



# Separación rápida de leucocitos de sangre periférica

• Cristóbal Corredor R.: Profesor Asociado, Facultad de Odontología en comisión en la Facultad de Medicina, Departamento de Morfología, Universidad Nacional, Santafé de Bogotá, D.C.,

**La obtención rápida de leucocitos de sangre periférica ha sido posible gracias al diseño y construcción de una cámara receptora (esterilizable químicamente). Inmediatamente se ha tomado la muestra de sangre anticoagulada (3 ml) con una jeringa plástica, ésta se acopla a la cámara receptora previamente llena de ficoll-hypaque. Durante la centrifugación los eritrocitos pasan lenta y gradualmente a la cámara receptora y los leucocitos quedan en la jeringa en la zona de exclusión o interfase (plasma/ficoll-hypaque). La obtención de los PBL se realiza desacoplando la jeringa de la cámara para proseguir el lavado y purificación de las células por separado, ahorrando tiempo y reduciendo en lo posible el contacto de los leucocitos con superficies adherentes o posibilidades de contaminación. El diseño de esta nueva cámara permite obtener leucocitos sin contaminación eritrocitaria y economiza tiempo para el procesamiento de muestras sanguíneas.**

## INTRODUCCION

Los leucocitos de sangre periférica PBL del bazo y nódulos linfáticos son una mezcla de varias poblaciones celulares (1, 2), las cuales se han venido separando según sus características biológicas (antígenos-receptores, enzimas) (3), biofísicas (adherentes, no adherentes, densidad, carga eléctrica de superficie, etc.), tal como lo ha demostrado Shortman (4) en murinos (5, 6). Desde el punto de vista inmunológico se estudian dos grandes grupos: linfocitos T y linfocitos B. Hoy día existen avances tecnológicos sofisticados, como la citometría de flujo la cual separa las células electrónicamente teniendo en cuenta su volumen así como uno o dos marcadores moleculares de membrana al mismo tiempo (7-9).

Se requieren técnicas de máxima seguridad en la asepsia y gran rapidez para garantizar una viabilidad celular óptima (9-11). En el presente trabajo se muestra un método simplificado para el aislamiento de leucocitos de sangre periférica, PBL, con el diseño y construcción de una cámara esterilizable para remover por centrifugación los eritrocitos en forma inmediata, dejando los leucocitos en la interfase plasma/ficoll-hypaque fácilmente separables para hacer las pruebas biológicas (12).

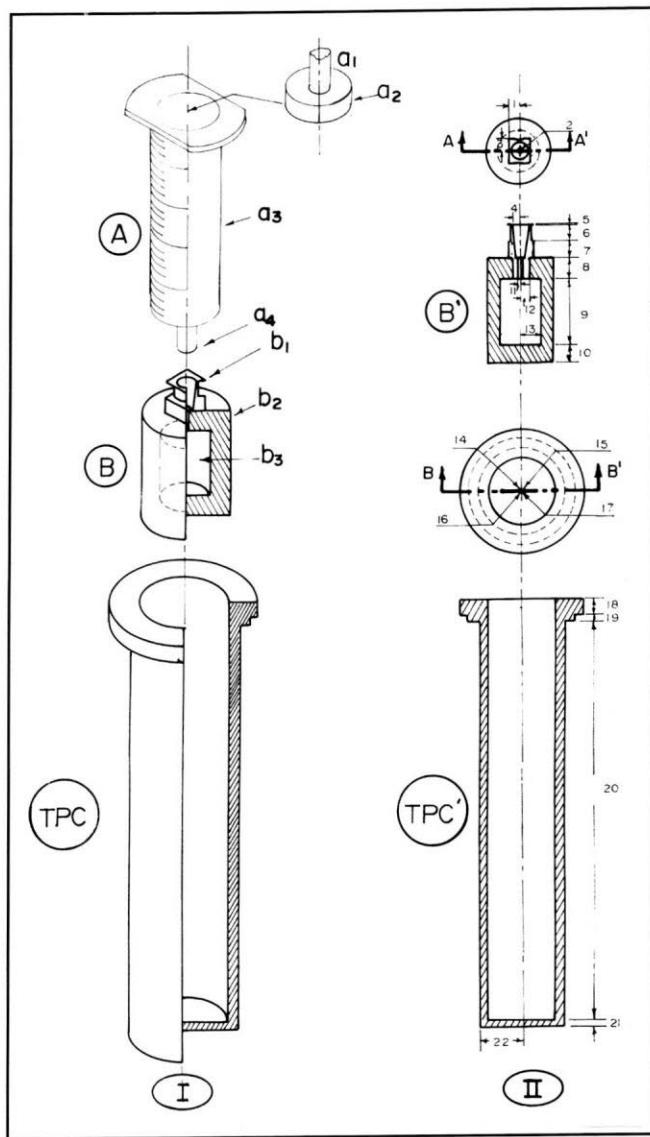
## MATERIALES Y METODOS

Se toman tres ml de sangre periférica, empleando una jeringa plástica, a3 (Figura 1-A), con émbolo de caucho. Como anticoagulante se emplean 0,2 ml de EDTA al 10%, o heparina al 0.3% La separación de las células se hace siguiendo las metodologías ya establecidas (9).

Una vez esterilizadas las cámaras, se llenan completamente con la solución de ficoll-hypaque (1,3 ml), con la ayuda de una jeringa, cuidando de no dejar burbujas de aire dentro de la cámara, b3 (Figura 1-B). La solución de ficoll-hypaque tiene una densidad de 1,077 y está compuesta de: 20 ml de hypaque sódico 50% P/V, más 6,34 g de ficoll (PM 400.000), todo disuelto en agua destilada, hasta un volumen de 100 ml.

Se acopla la jeringa (acoples a4 y b1 de la Figura 1-B) directamente a la cámara y se le remueve el portaémbolo a2. Este conjunto se introduce en el tubo porta-cámara TPC y se centrifuga empleando un rotor escualizable o de rotación horizontal (radio mínimo = siete cm, radio máximo 17 cm). Se centrifuga a 1.000 rpm por cinco minutos y luego a 2.500 rpm durante 25. Terminada la centrifugación se saca el conjunto cámara-jeringa del TPC. Los PBL quedan concentrados en la interfase ficoll-hypaque/plasma en la jeringa y se pueden extraer de dos maneras: por gravedad o por aspiración exclusiva de la capa de leucocitos, VI, en la interfase (Figura 2). Para la primera se desacopla la jeringa de la cámara y se va empujando el émbolo cuidadosamente, eliminando el máximo volumen posible de ficoll-hypaque para quedarse sólo con la capa de leucocitos los cuales se recogen en un tubo plástico y se lavan con medio de cultivo, RPMI-1.640, o solución de Hank, (HBSS).

Para extraer los leucocitos por aspiración, se inserta una aguja al émbolo de caucho para removerlo. Con la ayuda de una pipeta de plástico se toma cuidadosamente sólo la capa de leucocitos VI, (Figura 2),



**Figura. 1.** Esquemas de los componentes mecánicos para centrifugar muestras de sangre, en forma inmediata. En I: A = Jeringa de plástico transparente (3 ml), con émbolo de caucho a2. B = Cámara portacélulas (eritrocitos). TPC = Tubo parte-cámara. II. Detalles de diseño de la cámara y porta-cámara.

procurando tomar el mínimo volumen de líquido circundante interfásico, y se transfiere a tubos plásticos o placas de pozos múltiples, para ser lavados por centrifugación, cuidando de no sobrepasar la FCR mayor de 400xG.

Después de cada centrifugación se elimina el máximo posible de sobrenadante y se resuspenden las células agitando vigorosamente el tubo o placa. Al finalizar se le agregan 0,2 ml de solución lavadora. Se calcula el número de células por medio de una cámara de Newbawer, ajustando el volumen total de tal manera que una alícuota de veinte microlitros posea unas 1.000 - 2.000 células. Para ver si hay

contaminación con otro tipo de células se hace un extendido celular sobre un vidrio porta-objeto para observarlas histoquímicamente (13). Se constata la viabilidad celular observando las células con el colorante azul tripan al 0.1% en HBSS.

Una vez lavados, los leucocitos quedan listos para hacer las pruebas biológicas como las de citotoxicidad o inducción de blastogénesis por mitógenos, MLC, fitohemaglutininas (9, 14).

Recuperación de eritrocitos. Con la ayuda de una jeringa estéril (10 ml con aguja No. 18), se remueven por aspiración los eritrocitos de la cámara (b3). Se lavan con PBS-SS, pH 7.0, o con medio de HBSS para usarlos posteriormente en pruebas biológicas.

## DISCUSION

La separación física de los distintos tipos de células sanguíneas es una práctica biomédica que exige prontitud y destreza para asegurar mayor viabilidad celular. Esto es posible con el protocolo aquí descrito ya que permite que una vez obtenida la muestra de sangre, ésta pasa de inmediato a ser centrifugada.

Sólo hay que reemplazar la aguja de la jeringa por la cámara receptora o portacélulas (eritrocitos), esquematizada en la Figura 2, la cual había sido previamente llenada con la solución separadora de ficoll-hypaque. Durante la centrifugación este medio de separación, cuya densidad inicial es de 1.077, va siendo gradualmente desplazada de la cámara b3 (Figura 1-B), por la entrada gradual de los eritrocitos comenzando por los más densos.

La velocidad de entrada de estas células está determinada por dos elementos: a) La fuerza centrífuga, la cual a su vez depende de la velocidad angular de rotación (1.000- 2.500 rpm), y del radio de giro. Para fines prácticos se calcula la fuerza centrífuga relativa como:  $FCR = K \times R \times N^2 \times 10^{-5}$ ; siendo:  $K = 1,118$ ;  $R$  = radio de giro en centímetros;  $N$  = rpm. Durante la centrifugación a la velocidad máxima (2.500 rpm), la FCR para la capa superior de la sangre es de  $5162xG$ , y en el fondo los eritrocitos tienen un valor de  $12.537xG$  (Figura 2-B), (15). b) La entrada gradual de los eritrocitos a la cámara es isocórica e induce el desplazamiento del ficoll-hypaque hacia la jeringa, lo cual a su vez hace que vaya cambiando la densidad del medio separador. Los eritrocitos arrastran asociados a sus 128 - 160 micras cuadradas de superficie celular (16), solutos/solventes plasmáticos, que no pueden ser removidos por la turbulencia hidrodinámica durante la centrifugación.

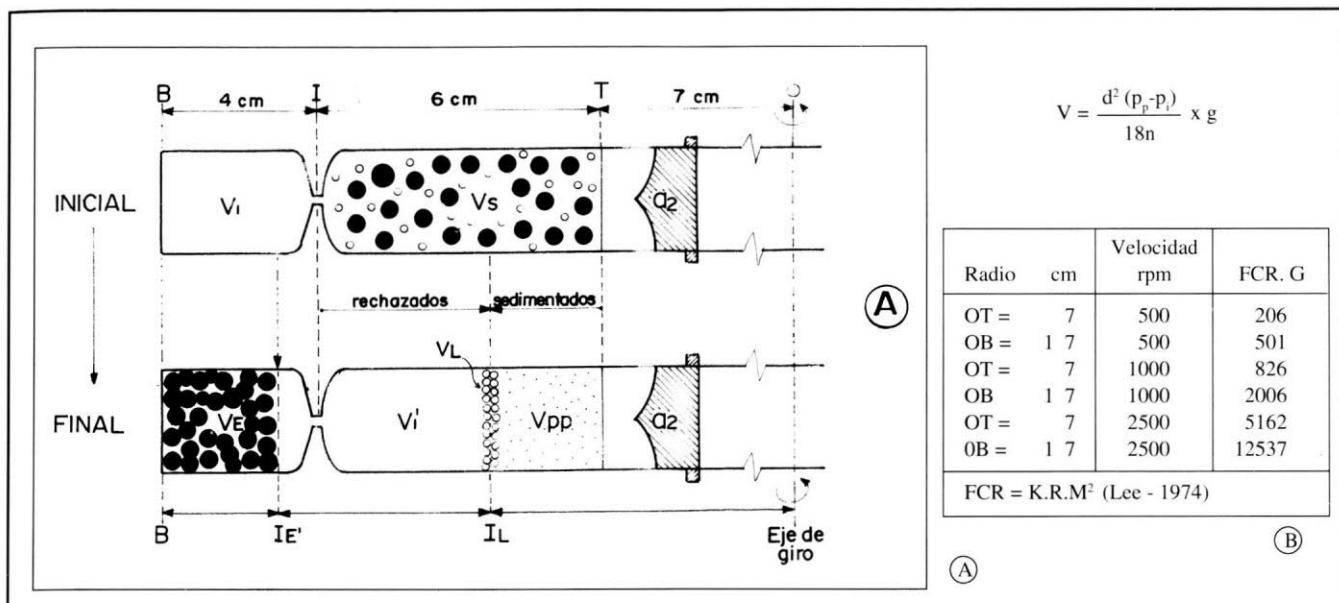


Figura 2. Dinámica celular en la separación entre eritrocitos y leucocitos de sangre periférica en gradiente discontinuo de ficoll-hypaque usando la cámara de separación celular. A = Esquema general en el que:  $V_i$  = Volumen inicial de ficoll-hypaque.  $V'_i$  = Volumen de ficoll-hypaque desplazado por los eritrocitos.  $V_E$  = Volumen de células eritrocitarias (\*).  $V_s$  = Volumen de sangre periférica inicial, (plasma, células).  $V_l$  = Volumen de células leucocitarias (o).  $V_{pp}$  = Volumen de plasma y plaquetas.  $a_2$  = Embolo de caucho. Los radios de giro OT = 9 cm; OB = 17 cm. Los eritrocitos presentes en  $V_s$  se dirigen a la cámara  $b_3$  (Figura 1-B), por acción de la fuerza centrífuga desplazando parte del volumen  $V_i$  al  $V'_i$ . La altura tanto de la interfase eritrocitaria IE, como de la interfase leucocitaria IL, depende de  $V_E$  el cual es característico de las condiciones fisiológicas de cada donante al igual que  $V_l$ . B = Valores de la fuerza centrífuga relativa, FCR, máximas y mínimas para las velocidades más frecuentes, utilizadas en la centrifugación celular, calculadas según Lee 1974, (20).

El medio ficoll-hypaque así desplazado comienza a hacer retroceder los leucocitos desde la interfase I, hasta la interfase II, a la vez que recibe por sedimentación todos los leucocitos desde T hasta II. El volumen leucocitario  $V_l$  queda en equilibrio estático en la interfase II, entre el ficoll-hypaque y el plasma/plaquetas (Figura 2).

La densidad específica que cada tipo celular posee, obedece a las relaciones físicas entre su volumen V, y su peso P, o sea D = P/V. A estos dos factores físicos, se suman las propiedades hidrodinámicas entre la topografía de las membranas plasmáticas (externas) y el medio líquido (turbulencia viscosa), distinguiéndose las interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas, interacciones salinas eléctricas, etc., todo lo cual permite diferenciar físicamente un grupo de células de otro (16, 17).

Debemos recordar que la viscosidad de la sangre sigue un comportamiento hidrodinámico no-Newtoniano y por lo tanto no sigue las leyes descritas por la ecuación de Poiseille. Esto se debe a la presencia del fenómeno de Rouleaux y a la gran flexibilidad de los eritrocitos (16).

La cámara receptora de las células ha sido diseñada para albergar en  $b_3$ , todos los eritrocitos presentes en tres ml de sangre periférica de donantes con

hematocritos normales ( $\bar{X} = 43\% \text{ v/v}$ ). Si un donante posee un  $V_E$  mayor de 43.0% se debe disminuir el volumen sanguíneo  $V_s$  (Figura 2-A), con el fin de que el  $V_E$  no sobrepase el volumen  $V_i$  de la cámara  $b_3$ . La interfase eritrocitaria IE, nunca debe superar de la altura I.

Se distinguen dos protocolos experimentales para aislar las distintas subpoblaciones celulares ya sean de sangre periférica, órganos linfáticos, bazo, aspirados de médula ósea, etc.: los que separan las células o sus fragmentos por gradientes de densidad para fines bioquímicos/químicos o de diagnóstico, y los que separan las células para cultivo *in vitro* o trasplantes isólogos o autólogos (18, 19). Se debe precisar las propiedades fisiológicas de las soluciones de separación y lavado ya que se necesita que la viabilidad celular sea óptima. Para estos protocolos existen varios compuestos químicos tales como sacarosa, glicerol, gelatina, etc., los cuales en mayor o menor grado pueden alterar la viabilidad celular. El uso del ficoll-hypaque y recientemente del percol, ha aportado considerables adelantos técnicos, ya que se pueden ajustar mejor la fuerza iónica, el pH, la presión osmótica y la viscosidad lo más cerca posible a las condiciones fisiológicas de cada tipo celular en cada especie y así garantizar que la viabilidad celular sea cercana al 100%, constatada por medio de un colorante vital, como el azul tripan.

**ABSTRACT**

Periferal Blood Leucocites, PBL, can be easily separated from Red Blood Cells (RBC), using a ficoll-hypaque density gradient. A three ml plastic syringe with 3 ml of anticoagulated periferal blood is readealy attached to the sterilized cell chamber full of a density gradient solition. This device thus assembled is centrifuged,

(500 - 2.500 rpm), for 20 minutes and the RBC are readealy separated. PBLs retained at the plasma/ficoll-hypaque interphase in the plastic syringe are isolated following standard protocols and used for clinical or biological test (HLA, microcitotoxic technique ,etc.). Details of the cell chamber are given. This procedure yields optimun PBL without other cell contaminants and can save time in skilfull hands.

**REFERENCIAS**

- 1 Moretta L, Mingari MC, A Moretta, Fanci A. Human lymphocyte surface markers. *Semin Hematol*, 1982; 19(4): 273-84.
- 2 Ellory JC, Wolowyk MW. A new density gradient technique for age separation of human erytrocyte and reticulocytes. *J Physiol*, 1979; 295: 9-10.
- 3 Ryder LP, Svejgaard A, Dausset J. Genetics of HLA disease association. *Ann Rev Gen*, 1981; 15: 169-187.
- 4 Shortman K. Physical procedures for the separation of animal cells. *Ann Rev Bioph Bioenginer*, 1972; 1: 93-130.
- 5 Giblett ER. Genetic polymorphysms in human blood. *Ann Rev Genet*, 1977; 11: 13-28.
- 6 Polliack A, Hammerling U, Lampen N, De Harven E. Surface morphology of murine B and T lymphocytes: A comparative study by scanning electron microscopy. *Eur J Immunol* 1975; 5: 32-39.
- 7 Greaves MF. Clinical aplications of cell surface markers. *Progres in Hematology*, 1975; 9: 255-305.
- 8 Allington RW, Brekke MK, Nelson JW, Aron CG, Larkins BA. Optimun conditions for high resolution gradient analysis. *An Biochem*, 1976; 73: 78-92.
- 9 Tse H, Dutton RW. Separation of Helper and Suppresor T lymphocytes on a Ficoll velocity sedimentation gradient. *J Exper Medicine* 1976; 143: 1199-1210.
- 10 Shortman K. The separation of different cell clases from lymphoid orgams. I The use of glass bead columns to separate small lymphocytes, remove damage cells and fractionate cell suspensions. *Austr J Exp Biol Med Sci* 1966; 44: 271-286.
- 11 Kraft N, Shortman K. Diferentiation of antibody-forming cells in toad spleen. *J Cel Biol* 1972; 52: 438-452.
- 12 Good RA, y DW Fisher. La interacción de los mecanismos de coagulación y los inmunológicos. En: *Inmunobiología*, Ed. Espax, Barcelona, España, 1977; 139-148.
- 13 Hayhoe FGJ and RJ Flemans. Lymphocites, Plasma Cells and their Precursors. In: *An Atlas of Haematological Cytology*; GB Garruhers, Edt.Wolfe Publishing Ltd. 1969; 212-265.
- 14 Wernet P, Kunkel HG. Demostration of specific T-lymphocyte membrane antigens associated with antibodies inhibiting the Mixed Leucocyte Culture in man. *Transplantation Proceeding*, 1973; 5(4): 1875-1881.
- 15 Pertoft H, Hirtenstein M, Kagedal L. Cell separation in a new density medium, Percol. In: *Cell Populations. Hethodological Surveys*, (B). *Biochemistry*. Ed Reid E. Edt Ellis Horweed Ltd. Chiches UK, 1979; 67-80.
- 16 Grimes AJ. Red cell shape. In: *Human Red Cell Metabolism*. London England, BlackWell Scientific Publication. 1980; 57- 85.
- 17 Altbertson PA. Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems. *Adv Proteim Chem* 1970; 24: 300-341.
- 18 Anderson WF. Human gene therapy. *Scienc* 1992; 256: 808-815.
- 19 Watkins WM. Genetics and biochemistry of some human blood groups. *Proc Roy Soc Lond B*, 1976; 202: 31-53.
- 20 Lee LW. Centrifuges. In: *Elementary Principles of Laboratory Instruments*, Edt. Saint Louis USA, The C.V. Mosby Co. 1974; 220-224.