspecto de las células obtenidas mediante los métodos de las etapas I y II. Aumento 100 X.

ETAPA III

METODO DEL CLORURO DE AMONIO 0.83%

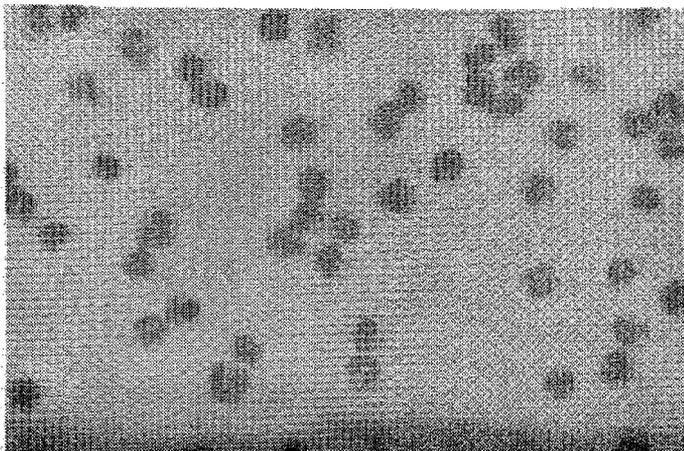


Fig. 24 Leucocitos polimorfonucleares obtenidos mediante el método del cloruro de amonio 0.83%. Aumento 160X

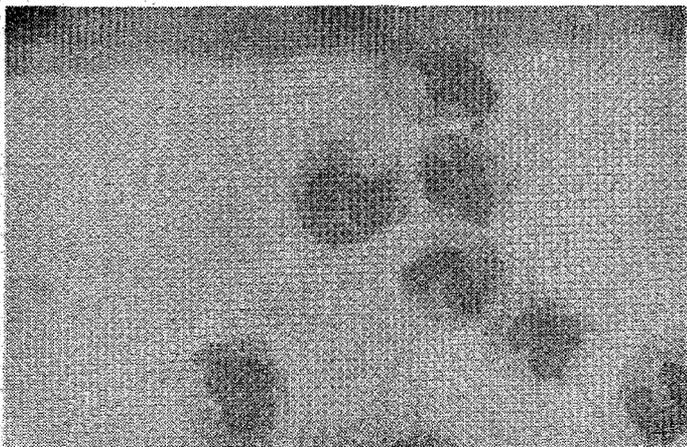


Fig. 25 Leucocitos polimorfonucleares. Aumento 400 X.

ETAPA III

METODO DEL CLORURO DE AMONIO 0.83%

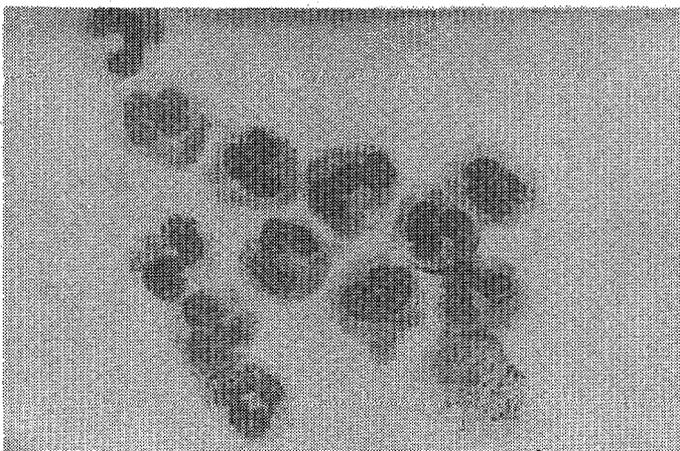
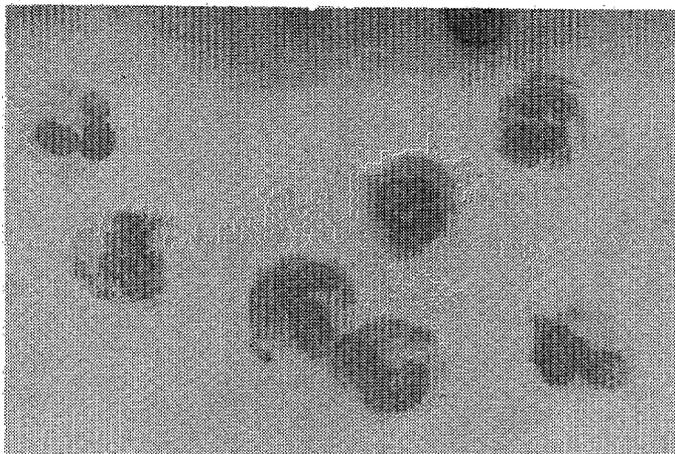


Fig. 26 Leucocitos PMN obtenidos mediante el método del cloruro de amonio 0.83%. Aumento 400 X.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los leucocitos son una valiosísima herramienta experimental y son un tejido humano accesible; sin embargo para trabajar con ellos es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones:

Los linfocitos constituyen una población celular heterogénea integrada por dos subpoblaciones celulares bien definida, pero ofrecen la ventaja de que los linfocitos T tienen un tiempo de vida media muy largo, del orden de años.

Por otra parte los leucocitos polimorfonucleares, pese a que tienen un tiempo promedio de vida muy corto, de aproximadamente 6 horas, son los leucocitos más numerosos y constituyen una población celular bastante homogénea, ya que el 96% de estos granulocitos son neutrófilos y en los estudios realizados hasta la fecha, no se ha informado que existan subpoblaciones de neutrófilos.

Muchos aspectos y propiedades de los leucocitos han sido sometidos a estudio para caracterizarlos de manera precisa y detallada, sin embargo en muchos casos se ha llegado a conclusiones confusas.

Las contradicciones y diferencias encontradas, pueden ser debidas en buena medida a la contaminación de otros grupos celulares por un bajo límite de resolución del método de aislamiento empleado.

El Método de Böyum para la separación de leucocitos mediante Ficoll-paque, ha sido diseñado principalmente para separar linfocitos, y secundariamente para separar otros tipos celulares como granulocitos polimorfonucleares y monocitos.

Cuando se trabaja con volúmenes de sangre pequeños los resultados de viabilidad y pureza de la preparación de linfocitos son bastante buenos, más de 90% en cada caso. Sin embargo, además de la existencia de contaminación por otros tipos celulares, como granulocitos en porcentajes menores al 5% y eritrocitos en porcentajes menores de 10%, la recuperación del total de leucocitos en la muestra de sangre inicial, es menor 36%.

En cuanto a la reproducibilidad del método, es muy importante hacer hincapié en las capacidades de los gradientes de Ficoll-paque y de Dextrán T 500, y al tipo de rotor que se debe usar.

En este trabajo resultó muy difícil reproducir las condiciones ideales para obtener resultados satisfactorios. Para trabajar con volúmenes mayores de sangre se pueden utilizar tubos de mayor diámetro, pero es muy importante conservar la misma altura del gradiente que se describe en el trabajo original, de otro modo la densidad de la muestra resulta mayor que la densidad del gradiente de Dextrán, y al sobrepasar la capacidad del gradiente se pierden las propiedades de separación. Aunque la centrifugación en gradientes de

densidad se puede realizar en un rotor de ángulo fijo, es preferible trabajar utilizando un rotor de columpio para evitar el efecto de pared (ver sección 3.3).

Otro problema que se presentó fue la excesiva contaminación por eritrocitos en las preparaciones finales. Esto se trató de solucionar mediante la aplicación de choques hipotónicos con cloruro de sodio 0.2% durante 20 segundos, pero los resultados fueron negativos pues este proceso contribuye más a la pérdida de células y las maltrataba aún más.

Debido a los resultados insatisfactorios obtenidos, a las dificultades encontradas en reproducir las condiciones de obtención descritas por Boyum, a la necesidad de lograr recuperar la mayor cantidad posible de granulocitos por cada muestra de sangre, a la imperiosa necesidad de contar con un método práctico que permitiese trabajar con volúmenes de sangre suficientemente grandes por ensayo para lograr obtener cantidades celulares adecuadas, para poder satisfacer los requerimientos de los ensayos de unión, y a la igualmente imperiosa necesidad de obtener preparaciones celulares suficientemente puras, para poder descartar variables por poblaciones celulares heterogéneas, hubo que prescindir del uso de gradientes de Ficoll-paque y Dextrán. Además, el costo de ensayo para una muestra de 100 ml de sangre es de \$31,400.00 pues estos reactivos son excesivamente caros. En julio de 1982 el costo de 250 ml de Ficoll-paque era de \$50000.00

y de 500 gr de Dextrán de \$50,000.00 y las casas representantes de estos productos en México, suspendieron la venta del Ficoll-paque por incosteable.

Se han probado diferentes métodos y solutos para separar leucocitos como procedimientos de electroforesis, distintos gradientes discontinuos de densidad, mecanismos para lisar a un tipo celular específico. Sin embargo, en este trabajo, dada la sencillez del método, se optó por lisar a los eritrocitos con solución de cloruro de amonio 0.83%, con base en los trabajos publicados por Lee *et al*, (1981); por Ruoho *et al*, (1980); y por Shimizu y Khan, (1982). Sin embargo, pese a que con este procedimiento se lisan eficazmente a los eritrocitos, los dos primeros grupos de autores emplean Ficoll-paque, y los últimos autores describen una técnica para separar leucocitos del brazo de ratones.

Estos autores informan que los leucocitos no sufren alteraciones al ser expuestos durante 30 minutos a la solución de cloruro de amonio 0.83% y que mantienen una viabilidad mayor al 90%, mientras que a los 10 minutos todos los eritrocitos quedan lisados (Shimizu y Khan, 1982), y el rendimiento celular es mucho más alto que el obtenido mediante las técnicas de gradientes de densidad descritas por Böyum.

Con el método de separación de interfases, se había logrado prescindir del Ficoll-paque, más no del Dextrán T 500.

Sin embargo la preparación final seguía siendo insatisfactoria en cuanto se puede pareciar en las tablas de resultados y en las microfotografías. Por esta razón, se optó por combinar las experiencias obtenidas con el método de separación de interfases, y combinar los primeros pasos de este método,

con los procedimientos para lisar eritrocitos con cloruro de amonio 0.83%.

De esta manera se logró prescindir del uso de Ficoll-paque y Dextrán obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a recuperación y viabilidad celular, como se puede observar en las fotomicrografías y en las tablas de resultados.

El método de cloruro de amonio 0.83% es un procedimiento alternativo para separar leucocitos polimorfonucleares. Con dicho procedimiento se ha logrado obtener una preparación celular que contiene:

- un 94% de leucocitos polimorfonucleares.
- la viabilidad celular promedio es de 90%
- en ocasiones ha permitido recuperar cerca del 50% del total de leucocitos polimorfonucleares de la sangre, brindando suficiente cantidad de proteína específica.

El empleo de la solución del cloruro de amonio 0.83%, resulta considerablemente más barato que el emplear Ficoll-paque y Dextrán, 500 gr de Cloruro de amonio cuestan \$340.00 y un ensayo con una muestra de 100 ml de sangre, no requiere más de 5 gr de cloruro de Amonio.

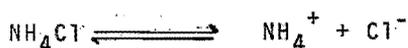
Además este reactivo se puede conseguir fácilmente en nuestro país.

Con el método de Cloruro de Amonio 0.83% descrito en este trabajo, se ha logrado obtener preparaciones con suficiente proteína específica, en buenas condiciones de pureza y viabilidad, por lo que se propone que este método puede ser muy útil. Sin embargo, es muy importante hacer notar que si bien

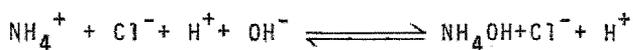
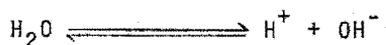
existen experiencias y trabajos anteriores al presente, en los cuales se informa de la eficiencia de la solución del cloruro de amonio 0.83% para lisar selectivamente a los eritrocitos, es necesario cuantificar y determinar con mayor precisión la selectividad de esta acción lisadora del cloruro de amonio, es decir, si efectivamente no altera de alguna manera a los leucocitos polimorfonucleares.

En la literatura consultada no se encontró una explicación del mecanismo por el cual la solución del cloruro de amonio 0.83% lisa a los eritrocitos.

Sin embargo, se sabe que al disolver cloruro de amonio en agua, las moléculas se disocian de acuerdo a la siguiente reacción:



Con el agua se encuentran iones hidrógeno y iones hidróxido, ocurre que:



El hidróxido de amonio es un electrolito débil, y por tanto en agua no tiende a disolverse y se conserva como tal. Los iones cloruro de hidronio no forman ácido clorhídrico, puesto que el ácido clorhídrico es un electrolito fuerte, así que en agua el catión H^+ y el anión Cl^- tienden a quedar como tales.

Al haber menos iones hidroxilo disponibles, el excedente de hidrógeno provoca un cambio de pH. Esta es la causa de que

esta disolución en vez de tener un pH=7, como era de esperarse, tenga pH inferior a 7, es decir, es una solución ácida (Morris, 1974).

Aunque la membrana del eritrocito es libremente permeable a los iones cloruro, en condiciones normales la concentración de iones cloruro, dentro de las células es solamente del 70% de la que está presente en el plasma sanguíneo. Esta asimetría entre las concentraciones de los aniones móviles cloruro, puede atribuirse al efecto de Donnan-Gibbs, puesto que dentro de eritrocito hay una gran concentración de iones de proteínas a los cuales la membrana no es permeable. (Morris, 1974). De estos proteínatos, la principal debe ser la hemoglobina, pues corresponde a un tercio del peso seco del eritrocito.

Por lo tanto, la lisis de los eritrocitos puede deberse entonces a dos causas:

- 1.- Variaciones en el pH del medio que provocarían alteraciones en la conformación de las proteínas estructurales del eritrolema.
- 2.- Entrada masiva de iones cloruro al interior de los eritrocitos.

Además de corroborar la selectividad de esta acción lizadora del cloruro de amonio, también es recomendable realizar más ensayos para corroborar si el tiempo de exposición de las células al cloruro de amonio que se propone en este trabajo,

es el óptimo. Estas determinaciones se proponen por la varia bilidad encontrada en los resultados de recuperación (ver ta bla de resultados de la etapa III). De esta manera se pre-
tende lograr que el método sea reproducible y confiable.

Cóviene también precisar si la solución de Cloruro de Amonio tiene otros componentes que pudieran interactuar con las células aisladas.

La viabilidad de los leucocitos PMN se evaluó mediante la prueba de exclusión del colorante azul tripano; pese a que la determinación del porcentaje de viabilidad celular median-
te esta técnica es comunmente aceptada se puede argumentar, que mediante este método no se está valorando adecuadamente a la viabilidad de las células. Estudios posteriores emplean-
do técnicas de cultivo de tejidos pueden ayudar a evaluar es-
te aspecto de manera más satisfactoria.

Los ensayos para determinar la actividad de la adenil-ci-
clasa mediante la generación de AMP ciclico suelen formar par-
te de los protocolos de investigaciones sobre adrenoceptores
y también pueden ser considerados como un índice de la viabi-
lidad celular (Boxer *et al*, 1980; Galant, *et al*, 1980/a y b Davies,
y Lefkowitz, 1980; Williams *et al*, 1976).

Por otra parte, hay que mencionar que existe un problema
aún abierto, que tiene el método de obtención planteado en
este trabajo, y que es muy importante. Este problema consis-
te en que si bien se efectuaron estimaciones de la recupera-
ción de leucocitos polimorfonucleares, no se ha evaluado cuan
titativamente y de manera más objetiva el rendimiento de leu

cocitos PMN de la sangre; así que para solucionarlo es necesario cuantificar el rendimiento de granulocitos, en mg de proteína o en número de células por mililitro de sangre una vez obtenida la preparación libre de eritrocitos. Como se puede deducir, este punto está muy relacionado con el aspecto de la lisis selectiva de la solución del cloruro de amonio 0.83% mencionada en el párrafo anterior y puede ayudar a reducir el volumen de la muestra, para extraer la cantidad mínima de sangre.

Para que la preparación de leucocitos polimorfonucleares obtenida mediante el procedimiento del cloruro de amonio 0.83% sea más pura, es posible evitar la contaminación con membranas de otros tipos celulares que ya han sido lisados mediante "lavados" repetidos del paquete celular con solución amortiguadora.

Para los ensayos con receptores, es especialmente recomendable hacer varios lavados celulares hasta que la preparación sea suficientemente pura porque la sola presencia de membranas de otros tipos celulares puede conducir a falsos resultados de poblaciones heterogéneas de adrenoceptores. Para este tipo de ensayos es necesario que en la preparación final no queden más que células enteras de un solo tipo, y que se extraigan las membranas de otros tipos celulares.

Como este método de aislamiento de leucocitos polimorfonucleares se desarrolló para poder estudiar posteriormente los adrenoceptores beta de estas células, es importante hacer ciertas consideraciones con respecto a dicho estudio de

los adrenoceptores beta de los leucocitos. Analizando de manera global las investigaciones recientes realizadas para estudiarlos, se puede concluir que si bien han brindado mucha información al respecto, es necesario que en investigaciones futuras:

- 1.- Se determine y caracterice satisfactoriamente tanto el número como la afinidad de los adrenoceptores beta en cada uno de los grupos de leucocitos. Es decir, de finir las características y propiedades de los adrenoceptores beta de cada grupo de leucocitos, porque como se ha mencionado anteriormente, es muy probable que los adrenoceptores de cada grupo de leucocitos presenten características propias. De esta manera se contará con un grupo control cuyos parámetros estén definidos. También es importante determinar qué intervalos de variabilidad son aceptables en condiciones normales, ya que pese a que se han realizado numerosas investigaciones para caracterizar a los adrenoceptores beta de los leucocitos, tanto linfocitos como PMN, de personas normales sanas, existe gran disparidad y confusión entre los informes de los distintos grupos de investigadores.

En este sentido, es muy recomendable trabajar con los leucocitos polimorfonucleares, en especial con los neutrófilos, por las características mencionadas con anterioridad.

- 2.- Definir qué parámetros producen modificaciones en los adrenoceptores beta de los leucocitos polimorfonucleares, para tener un control de variables adecuado. Dentro de estos parámetros deberá corroborarse si el cloruro de amonio 0.83% no altera a los adrenoceptores beta de estos leucocitos.

Una vez establecido un modelo bien definido en el que hayan sido adecuadamente descritos y caracterizados los adrenoceptores beta de los leucocitos polimorfonucleares, deberán compararse las hipótesis que han sido supuestas:

- que los adrenoceptores beta de estas células, son similares a los adrenoceptores beta de las células de otros tejidos.
- que los cambios observados en los adrenoceptores beta de los leucocitos son representativos de los cambios ocurridos en los adrenoceptores beta de las células de otros tejidos.

Los estudios e investigaciones futuras en los que se emplee a los leucocitos polimorfonucleares como modelo, pueden contribuir a ampliar los conocimientos sobre la modulación por neurohormonas de las funciones fisiológicas medidas por adrenoceptores, sobre los mecanismos hormonales mediante los cuales se induce la activación de la adenil-ciclasa y sobre la regulación de estos adrenoceptores en el hombre. También pueden con

tribuir para entender la relación entre modificaciones de los adrenoceptores beta y la etiología de enfermedades como la hipertensión arterial esencial, así como los mecanismos de acción de ciertos fármacos empleados en su tratamiento.

Mariana Núñez Zúñiga
Diciembre de 1983.

BIBLIOGRAFIA

- Aarons, R. and Molinoff, P., 1982. Changes in density of beta-adrenergic receptors in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *J. Pharmc. Exp. Ther.* 221:439-443.
- Birnie, G.D.; Rickwood, D., 1978. *Centrifugal Separations in Molecular and Cell Biology*. Butterworth Ed. London.
- Blank, I. 1980. Spontaneous production of mediators by mononuclear human blood cells. *Allerg. Immunol.* 26:62-8.
- Bourne, A.R. and Melmon, K.L., 1971. Adenyl cyclase in human leukocytes: evidence for activation by separate beta-adrenergic and prostaglandin receptors. *J. Pharmac Exp. Ther.* 78:1-7.
- Boxer, L.A.; Allen, J.; Baehner, R. L., 1980. Diminished polymorphonuclear leukocyte adherence. Function dependent of release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of beta-receptors by epinephrine. *J. Clin. Invest.* 66:268-74
- Böyum, A., 1968. Separation of leukocytes from Blood and Bone Marrow. *Scand J. Clin Lab. Invest.* 21 (Suppl 97)
- Breede, O.E.; Weber, I.; Beck, K., 1982. Regulación en humanos de los receptores adrenérgicos alfa y beta. *Memorias de la 9a. reunión científica de la Soc. Intern. de Hipertensión*. Ciudad de México.
- Butta, S.K.; Bumgardner, M.K.; Scoot, U.E.; Myrup, A.E., 1981. Separation and Identification of equine leukocyte populations and subpopulations. *AM U Vet.Res.* 42:1037-9.
- Chatelain, R.; Vessey, A.; Ferrario, C., 1980. Lymphoid alterations and impaired T lymphocyte reactivity in experimental renal hypertension. *J. Lab. Clin. Med.* 95:737-47
- Cline, M.J., 1975. *The White Cell*. Ed. Harvard University Press. (Mass.USA)
- Corradi, L.; Negri, F.; Parini, A.; Partesana, N.; Finardi, G.; 1981. Decreased beta-adenoceptors in polymorphonucleates in essential hypertension. *Bool. Soc. Ital. Biol. Sper.* 15:1766-70.

- Boyum, 1982. Current Content. Nov. 8. 1982. 25:20
- Davies, A.D.; Lefkowitz, R. J., 1980, Corticosteroid-Induce differential regulation of beta-adrenergic receptors in circulating human polymorphonuclear leukocytes and mononuclear leukocytes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:599-605.
- Davies, A.D.; Lefkowitz, R.J., 1981, Agonist-promoted high affinity state of beta-adrenergic receptor in human neutrophils: Modulation by corticosteroids. J. Clin. Endocrinol. Metab. 53:703-8.
- Dulis, B.H.; Wilson, I.B. 1980. The beta-adrenergic receptor of live human polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 255:1043-8.
- Felig, P.; Baxter, J.D.; Broadus, A.E.; Frohman, L.A., 1981. Endocrinology and Metabolism, Mc. Graw Hill Book Co. USA.
- Fraser, J.; Nadeau, J.; Robertson, D.; Wood, A.J. 1981. Regulation of human leukocytes beta receptors by endogenous catecholamines; Relationship of leukocyte beta receptor density to the cardiac sensitivity to isoproterenol, J. Clin. Invest. 67:1777-84
- Galant, S.P.; Underwood, S.; Diruseti, L.; Insel, P.A., 1978/a. Characterization of High-Affinity Beta 2-Adrenergic Receptor Binding of (-) - (3H)Dihydroalprenolol to human polymorphonuclear cell particulates. Engl, J. Lab. Clin. Med. 92:613-8.
- Galant, S.P.; Duriseti, L.; Underwood, D.; Insel, P.A. 1978/b. Decreased beta adrenergic receptors on polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy. N. J. Med. 299: 933-6
- Galant, S.P.; Allred, S.J. 1980/a. Demonstration of beta-2 adrenergic receptors of high coupling efficiency in human neutrophil sonicates J. Lab. Clin. Med. 96: 15-23.
- Galant, S.P.; Allred, S.; Griffiths, R. 1980/b. Characterization of Adenylate cyclase activity in asthmatic neutrophil sonicates. Am. Rev. Respir. Dis. 122 231-8

- Galant, S.P.; Allred, S., 1981. Binding and functional characteristics of beta adrenergic receptors in the intact neutrophil. *J. Clin. Med.* 98:227-37
- Ginsberg, A.; Clutter, W; Cryer, R., 1981. Triiodothyronine-induced Thyrotoxicosis increases mononuclear leukocyte β -adrenergic receptor density in man. *J. Clin. Invest.* 67:1785-91
- Goldstein, D., 1981. Plasma norepinephrine during stress in essential hypertension. *Hypertension.* 3:551-56
- Hadden J. W.; Hadden, E.M. and Middleton, E. Jr., 1970. Lymphocyte blast transformation I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Immunol.* 1:582-595
- Hallengren, B.; Forsegren, A.; Melander, A., 1982. Influence of adrenoceptors blocking agents on lymphocyte function in vitro. *Br. J. Clin. Pharmac.* 13:543-546.
- Junqueira, L.C. y Carneiro, J., 1973. *Histología Básica*. Ed. Salvat, Ed. S.A. (Barcelona, Esp.).
- Kjeldsen, S.; Flaateh, B.; Eide, J.; Helgeland, A., Leren, P., 1981. Increased peripheral release of noradrenaline and uptake of adrenaline in essential hypertension. *Clin. Sci.* 61:215-17.
- Larsson, S.; Svedmyr, N., 1976. Development of "resistance" in beta adrenergic receptors of asthmatic patients. *Chest.* 69:478-83.
- Landman, R., 1982. El incremento en la capacidad de unión de los adrenoceptores β -2 en leucocitos mononucleares, está asociado con una disminución en las respuestas cardiovasculares mediadas por los adrenoceptores β en la hipertensión esencial. *Memorias de la 9a. Reunión Científica de la Soc. Intern. de Hipertensión. Ciudad de México.*
- Lee, T.P.; Szeffler, S.; Ellis, E.F. 1981. Beta-adrenergic receptors of human polymorphonuclear leukocytes. *Resc. Commun, Chem Pharmacol.* 31:453-62.

- Lerner, R. A.; Dixon, F.J. 1973. The Human Lymphocyte as an Experimental Animal. *Sci. Am.* 288: 82-91.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265
- Mireles, R.L. Centrifugación (en prensa).
- Mendelsohn, J.; Nordberg, J. 1979. Adenylate cyclase in tumor-derived and bone marrow derivated lymphocytes from normal donors and patients with chronic lymphocytoid leukemia. *J. Clin. Invest.* 63:1124-1132.
- Morris, J.G. 1974. *Fisicoquímica para biólogos*. Ed. Reverté, S.B. (Barcelona, España).
- Motulsky, H. J.; Insel, P.A. 1982. Adrenergic Receptors in man. *New Engl. J. Med.* 307: 18-29.
- Niaudet, P.; Beaurain, G.; Back, M.A., 1976. Differences in effect of Iso proterenol stimulation on levels of cyclic AMP in human B and T Lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 6: 834-6.
- Pharmacia Fine Chemicals. Ficol1-70.1974. Sweden.
- Pharmacia Fine Chemicals. Ficol1-paque.Sweden.
- Pharmacia Fine Chemicals, Defined polymers. Sweden.
- Roberts, M.R. 1980. Variability of results of Lymphocyte transformation assays in normal human volunteers. Responses of mononuclear leukocytes to mitogen stimulation. *Clin. Pathol.* 73: 160-4
- Ruoho, A.E.; DeClerque, J.L.; 1980. Characterization of granulocyte beta adrenergic receptors in atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66: 46-51.
- Serrano, P.A. 1981. Catecolaminas conceptos actuales. Vol. II. *Inst. Nac. Cardiología*. (Distribución limitada).
- Sheppard, J. R.; Gornes, R.; Moldow, C. F. 1977. Catecholamine hormone receptors are reduced on chronic lymphocyte leukaemic lymphocytes. *Nature.* 269: 693-5.

- Shimizu, F.; Kahn, R. 1982. Insulin radioceptor assay on Murine Splenic Leukocytes and peripheral erythrocytes. *Endocrinol.* 110:474-480
- Tohneh, J.F.; Cryer, P.E. 1980. Biphasic adrenergic modulation of beta-adrenergic receptors in man. Agonist-induced early increment and late decrement in beta-adrenergic receptor number. *J. Clin. Invest.* 65: 836-40
- Vander, A. J.; Sherman, J.H. y Luciano, D.F. 1978. *Fisiología Humana*. Mc. Graw Hill, S.A. (México).
- Watanabe, Y., Lai, R.T.; Higuchi, H.; Maeda, H.; Yoshida, H., 1981. β -adrenoceptors of human lymphocytes: Decrease in Affinity of agonist for $(-)^3$ H.H. DHA binding site by cytoplasmic fractions. *Life Sci.* 28: 1399-1405
- Weller, y Willey, R. L., 1979. *Basic Human Physiology*. D.Van. Nostrad Co. U.S.A.
- Williams, L.T.; Snyderman, R.; Lefkowitz, R.J., 1976. Identificación of β -adrenergic receptors in human lymphocytes by $(-)$ (3H) alprenolol Binding. *J. Clin Invest.* 57: 149-155.
- Williams, R.S.; Guthrow, C.E.; Lefkowitz, R.F., 1979. β -adrenergic receptors of human lymphocytes are unaltered by hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 503-505.