

ESTUDIO AL MICROSCOPIO ELECTRONICO, DEL TAMAÑO Y FRECUENCIA DE LOS GRANULOS DE LEUCOCITOS NEUTROFILOS, EN UN CASO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Ana Novoa de González* y Américo Negrette**

RESUMEN

Se hace un estudio mediante el microscopio electrónico, del tamaño y la frecuencia de los gránulos de leucocitos neutrófilos, en un caso de leucemia mieloide crónica y se comparan con el tamaño y la frecuencia de los gránulos neutrófilos de sangre humana normal.

Se encontró, en los leucocitos leucémicos, aumento de tamaño y disminución de la frecuencia, en comparación con los leucocitos neutrófilos de sangre humana normal, siendo la diferencia, altamente significativa desde el punto de vista bioestadístico.

INTRODUCCION

Los lisosomas son organelos intracelulares que varían de tamaño y frecuencia, de acuerdo con el tipo celular, la especie y el estado funcional (10). Han sido estudiados a través de los años desde diferentes puntos de vista; y es así como, a partir del estudio de homogeneizados de hígado de rata, se logró por medio de procesos de centrifugación y sedimentación, separar el organelo y estudiar sus enzimas (3).

Estos organelos están limitados por una membrana y contienen enzi-

* Cátedra de Histología, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina.

** Instituto de Investigación Clínica, Apartado 1151. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

mas (19, 13, 17) que se encargan básicamente de la digestión intracelular (1, 5). Fueron descritos por primera vez por De Duve, quien los definió tanto estructural como enzimáticamente (14), denominándolos lisosomas (1, 4, 6). A partir de entonces se han estudiado intensamente dichos gránulos en leucocitos, tanto en normales como en casos patológicos. Difieren en cuanto a su morfología (19), contenido (9, 11), labilidad de membrana (1, 4), frecuencia (2, 8, 16) y tamaño (8, 12, 16), parámetros éstos que varían en diferentes estados patológicos, tales como rubeola (16), trastornos de la coagulación (14), síndrome de Chediak-Higashi (1, 20), y por efecto de drogas usadas en el tratamiento de algunas enfermedades (1, 6).

Es propósito del presente trabajo, establecer la frecuencia y tamaño de los gránulos de leucocitos neutrófilos, considerados como lisosomas (15), en un caso de leucemia mieloide crónica; para determinar si existen modificaciones patológicas significativas, con respecto a la frecuencia y tamaño de los gránulos de leucocitos segmentados neutrófilos de sangre humana normal.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizó sangre venosa heparinizada, de un paciente con leucemia mieloide crónica; y se tomaron como controles tres individuos aparentemente normales. El material fué 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 (18). Finalmente los cortes fueron observados con microscopio electrónico JEM 100-B a 80 K.V.

El tamaño de los gránulos (lisosomas) tanto en el caso de leucemia mieloide crónica como en la sangre humana normal, se determinó estableciendo la medida del diámetro promedio en milimicras.

Para determinar la frecuencia, se obtuvo el número total de gránulos y el área celular en la cual se hallaban contenidos en cada microfotografía, se dividió el número total de gránulos entre cada área celular expresada en micras cuadradas, cifras que multiplicamos por cien para referirlas a cien micras cuadradas. Luego obtuvimos el promedio de los valores de la frecuencia de los gránulos.

RESULTADOS

Tamaño Lisosomal.— En 541 lisosomas medidos en sangre humana

normal (SHN) se obtuvo un diámetro promedio de 212 milimicras ($m\mu$), una desviación estándar de 61 $m\mu$ y un rango comprendido entre 100 y 390 $m\mu$.

En 420 lisosomas medidos en leucemia mieloide crónica (LMC), se encontró un diámetro promedio de 321 $m\mu$, una desviación estándar de 101 $m\mu$ y un rango comprendido entre 140 y 720 $m\mu$ (Tabla I).

TABLA I
TAMAÑO LISOSOMAL EN MILIMICRAS LINEALES

Muestras	n	Promedio	Error Estándar	Significación
SHN	541	212	3	p < 0,000001
LMC	420	321	16	

n = número de lisosomas medidos.

La diferencia de 109 $m\mu$, entre los dos promedios resultó altamente significativa (p < 0,000001).

Frecuencia Lisosomal.— En 36 leucocitos contados en SHN se obtuvo una frecuencia promedio de 123 gránulos por 100 μ^2 , una desviación estándar de 59 y un rango comprendido entre 30 a 260 gránulos por 100 μ^2 .

En 39 leucocitos contados en LMC se encontró una frecuencia promedio de 26 gránulos por 100 μ^2 , una desviación estándar de 21 y un rango comprendido entre 3 a 85 gránulos por 100 μ^2 (Tabla II).

TABLA II
FRECUENCIA LISOSOMAL EN CIEN MICRAS CUADRADAS

Muestra	n	Promedio	Error Estándar	Significación
SHN	36	123	10	p < 0,000001
LMC	39	26	3	

n = número de áreas celulares medidas.

La diferencia de 97 gránulos, entre los dos promedios resultó altamente significativa ($p < 0,000001$).

DISCUSION

Callerio-Babudieri (4), al estudiar lisosomas de mielocitos neutrófilos tratados con lizozima, los describe como una gran cantidad de estructuras densas, redondeadas y con un diámetro de 500 $m\mu$; lo que difiere bastante de nuestra cifra de 321 $m\mu$, para los gránulos de leucocitos leucémicos (mayoritariamente mielocitos).

Leighton (13), aislando lisosomas de células de hígado de rata, los describe como vesículas de 500 $m\mu$ de diámetro, rodeadas de una membrana simple.

Fedorko (6), usando sulfato de cloroquina en pacientes con sarcoidosis, observó que en los leucocitos aparecían gránulos grandes, los cuales posiblemente eran lisosomas secundarios. Estos, en extendidos, se coloreaban rosado-morado y medían de 200 a 500 $m\mu$ de diámetro.

En el síndrome de Chediak-Higashi, supuestamente de origen viral (20), se han encontrado lisosomas anormalmente grandes e inactivos (1, 20), en los granulocitos neutrófilos. Los pacientes portadores de este síndrome mueren por lo general de infección fulminante.

Es sabido que los pacientes con leucemia mieloide crónica presentan fácil y frecuentemente procesos infecciosos que pudieran estar favorecidos por la disminución de la frecuencia de los gránulos de los leucocitos neutrófilos.

Fereira y col. (8), estudiando el tamaño y la frecuencia de los lisosomas, en células tiroideas de ratas sometidas a una dieta con exceso de yodo, hallaron que, a las dos semanas, hubo un aumento del tamaño y de la frecuencia de los lisosomas.

Negrette y col. (16), estudiando los leucocitos segmentados neutrófilos en la sangre periférica de tres casos de rubeola, encontraron aumento del tamaño y disminución de la frecuencia de los gránulos. El aumento de tamaño de los gránulos, lo interpretan estos autores, como un mecanismo utilizado por la célula para incrementar el aporte enzimático necesario para defenderse del virus.

Fereira y col. (7), estudiando los lisosomas de células tiroideas de ratas alimentadas con dieta de diferente concentración de yodo, encontraron un

aumento significativo de la frecuencia de los lisosomas en el grupo alimentado con menor aporte de yodo. Ellos piensan que la disminución del número de lisosomas pudiera estar relacionada con la disminución de la capacidad proteolítica de la célula.

Anton y Brands (2), afirman que durante la división de células de la serie mieloide se encuentran los lisosomas disminuídos o ausentes; y que el proceso de maduración celular parece estar relacionado con la acumulación de lisosomas. Por tal razón, la relativa juventud de muchos de los leucocitos leucémicos, podría explicar en parte la disminución de los lisosomas.

Además, la disminución de la frecuencia lisosomal que hemos hallado en nuestro caso, pudiera explicarse suponiendo que el leucocito se ha encontrado momentos después de combatir el proceso infeccioso, en el cual ha utilizado sus enzimas en procesos de digestión intracelular de elementos incorporados por fagocitosis, y así ha perdido su imagen morfológica; o bien que la misma entidad nosológica determine, por procesos no esclarecidos, la disminución de formación de lisosomas.

Podemos concluir diciendo que, en un caso de leucemia mieloide crónica, encontramos alteraciones probablemente patológicas, consistentes en aumento del tamaño y disminución de la frecuencia de los gránulos de los leucocitos neutrófilos.

ABSTRACT

An electron microscope study of the size and frequency of neutrophils leukocytes granules in a chronic myeloid leukemia case. *Nova-González A. (Cátedra de Histología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela), Negrette A. Invest Clín 19(4): 137-143, 1978.*— A study of the size and frequency of neutrophils leukocytes granules by electron microscope in a chronic myeloid leukemia case, compared to the size and frequency of neutrophils granules of normal human blood, was done. We found, in leukemic leukocytes, an increase in size and decrease in frequency, compared to that in neutrophils leukocytes in normal human blood; being the difference highly significative.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ALLISON A: Lysosomes are organelles of the living cell that contain digestive enzymes. They play an important part in normal life processes, and there is evidence that they are also involved in pathological ones. *Sci Amer* 217: 62-72, 1967.

- 2- ANTON E, BRANDES D: Role of lysosomes in celular lytic processes. IV. Ultrastructural and histochemical changes in lymphoid tissue of thymectomized mice with wasting disease. *J Ultrastructure Research* 26: 69-84, 1969.
- 3.- BURKE JD: *Biología Celular*. pp. 34-37 Nueva Editorial Interamericana S.A. México, 1971.
- 4.- CALLERIO-BABUDIERY D: Lysozyme granules and lysosome structures in cell culture. *Nature* 212: 1274, 1966.
- 5.- DINGLE JT, BARRETT, AJ: Uptake of biologically active substances by lysosomes. *Proc Roy Soc B* 173: 85-93, 1969.
- 6- FEDORKO M: Effect of chloroquine on morphology of cytoplasmic granule in maturing human leukocytes. An ultrastructural study. *J Clin Invest* 46: 1932-1942, 1967.
- 7- FERREIRA H, SULBARAN G, NEGRETTE A: Ultraestructura de la glándula tiroidea de ratas alimentadas con dietas de diferentes contenido de yodo. *Invest Clín* 14(2): 45-57, 1973.
- 8- FERREIRA H, SULBARAN G, NEGRETTE A: Efecto de la administración crónica de yodo en exceso, sobre tamaño y la frecuencia de los lisosomas y gotas de coloide, en las células de la glándula tiroides de rata. *Invest Clín* 18(2): 97-107, 1977.
- 9- HEGNER D: Die wirkung von Melittin auf isolierte lysosomale granule und polymorphkernige leukocyten in vitro. *Naunyn-Schmiedebergs arch. Pharmak U Exp Path* 26: 118-132, 1968.
- 10- HAM A: *Tratado de Histología*. pp. 122-128 Nueva Editorial Interamericana S.A. México, 1975.
- 11- KATO L, WATAMUKI A: Effect of Diphtheria toxin on lysosome activity in leukocytes and Ehrlich ascites tumor cells. *J Exp Med* 40: 87-100, 1970.
- 12- 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.
- 13- LEIGHTON F: Isolation of lysosome. *Acta Physiol Lat Am* 23: 663-664, 1973.
- 14- MINTZ U, DJALDETTI M, ROZENSZAJN L, PINKHAS J, DE VRIES A: Giant lysosome - like structure in promyelocytie leukemia: ultrastructural and cytochemical observations. *Biomed Express* 19(10): 426-430, 1973.

- 15- NEGRETTE A: Leucocitos: gránulos o lisosomas? Invest Clín 18 (4): 173-176, 1977.
 - 16- NEGRETTE S, TORREALBA R, ROMERO N, NEGRETTE A: Tamaño y frecuencia de los gránulos de leucocitos segmentados neutrófilos en sangre periférica de pacientes con rubeola. Invest Clín 18(4). 177-185, 1977.
 - 17- NOVIKOFF-HORLTZMAN E: Estructura y Dinámica celular. pp. 117-122. Nueva Editorial Interamericana, S.A. México, 1972.
 - 18- VENABLE JH, COGGESHALL RA: Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J Cell Biol 25: 407, 1965.
 - 19- WEISSMANN G: Lisosomes. New Eng J 273: 1.143-1.149, 1968.
 - 20- WHITE JG: Virus like particles in the peripheral blood cells of two patients with Chediak-Higashi syndrome. Cancer 19. 877, 1966.
-