

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

Francisco Cardellach López

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

sucesivos: a) desplazamiento hacia el lugar de la infección; b) reconocimiento de los agentes infecciosos; c) ingestión de los mismos; d) actividad bactericida; e) digestión de los microorganismos; y f) liberación extracelular del contenido granular. Desde el punto de vista de la morfología ultraestructural

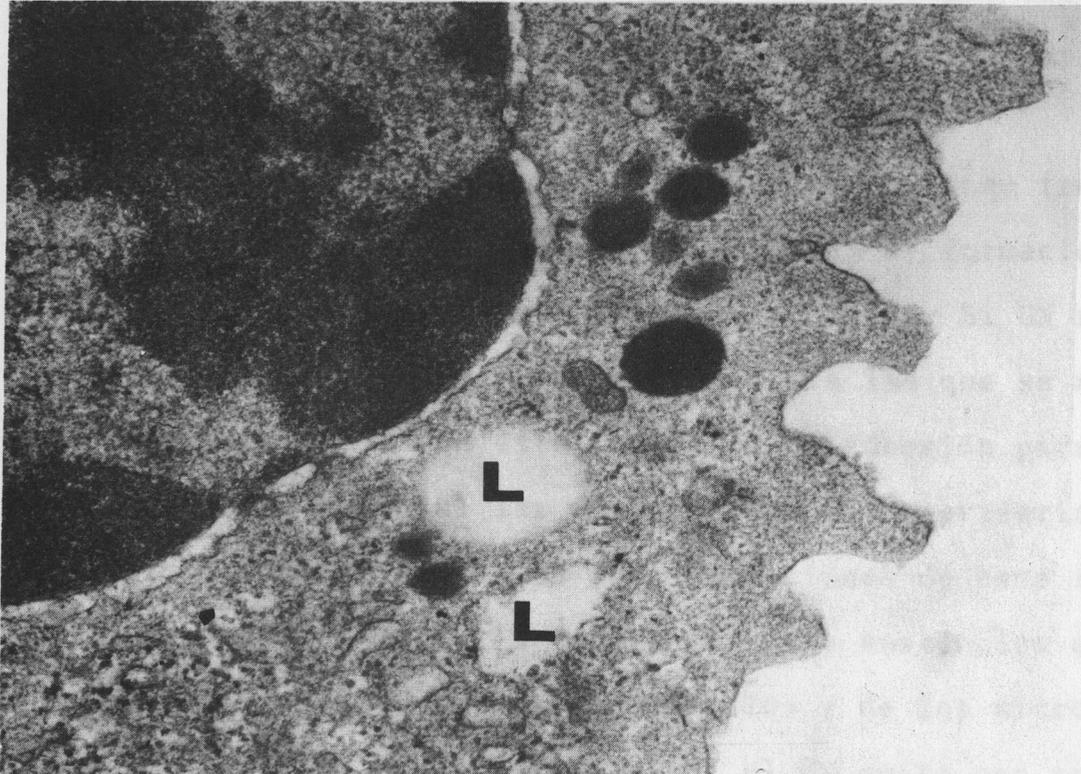


Fig. 7.- En el citoplasma de este GN se observan dos gotas lipídicas (L) que se caracterizan por carecer de membrana que las delimite. (Aumento original 50.000x)

Al MEV se comprobaban brillantemente los cambios experimentados por los GN en movimiento, a la vez que se precisaba la

sucesivos: a) desplazamiento hacia el lugar de la infección; b) reconocimiento de los agentes infecciosos; c) ingestión de los mismos; d) actividad bactericida; e) digestión de los microorganismos; y f) liberación extracelular del contenido granulocitario. Desde el punto de vista de la morfología ultraestructural, cabe estudiar los citados fenómenos en tres apartados principales:

4.3.1. Desplazamiento.- En éste, intervienen tres fenómenos principales: a) adhesión reversible; b) formación de pseudópodos y c) movimiento propiamente dicho. El GN se desplaza reptando sobre diversas superficies, a las que se adhiere de modo reversible. En esta capacidad de adhesión parecen intervenir de modo esencial las estructuras de la periferia citoplásmica, como se deduce de las alteraciones de este fenómeno causadas al tratar a los GN mediante sustancias que comprometen la integridad de los microtúbulos y de los microfilamentos (78, 87, 88). Una vez adherido, el GN emite una serie de prolongaciones o pseudópodos, los "lamellipodia" en su polo anterior y el urópodo en el posterior. La sucesión de fenómenos de adhesión y de emisión de prolongaciones conduce al desplazamiento ameboideo. En el proceso de movilización procede distinguir la que se produce al azar (88, 89) de la dirigida por sustancias químicas o quimiotaxis. En esta última, la dirección del movimiento viene determinada por un gradiente de sustancia quimiotáctica (90).

Al MEB se comprueban brillantemente los cambios experimentados por los GN en movimiento, a la vez que se precisa la

dirección seguida por estas células en el caso de la quimiotaxis. Cuando los GN son estimulados mediante un agente quimiotáctico en suspensión, su superficie muestra signos de activación en forma de proyecciones nodulares y algunos pseudópodos (91,92). Pero si los GN son estudiados al MEB durante el desplazamiento activo provocado por un gradiente quimiotáctico (Figs. 8 y 9), cabe observar cómo la mayoría de células muestran una determinada orientación, con los "lamellipodia" delante y el urópodo como cola. A la vez destaca el núcleo haciendo prominencia en la parte posterior de la célula. De cualquier modo, las imágenes varían notablemente según las condiciones del estudio (tiempo de incubación, medio empleado y otras) (90,91).

Al MET, el GN en movimiento muestra una disposición especial de sus estructuras internas, con el núcleo en su parte posterior y el citoplasma en la anterior (Fig. 10). El centriolo se sitúa en la porción citoplásmica anterior y, junto a los microtúbulos y microfilamentos contráctiles, sería el determinante principal del movimiento (80,81). El centriolo y los microtúbulos, cuya integridad parece esencial determinarían la dirección del movimiento, mientras que los microfilamentos estarían a cargo del trabajo mecánico del mismo.

4.3.2. Ingestión.- Una vez en el foco infeccioso, los GN reconocen las partículas a ingerir, lo cual consiguen probablemente mediante los receptores que asoman desde su membrana. De inmediato comienza el proceso de ingestión o fagocitosis propiamente dicha. Entre la partícula y el fagocito se crea

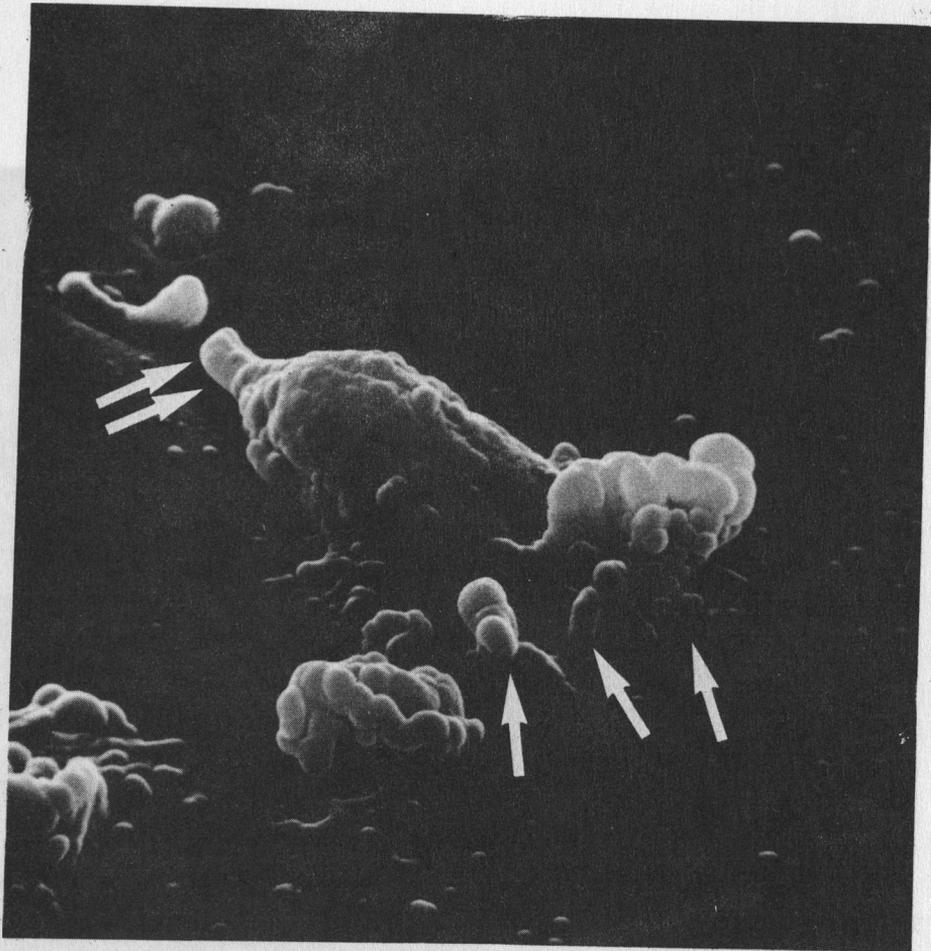


Fig. 8.- Estudio del quimiotactismo en soporte de agarosa y examen al MEB. Granulocito neutrófilo en movimiento con numerosas proyecciones en su porción anterior (flechas) y el urópodo en la parte posterior (doble flecha). (Aumento original 4.000x)

Fig. 9.- Tres GN sometidos al estímulo quimiotáctico. En todos ellos cabe advertir una gran actividad superficial. En uno de ellos, el núcleo hace prominencia en la parte posterior de la célula (flecha). (Aumento original 5.000x)

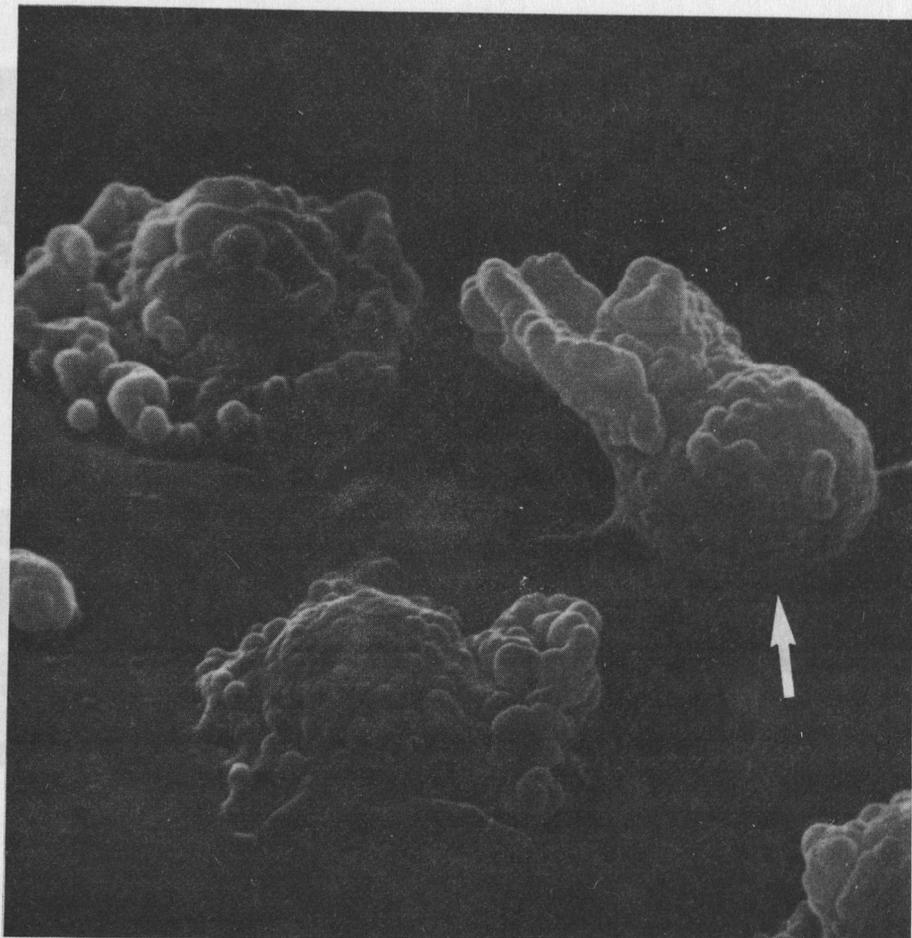
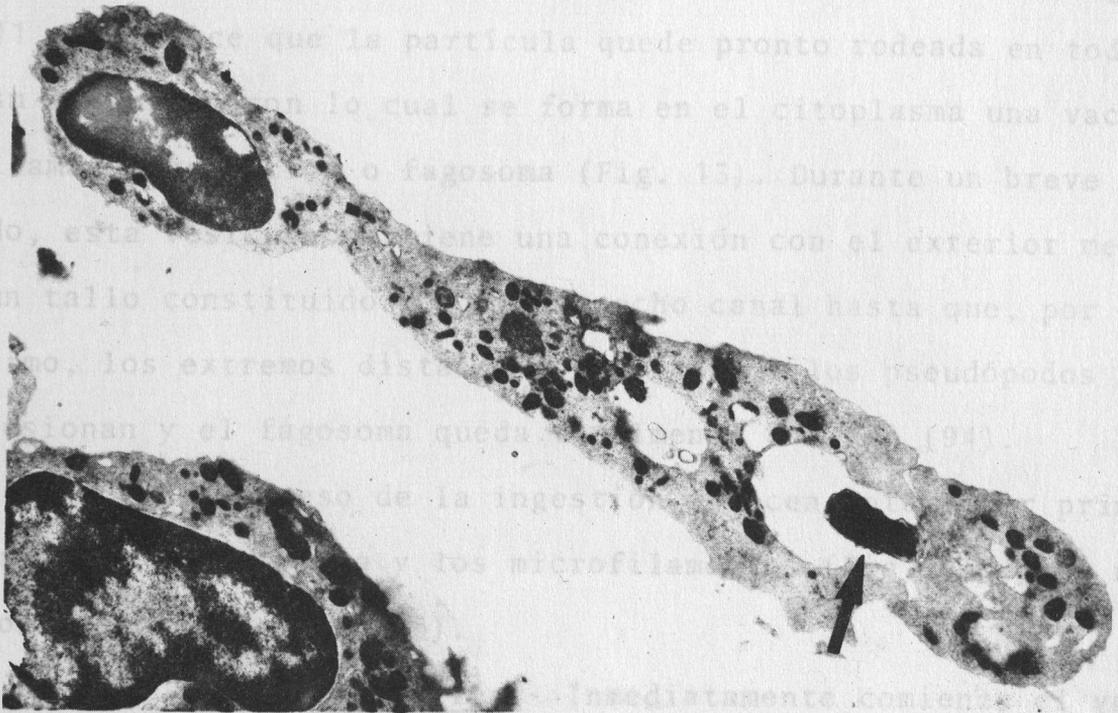


Fig. 9.- Tres GN sometidos al estímulo quimiotáctico. En todos ellos cabe advertir una gran actividad superficial. En uno de ellos, el núcleo hace prominencia en la parte posterior de la célula (flecha). (Aumento original 5.000x)

una fuerza cohesiva o adherencia que dificulta la separación entre ambos. Para que la adhesión sea completamente circunferencial, parece preciso que los puntos de unión reconocidos por los receptores recubran a la partícula del todo (95). La emisión de prolongaciones citoplásmicas o pseudópodos (Figs. 11 y 12) es que la partícula quede pronto rodeada en toda su extensión, lo cual se forma en el citoplasma una vacuola denominada fagosoma (Fig. 13). Durante un breve período, esta vacuola mantiene una conexión con el exterior mediante un tallo constituido por un pedículo central hasta que, por último, los extremos distales de los pseudópodos se fusionan y el fagosoma queda aislado (94).



Inmediatamente comienza el vaciado del contenido de los gránulos hacia el interior del fagosoma, con lo cual éste se convierte en vesícula fagocítica secundaria o fagolisosoma. A la par, como es obvio, desaparecen los gránulos citoplásmicos, o sea, se produce el fenómeno de la desgranulación. Esta es secuencial vaciándose en primer lugar

(a) Fig. 10.- Granulocito neutrófilo en movimiento que ha conseguido englobar una bacteria en el extremo anterior de su citoplasma (flecha). El núcleo se sitúa en la parte posterior. (Aumento original 10.000x).

Los gránulos específicos se vaciarían antes porque son más numerosos y por tanto contactarían al azar más fácilmente con el fagosoma, o bien, porque al ser más pequeños, se movilizarían más rápidamente, o incluso, porque las características de su membrana facilitarían un contacto más precoz, pero ninguna

una fuerza cohesiva o adherencia que dificulta la separación entre ambos. Para que la adhesión sea completamente circunferencial, parece preciso que los puntos de unión reconocidos por los receptores recubran a la partícula del todo (93). La emisión de prolongaciones citoplásmicas o pseudópodos (Figs. 11 y 12) hace que la partícula quede pronto rodeada en toda su extensión con lo cual se forma en el citoplasma una vacuola llamada fagocítica o fagosoma (Fig. 13). Durante un breve período, esta vesícula mantiene una conexión con el exterior mediante un tallo constituido por un estrecho canal hasta que, por último, los extremos distales y opuestos de los pseudópodos se fusionan y el fagosoma queda totalmente cerrado (94).

En el proceso de la ingestión parecen intervenir principalmente la membrana y los microfilamentos (Fig. 6), pero no los microtúbulos (95,96).

4.3.3. Desgranulación.- Inmediatamente comienza el vaciado del contenido de los gránulos hacia el interior del fagosoma, con lo cual éste se convierte en vesícula fagocítica secundaria o fagolisosoma. A la par y como es obvio, desaparecen los gránulos citoplásmicos, o sea, se produce el fenómeno de la desgranulación. Esta es secuencial vaciándose en primer lugar (a los 30 segundos de la ingestión) los gránulos específicos para hacerlo después (a los 2-3 minutos) los azurófilos (97). Los gránulos específicos se vaciarían antes porque son más numerosos y por tanto contactarían al azar más fácilmente con el fagosoma, o bien, porque al ser más pequeños, se movilizarían más rápidamente, o incluso, porque las características de su membrana facilitarían un contacto más precoz, pero ninguna

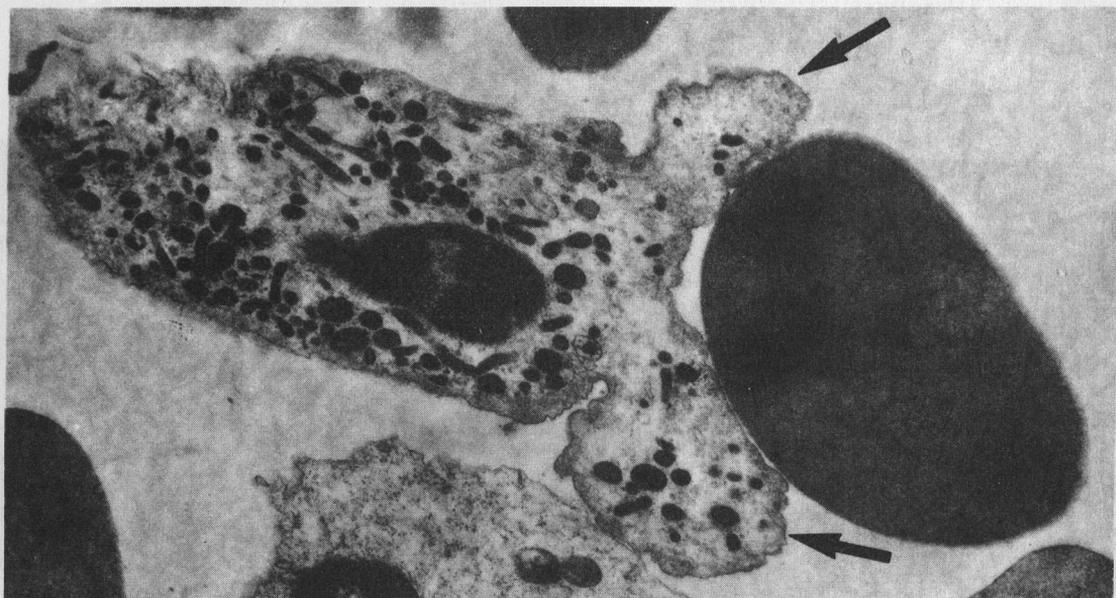


Fig. 11.- Se ilustran los fenómenos de la adhesión y proyección de pseudópodos por parte de un GN hacia un hematíe (flechas).

Fig. 12.- Los pseudópodos de este GN están próximos a fusionarse entorno a una Klebsiella (flecha). (Aumento original 7.000x)

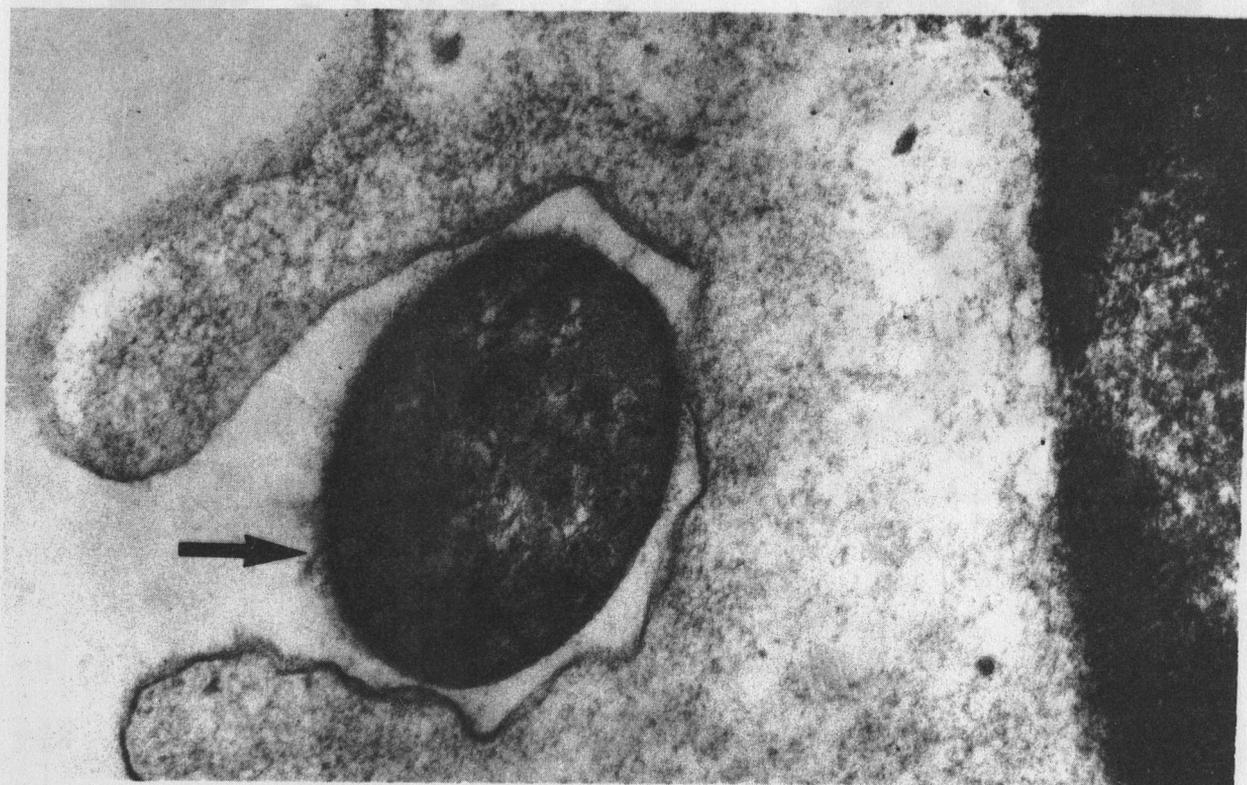
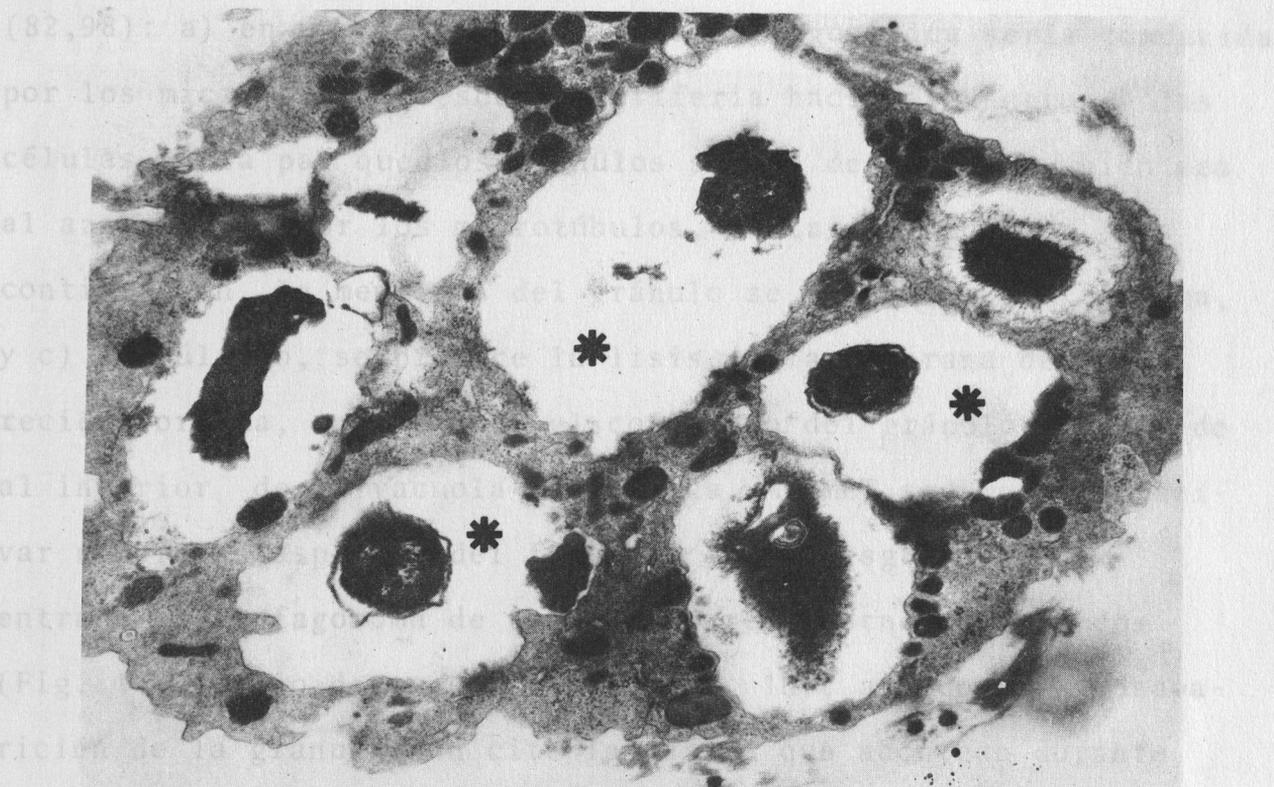


Fig. 13.- En el citoplasma de un GN se observan numerosas vacuolas fagocíticas o fagosomas (algunas señaladas con asteriscos), que contienen sendas bacterias. (Aumento original 20.000x)

Fig. 12.- Los pseudópodos de este GN están próximos a fusionarse entorno a una Klebsiella (flecha). (Aumento original 7.000x)

de estas hipótesis cuenta con una demostración concluyente.

En el fenómeno de la desgranulación y asociado en el interior del fagosoma, cabría distinguir tres fases consecutivas



la fagocitosis (Figs. 17 y 18).

Como queda ya referido, la subestructura que más influye en la desgranulación, aparte de los mismos gránulos, parecen ser los microtúbulos, mientras que la importancia de los microfilamentos en este fenómeno es probablemente menor.

Fig. 13.- En el citoplasma de un GN se observan numerosas vacuolas fagocíticas o fagosomas (algunas señaladas con asteriscos), que contienen sendas bacterias. (Aumento original 20.000x)

4.4.1. Quimiotactismo.- El movimiento es una propiedad fundamental del GN, que puede manifestarse de dos formas

(90,91): a) Quimiotactismo o movimiento dirigido en respuesta a sustancias quimiotácticas. b) Movilidad al azar o "random", que se produce con igual probabilidad en cualquier dirección.

En la capacidad quimiotáctica intervienen un gran número de factores (Tabla I) que se analizan a continuación.

de estas hipótesis cuenta con una demostración concluyente.

En el fenómeno de la desgranulación y vaciado en el interior del fagosoma, cabría distinguir tres fase consecutivas (82,98): a) en una primera, la vacuola fagocítica sería conducida por los microtúbulos desde la periferia hacia el centro de las células, a la par que los gránulos serían desplazados, bien sea al azar o bien por los microtúbulos, hacia el fagosoma; b) a continuación, la membrana del gránulo se funde con el fagosoma, y c) por último, se produce la lisis de la membrana de unión recién formada, con lo cual el contenido del gránulo es vertido al interior de la vacuola fagocítica. Al MET se pueden objetivar numerosos aspectos del fenómeno de la desgranulación: entrada en el fagosoma de gránulos parcialmente conservados (Fig. 14, 15), o de su contenido (Fig. 16), así como la desaparición de la granulación citoplasmática que acontece durante la fagocitosis (Figs. 17 y 18).

Como queda ya referido, la subestructura que más influye en la desgranulación, aparte de los mismos gránulos, parecen ser los microtúbulos, mientras que la importancia de los microfilamentos en este fenómeno es probablemente menor.

#### 4.4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL GN

4.4.1. Quimiotactismo. - El movimiento es una propiedad fundamental del GN, que puede manifestarse de dos formas (90,91): a) Quimiotactismo o movimiento dirigido en respuesta a sustancias quimiotácticas. b) Movilidad al azar o "random", que se produce con igual probabilidad en cualquier dirección.

En la capacidad quimiotáctica interviene un gran número de factores (Tabla II) que se analizan a continuación.

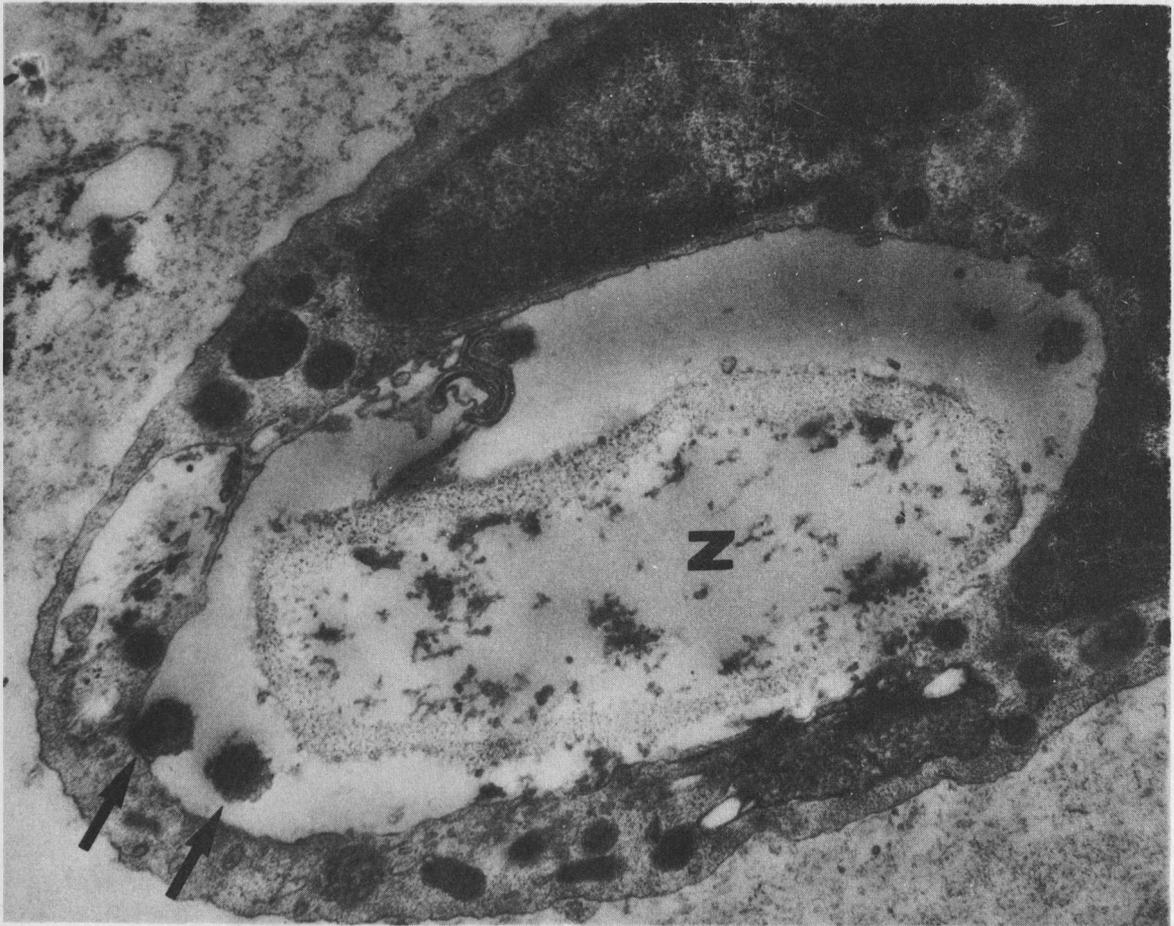


Fig. 14.- En el seno de un fagosoma se halla una partícula de zimosán (Z). Por fuera de esta partícula, pero ya en el interior del fagosoma, cabe observar dos gránulos (flechas) procedentes del citoplasma. (Aumento original 12.000x)

Con las flechas quedan señalados algunos gránulos que han penetrado en el interior del fagosoma. (Aumento original 20.000x)