

**TAMAÑO Y FRECUENCIA DE LOS GRANULOS DE LEUCOCITOS
SEGMENTADOS NEUTROFILOS, EN SANGRE PERIFERICA
DE PACIENTES CON RUBEOLA**

Selene Negrette, Rina Torrealba, Nila Romero y Américo Negrette*.

RESUMEN

Con el propósito de observar las probables variaciones de los gránulos de los segmentados neutrófilos de sangre periférica de pacientes con rubeola, se estudian mediante el microscopio electrónico tres casos de esta enfermedad y se comparan con cuatro personas sanas tomadas como controles.

Se encuentra que los gránulos son más grandes y menos frecuentes en los casos de rubeola que estudiamos, que en los leucocitos de personas normales, y que la diferencia es altamente significativa desde el punto de vista bioestadístico.

Se supone que el compromiso de los gránulos durante la lucha de los granulocitos neutrófilos contra el virus, podría explicar las alteraciones encontradas.

INTRODUCCION

Casi todos los autores conciden en que los lisosomas son particularmente grandes (11, 29, 33), en que su tamaño suele variar según la especie

*** Sección de Ultraestructura y Biología Celular, Instituto de Investigación Clínica, Apartado Postal 1151, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.**

y el tipo celular (11, 29), y en que su frecuencia suele estar relacionada con la función de la célula en general y, dentro de una misma célula, con el momento funcional (11). Por tener los lisosomas actividad digestiva, parece lógico que su tamaño y su frecuencia estén incrementados en las células que tienen función digestiva, como los macrófagos y leucocitos (11).

Son relativamente frecuentes los trabajos sobre propiedades físicas (5, 7, 26, 30), fisiología (6, 23, 31), patología (2, 14, 21, 22, 28), fisiopatología (1, 10, 17, 18, 20, 24, 34-36), morfología y bioquímica (8, 9, 11-13, 16, 19); pero son más escasas las aportaciones relacionadas con el tamaño (12, 13, 25, 29), o con valoraciones cuantitativas sobre la frecuencia de los gránulos de los segmentados neutrófilos (que para nosotros son lisosomas).

Nuestro trabajo tiene como propósito establecer los valores, tanto de tamaño como de frecuencia de los gránulos, en segmentados neutrófilos humanos normales (controles) y en granulocitos neutrófilos de pacientes con rubeola, para determinar si existen o no variaciones patológicas.

MATERIAL Y METODOS

Utilizamos sangre heparinizada de tres pacientes con rubeola en período de estado de la enfermedad (uno a cinco días de evolución), confirmados serológicamente, y de cuatro personas supuestamente normales. El material fue procesado siguiendo las técnicas tradicionales en microscopía electrónica: fijación en glutaraldehído al 3%, deshidratación con alcohol etílico a concentraciones crecientes y óxido de propileno, fijación-coloración con tetraóxido de osmio, inclusión en araldita, cortes con ultramicrotomo Porter-Blum, coloración con acetato de uranilo y citrato de plomo (32). Finalmente los cortes fueron observados con un microscopio electrónico JEM 100-B, a 80 K.V.

Para determinar el tamaño de los gránulos tanto en los granulocitos neutrófilos normales como en los de rubeola, establecimos la media del diámetro promedio de los gránulos medidos.

Luego obtenido el número total de gránulos y el total del área celular respectiva, tanto en granulocitos neutrófilos de sangre humana normal como en granulocitos neutrófilos de pacientes con rubeola, procedimos a obtener la frecuencia de los gránulos: dividimos el número total de gránulos por el área celular expresada en micras cuadradas, en cada microfotografía. Eso nos dió la frecuencia de los gránulos, que multiplicamos por 100, para referirla a cien micras cuadradas. Luego, obtuvimos el promedio de los valores de las frecuencias en las microfotografías.

RESULTADOS

Tamaño de los gránulos.— El tamaño observado en los gránulos de segmentados neutrófilos de sangre humana normal, dió una media de 228 milimicras ($m\mu$) para el diámetro promedio; con un error estándar de 3 y una desviación estándar de 66. Se midieron 579 gránulos.

En granulocitos neutrófilos de rubeola, en cambio, el promedio fue de 383 $m\mu$, con un error estándar de 12 y una desviación estándar de 144. Se midieron 150 gránulos (Tabla I).

TABLA I

DIAMETRO PROMEDIO DE GRANULOS LEUCOCITARIOS
EN MILIMICRAS LINEALES

Muestras	Promedio	Error estándar	n *	Significación
Sangre Humana Normal	228	3	579	
Rubeola	383	12	150	$p < 0.000001$

* n = Cantidad de gránulos medidos.

Frecuencia de los gránulos.— En sangre humana normal, la frecuencia de los gránulos en los neutrófilos fue de 122 gránulos por $100\mu^2$ de área celular, con error estándar de 21 y desviación estándar de 130. En total se contaron 579 gránulos.

En rubeola, el promedio fue de 24, con error estándar de 6, y desviación estándar de 32. En total se contaron 150 gránulos (Tabla II).

Es interesante señalar que mientras que en el tamaño de los gránulos, el valor promedio tiene mayor precisión en leucocitos normales que en rubeola, con la frecuencia ocurre lo contrario.

DISCUSION

Se ha afirmado que la gran heterogeneidad de los lisosomas, hace difícil determinar su tamaño con exactitud (29). A esto se une la dificultad que agrega el hecho de que las diferencias de especie, de tipo celular

TABLA II

FRECUENCIA DE GRANULOS EN CIEN MICRAS CUADRADAS

Muestra	Promedio	Error estándar	n *	Significación
Sangre Humana Normal	122	21	39	p < 0.00001
Rubeola	24	6	26	

* n = Cantidad de microfotografías revisadas.

y de momento funcional, introducen nuevos elementos de variación. Frente a las 400 m μ aproximadamente que menciona Policard (20) como diámetro medio, De Robertis (12) citando a De Duve, dá diámetros comprendidos entre 200 y 800 m μ .

Baggiolini y col. (5), trabajando con granulocitos neutrófilos provenientes de exudado peritoneal de conejo, relaciona el tamaño lisosomal con electrodensidad y contenido enzimático. Dicen que los lisosomas grandes (azurófilos, primarios) contienen el 100% de la actividad de la mieloperoxidasa, 50% a 80% de hidrolasas ácidas y 33% de lisozima. Los lisosomas pequeños, electrodensos (específicos), contienen fosfatasa alcalina y el 67% restante de lisozima. Por último, reportan partículas heterogéneas pseudolisomales, que contienen el 20% ó 50% restante de hidrolasas ácidas y poco o nada de mieloperoxidasa.

Avila y Convit (3), citando a Bainton, dicen que los gránulos específicos provenientes de la cara cóncava del Golgi, son más pequeños que los primarios (provenientes de la cara convexa). Agregan que los lisosomas de los leucocitos polimorfonucleares de conejo, descargan su contenido dentro de vacuolas fagocíticas, en secuencia: primero los específicos y luego los primarios. Y Avila (4), citando a Bainton, dice que pueden distinguirse dos grupos entre los gránulos específicos: los alargados (de 130 x 1000 m μ) y los redondeados (de 200 m μ); y entre los primarios (azurófilos) hay redondeados (500 m μ) y ovalados (300 x 900 m μ).

Koszewsky, citado por Mc Call y col. (25), hablando de las granulaciones tóxicas de los neutrófilos, afirma que representan un incremento de la actividad metabólica celular, y no una desnaturalización de gránulos (lisosomas) pre-existentes. Es sabido que, en microscopía de luz, las granulaciones tóxicas son consideradas más grandes que las normales.

Fereira y col. (15), estudiando la glándula tiroidea de ratas con dieta sobrecargada de yodo durante períodos de 2, 4, 6 y 8 semanas, encontraron aumento significativo del tamaño y la frecuencia de los lisosomas, en el grupo de 2 semanas. Los autores interpretan este incremento lisosomal como una respuesta celular a la necesidad de satisfacer la brusca demanda metabólica determinada por la dieta hiperyodada.

Mc Call y col. (25), trabajando con lisosomas de granulocitos neutrófilos humanos, llaman grandes a los que miden de 200 a 700 $m\mu$ de diámetro promedio, y pequeños a los de 150 $m\mu$ de diámetro medio; reportando un mayor grado de electrodensidad, en los lisosomas grandes.

Nosotros, que hemos obtenido para los gránulos de leucocitos segmentados humanos normales, un diámetro promedio de 228 $m\mu$, al restar o agregar a esta cifra una desviación estándar (66 $m\mu$), obtenemos respectivamente 162 y 294 $m\mu$. Lo que equivale a decir que, para la muestra que procesamos, los lisosomas de tamaño mediano varían entre 150 y 300 $m\mu$; siendo pequeños o grandes los que se encuentran, respectivamente, por debajo o por encima de estos valores.

En algunas enfermedades virales, las enzimas lisosomales leucocitarias atacan los ácidos nucleicos, además de las proteínas, destruyendo el poder infectante del virus (27). Por tanto, el aumento del tamaño de los gránulos que hemos hallado, pudiera representar un mecanismo utilizado por la célula para incrementar el aporte enzimático necesario para defenderse del virus.

La disminución de la frecuencia pudiera explicarse suponiendo que hemos encontrado los leucocitos en momentos en los cuales los gránulos ya han intervenido en el proceso. Esto puede haber determinado una degranulación leucocitaria, con pérdida de la imagen morfológica del gránulo; bien porque se hayan fusionado varios gránulos incorporando su contenido a fagosomas o vacuolas digestivas, o bien porque algunos hayan perdido su identidad al echar su contenido enzimático en vacuolas comprometidas en procesos de multiplicación o replicación del virus (27).

La diferencia de 155 $m\mu$ entre las dos muestras, es altamente significativa ($p < 0.000001$). Por lo que podemos opinar que, en estos casos de rubeola que hemos estudiado, los gránulos leucocitarios (granulocitos neutrófilos) son más grandes que los de granulocitos neutrófilos de sangre humana normal tomados como controles (Tabla I).

Mientras que en nuestros casos de rubeola encontramos un promedio de 24 gránulos por 100 micras cuadradas de área celular, en los controles

(normales) la frecuencia se eleva a 122. La diferencia de 98 gránulos, entre las dos muestras, es también estadísticamente significativa ($p < 0.00001$). Esto nos permite opinar que en la muestra de rubeola que estudiamos, la frecuencia de los gránulos de los segmentados neutrófilos (cantidad de gránulos por cien micras cuadradas de área celular), es menor que en los controles normales (Tabla II).

Podemos concluir diciendo que hemos encontrado alteraciones, probablemente patológicas, consistentes en aumento del tamaño y disminución de la frecuencia de los gránulos de los segmentados neutrófilos, en nuestros casos de rubeola.

Agradecimiento

A Manuel Arocha, Eufrosina Parra y Jesús Vivas, por su eficiente ayuda técnica; a Eduardo Añez (fotografía), Norina de Morillo, Judis de Flores y Marina Medrano (secretarías), por su importante colaboración. A Jesús Mosquera, por su ayuda en la revisión del trabajo.

ABSTRACT

Size and frequency of granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in peripheric blood of patients with rubella. *Negrette S., Torrealba R., Romero N., Negrette A. (Instituto de Investigación Clínica. Apartado Postal 1151, Maracaibo, Venezuela). Invest Clín 18(4): 177-185, 1977.*— With the purpose of studying the granules variations in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes of peripheric blood of patients with rubella, three cases of this disease are being studied through the electronic microscope and are compared with four healthy individuals taken as controls. It is found that the granules are bigger and less frequent in the rubella cases that we studied and that the difference is highly significative from the biostatistical point of view. It is supposed that the granular compromise during the leukocyte fight against the virus, could explain the alterations found.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ALLISON A: Lysosomes and Disease. *Scientific American* 217: 62-72, 1967.
- 2— ANTON E, BRANDES D: Role of lysosomes in cellular lytic processes. IV. Ultrastructural and histochemical changes in lymphoid tissue of thymectomized mice with wasting disease. *J Ultrast Res* 26: 69-84, 1969.

- 3- AVILA JL, CONVIT J: Physical properties of primary and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. *Acta Physiol Latinoamer* 23: 653-655, 1973.
- 4- AVILA JL: Lysosomes and other related cytoplasmic granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Acta Cient Venezolana* 28: 115-126, 1977.
- 5- BAGGIOLINI M, HIRSCH JG, DE DUVE C: Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation. *Cell Biol* 40: 529-541, 1969.
- 6- BJORNTORP P, BJORKERUD S, SCHERSTEN T: Subcellular fraction of human liver. *Biochem Biophys Acta* 3: 375-383, 1965.
- 7- BOREL JF, KELLER HU, SORKIN E: Studies on chemotaxis. XI. Effect on neutrophils of lysosomal and other subcellular fractions from leukocytes. *Int Arch Allergy* 35: 194-205, 1969.
- 8- CALLERIO-BABUDIERI D: Lysozyme granules and lysosome structures in cell cultures. *Nature* 212: 1274-1275, 1966.
- 9- DE DUVE C: The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect* 59: 49-87, 1963.
- 10- DE DUVE C: Functions of lysosomes. *Ann Rev Physiol* 28: 435-492, 1966.
- 11- DE DUVE C: El lisosoma. En: *La célula viva*. Villanueva JR, ed. pp. 114-123. Editorial Héroes, S.A. Madrid, 1969.
- 12- DE ROBERTIS EDP, NOWINSKI WW, SAEZ FA: *Biología Celular*, pp. 390-395. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 1970.
- 13- DINGLE JT: Vacuoles, vesicles and lysosomes. *Brit Med Bull* 24: 141-145, 1968.
- 14- DINGLE JT, BARRETT AJ: Uptake of biologically active substances by lysosomes. *Proc Roy Soc* 173: 85-93, 1969.
- 15- FERREIRA H, SULBARAN SOLIS G, NEGRETTE A: Efecto de la administración crónica de yodo en exceso, sobre el tamaño y la frecuencia de los lisosomas y gotas de coloide, en las células de la glándula tiroidea de rata. *Invest Clín* 18(2): 97-107, 1977.
- 16- FOWLER S, DE DUVE C: Digestive activity of lysosomes. III. The digestion of lipid by extracts of rat liver lysosomes. *Biol Chem* 244: 471-481, 1969.

- 17- GABATHULER NP, RYSER HJP: The digestive function of lysosomes as studied by the turnover of ingested foreign macromolecules. *Proc Roy Soc* 173: 95-98, 1969.
- 18- HEGNER D: Die wirkung von melittin auf isolierte lysosomal granule und polymorphkernige leukocyten in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg. Arch Pharmk U Exp Path* 261: 118-132, 1968.
- 19- HENNING R, STOFFEL W: Glycosphingolipid in lysosomal membranes. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 354: 760-770, 1968.
- 20- JANOFF A, SCHERER J: Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 128: 1137-1155, 1968.
- 21- KANI K, KONDO E: Studies on lysosomal response to tuberculous infection in mice. *Japan J Med Sci Biol* 21: 415-422, 1968.
- 22- KATO I, WATANAKI A: Effect of diphtheria toxin on lysosome activity in leukocytes and Ehrlich Ascites tumor cells. *J Exp Med* 40: 87-100, 1970.
- 23- KERR JFR: Liver cell defaecation: An electron microscope study of the discharge of lysosomal residual bodies into the intercellular space. *J Path* 100: 99-103, 1970.
- 24- LEIGHTON F: Isolation of lysosomes. *Acta Physiol Latinoamer* 23: 663-664, 1973.
- 25- MC CALL CH E, KATAYAMA I, COTRAN RS, FINLAND M: Lysosomal and ultrastructural changes in human "toxic" neutrophils during bacterial infection. *J Exp Med* 128: 267-293, 1969.
- 26- MISSMAHL VJP, RIETHMULLER G: Lysosomes: untersuchungen zur feinstruktur und einfacher polarisationsoptischer nachweis. *Blut Band XV* 7: 198-201, 1967.
- 27- NOVIKOFF AB, HOLTZMAN E: Estructura y dinámica celular, pp. 117-122. Nueva Editorial Interamericana, S.A. México, 1972.
- 28- PERSELLIN RH: Lysosomes stabilization by leukocyte granule membrane antiserum. *J Immunol* 103: 39-44, 1969.
- 29- POLICARD A: Células vivas y poblaciones celulares, pp. 110-115. Editorial Labor, S.A. Barcelona, 1970.
- 30- POPOV CH S: Study on the stability of lysosomes membranes. IV. Protection of liver lysosomes from the labilizing effect of chlor-

promazine with succinate and glutamate in vivo. *Biochem Pharmacol* 18: 1257-1260, 1969.

- 31- TORHORST J, RICHTER L, ROHR HP: Entwicklung und unwandlung lysosomaler funktionen unter besonderer berucksichtigung des glatten endoplasmatischen reticulum. *Virchow Arch Path Anat* 343: 64-74, 1967.
 - 32- VENABLE JH, COGGESHALL RA: Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25: 407, 1965.
 - 33- VILLEE CA: *Biología*, p. 54. Nueva Editorial Interamericana, S.A. México, 1974.
 - 34- WARD PA, HILL JH: C₅ Chemotactic fragments produced by enzyme in lysosomal granules of neutrophils. *J Immunol* 104: 535-543, 1970.
 - 35- WEISSMANN S, *Medical Progress Lysosomes*. *New Eng J* 273: 1143-1149, 1965.
 - 36- WEISSMANN S, UHR JW: Studies on lysosomes. IX. Localization of bacteriophages and thorotrast and their inflammatory properties. *Biochem Pharmacol (Suppl)* 5-17, 1968.
-