

FOSFATASA ACIDA LEUCOCITARIA TARTRATO RESISTENTE COMO MARCADOR DE LA TRANSFORMACION DEL MONOCITO EN MACROFAGO

VICTOR J. GRIGNASCHI, MONICA AIXALA, MARIA DE LUJAN CALCAGNO

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Se investigó la presencia de la 5^o isoenzima de la fosfatasa ácida leucocitaria tartrato resistente (FATRE) en los monocitos de sangre periférica humana en 32 muestras: 26 normales, 4 plaquetopenias, 1 anemia y 1 tricoleucemia. Se empleó el separador celular Cobe Spectra Versión 4 en 3 muestras y en las demás se obtuvo la concentración celular por centrifugación sin y con partículas de látex, para estudiar monocitos y macrófagos, respectivamente. Empleando el Kit Sigma para las dos reacciones de fosfatasa ácida total y de FATRE, se demostró la presencia de dos poblaciones de monocitos, una minoritaria para FATRE y otra negativa. Con la adición de látex los monocitos se transformaron en macrófagos haciéndose fuertemente positivos para FATRE. En consecuencia se concluye que la FATRE debe desempeñar un papel principal en la función macrofágica y por ende en la inmunidad celular humana.

Abstract *Leukocyte tartrate-resistant acid phosphatase as marker for the transition of monocyte to macrophage.* The presence of the 5^o isoenzyme of leukocyte tartrate-resistant acid phosphatase (FATRE) was investigated in human peripheral blood monocytes in 32 samples: 26 normal, 4 thrombocytopenia, 1 anemia and 1 hairy cell leukemia. The Cobe Spectra Version 4 cell separator was used for 3 samples while the others were obtained by centrifugation with or without latex particles in order to study macrophages and monocytes, respectively. Using a Sigma Kit for both total acid phosphatase and FATRE reactions, the presence of two monocyte populations was detected, one slightly positive and the other negative for FATRE. Upon the addition of latex particles, the monocytes were transformed into intensely FATRE positive macrophages. It can be concluded that FATRE must play an important role in macrophage function and consequently in human cell immunity.

Key words: monocytes, macrophages, leukocyte tartrate-resistant acid phosphatase, cell immunity

En 1991 fue comunicado en el Congreso de la Sociedad Argentina de Hematología de Mar del Plata, el hallazgo de la Quinta Isoenzima de la Fosfatasa Ácida Leucocitaria (Tartrato Resistente: FATRE) en un determinado porcentaje de monocitos de la sangre periférica de 50 personas normales, estableciéndose la existencia de dos poblaciones monocitarias respecto a la isoenzima¹.

Con la intención de confirmar estos hallazgos, en el actual trabajo se repitieron las determinaciones de esta isoenzima sobre monocitos circulantes de controles normales y de pacientes con algunas patologías extramonocitarias y en monocitos inducidos *in vitro* a la macrofagia, por el agregado e incubación con partículas de látex.

Material y métodos

Se extrajo sangre venosa a 26 sujetos normales, 4 con plaquetopenia, 1 con anemia y 1 tricoleucemia, recogiéndola en tubos con EDTA como anticoagulante, el cual no interfiere la reacción ni aun a nivel de microscopia electrónica. Parte de la sangre se destinó a la concentración de leucocitos y parte a la inducción *in vitro* de macrófagos por el agregado de partículas de látex (poliestireno), mediante la incubación a 37 °C durante 15 minutos.

La concentración leucocitaria se efectuó por centrifugación regulada a no más de 800 rpm medidos con tacómetro, durante 10 minutos. Esta condición es importante porque evita la distorsión celular que tiene lugar a velocidades mayores o prolongando el tiempo de centrifugación, lo que aglutina los leucocitos entre sí determinando un *buffy coat* cuantitativamente mayor pero que produce acúmulos celulares difícilmente disociables.

En primera instancia se aspiró el plasma de cada tubo centrifugado con pipeta plástica provista de bulbo, conservándolo para el fin que se indica a continuación. En segunda instancia se aspiró el *buffy coat* aplicando una gota por portaobjetos, diluyéndola con otra de plasma reservado del mismo sujeto y homogeneizándola con una varilla de vidrio, para extenderla a continuación de la manera corriente. Como mínimo se efectuaron cuatro extendidos por individuo. Una parte se destinó a coloración con Giemsa para reconocer la proporción de monocitos y otra se dedicó a las reacciones. La dedicada a este último fin se fijó inmediatamente en acetona purísima al

Recibido: 20-V-1998

Aceptado: 9-IX-1998

Dirección postal: Dr. Víctor J. Grignaschi, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina

Fax: 54-1-805-0712; E-mail: tezanos.pinto@roche.com.ar

60% en agua destilada enfriada entre 0 y 4° C, durante 30 segundos.

En tres oportunidades se concentró mononucleares de hemodadores sanos, Tabla 1, (números 24, 25, 26) empleándose el separador celular Cobe Spectra Versión 4, (a cargo de la Dra. Elvira Pastorino). Con este material se realizaron extendidos directos, fijación, inducción de macrófagos y reacción similar al resto de las preparaciones.

Cuando hubo que demorar la reacción citoquímica, luego de la fijación, los preparados se conservaron en heladera por plazos que no superaron las 48 horas.

Para las reacciones en sí se emplearon los kit Sigma, realizándolas por duplicado sin y con tartrato de sodio. Como contracolor se utilizó solución de verde de metilo depurada de violeta con cloroformo².

Como es sabido el kit revela la Fosfatasa Ácida Total (F.ac.T.) que comprende las siete siguientes isoenzimas: 0, 1, 2, 3a, 3b, 4 y 5 cuando no se agrega tartrato de sodio y sola-

mente la 5ª cuando se lo hace, por inhibición de todas las demás (FATRE).

Teniendo en cuenta que el diazocolorante del kit Sigma es el Fast Garnet GBC el cual determina un precipitado liposoluble, las primeras observaciones con aceite de inmersión (indispensables), por su condición de liposolvente disminuyen la intensidad de la coloración del precipitado indicador de la enzima. Para evitar este inconveniente y conservar los preparados con utilidad más prolongada, se utilizó el recurso de depositar sobre los mismos una gota de agua, cubriéndola luego con un cubreobjetos de 0.1 mm de espesor y depositando sobre él una gota de aceite de inmersión, que así no entra en contacto con el extendido y permite la reiteración de numerosas lecturas por distintos observadores. Para recuperar el preparado libre del cubreobjetos sin dañar el extendido, es suficiente introducirlo en forma vertical en un borrel o vaso de precipitación lleno de agua corriente para que en segundos el cubreobjetos se desplace al fondo del recipiente dejando indemne la extensión y lista para ulteriores observaciones.

El 100% de los monocitos circulantes es intensamente positivo a la F.ac.T. con puntaje o score de 325 ± 24.45^3 . En cambio solamente una población minoritaria lo es a la 5ª isoenzima.

Se contaron 25 monocitos por persona, registrando los positivos para la 5ª isoenzima y expresando los resultados en porcentaje, como en un trabajo anterior¹. En los casos patológicos se tomó constancia de la afección que motivó su concurrencia, la cual consta en la Tabla 1.

TABLA 1.- Monocitos circulantes FATRE positivos

Caso diagnóstico	%
Normal	8
2 Normal	8
3 Normal	24
4 Normal	12
5 Normal	6
6 Normal	24
7 Normal	24
8 Normal	36
9 Normal	50
10 Normal	20
11 Normal	12
12 Normal	30
13 Normal	16
14 Normal	54
15 Normal	30
16 Normal	10
17 Normal	40
18 Normal	68
19 Normal	36
20 Normal	20
21 Normal	38
22 Normal	30
23 Normal	40
24 Normal (separador)	50
25 Normal (separador)	38
26 Normal (separador)	62
27 Plaquetopenia	24
28 Plaquetopenia	2
29 Plaquetopenia	32
30 Plaquetopenia	26
31 Anemia	14
32 Tricoleucemia	32

Promedio: 27.69 ± 2.939

Resultados

La Fig. 1 reproduce en esquema de manera comparativa, la diferencia entre la reacción de fosfatasa ácida leucocitaria total (F.ac.T) y la de FATRE, respectivamente en los monocitos y en los macrófagos (Fig. 1)

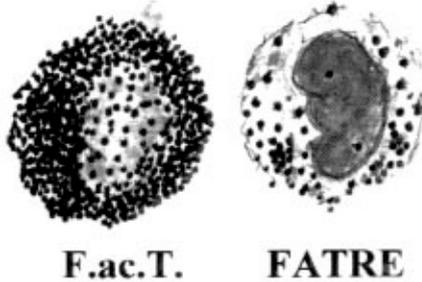
La Tabla 1 registra los porcentajes de monocitos FATRE positivos en las 32 personas indicando (cuando es necesario) la respectiva patología. Del total de concurrentes resulta la mayoría sin desviación hematológica importante (rojos, blancos, plaquetas, hematocrito, eritrosedimentación).

Como se observa en la Fig. 1, la diferencia entre las reacciones de la F.ac.T y la de FATRE es notable en los monocitos circulantes. Este hecho es indicio de la presencia de las isoenzimas totales en los monocitos, conocida desde hace años, causante de la grosera positividad en ellos de la F.ac.T., que enmascara la de la FATRE, puesta en evidencia recién en 1991 como ya se dijo. En cambio es muy pequeña en los macrófagos. Para dar una expresión matemática al hecho, ya apre-

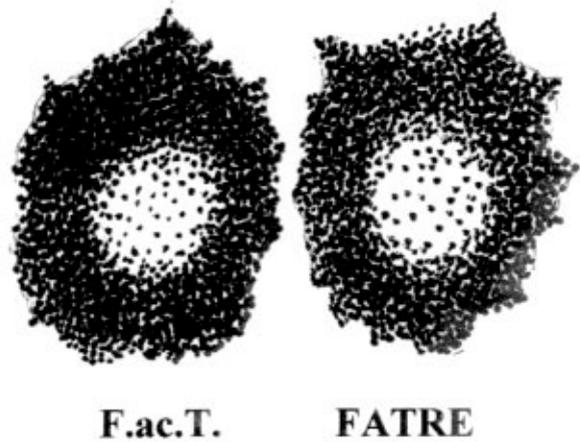
TABLA 2.- Macrófagos

Series	Reacción	Puntaje %	Reacción	Puntaje %
I	F.ac.T.	372	FATRE	342
II	F.ac.T.	354	FATRE	316
III	F.ac.T.	376	FATRE	364
IV	F.ac.T.	298	FATRE	262

MONOCITOS



MACROFAGOS



ciable al simple examen microscópico (ver Figs. 3a y b), se tabularon 4 series de 50 macrófagos con reacción de F.ac.T. y 4 de 50 con FATRE en las tres separaciones celulares mencionadas arriba y uno de concentrado por centrifugación, adjudicándoles puntaje de la manera habitual². Los resultados se aprecian en la Tabla 2.

Para el análisis estadístico se empleó el Wilcoxon Signed Ranks Test, que arrojó un $p > 0.05$, lo que demuestra ausencia de diferencia significativa entre macrófagos sometidos a las reacciones de F. ac. T. y de FATRE.

Discusión

Queda confirmada la presencia de FATRE en parte de los monocitos humanos tanto en los casos normales como en los patológicos registrados, sin discrepancia entre ellos.

Los valores obtenidos son inferiores a los referidos en un trabajo anterior¹. Puede atribuirse el hecho a diferencias entre los distintos observadores. Igualmente se registran dos poblaciones monocitarias: una en la cual es evidenciable la 5^o isoenzima y la otra (mayoritaria) en la que no lo es.

Es sabido que la última etapa evolutiva del monocito cuando sale de los vasos sanguíneos dentro de los cuales no ejerce la fagocitosis, consiste en su transformación en macrófago. Esta situación es similar cuando se trabaja *in vitro*.

En el material obtenido por concentración leucocitaria a través de centrifugación regulada o por separador celular Cobe Spectra, ante el agregado de partículas de látex e incubación se desencadena la fagocitosis en la enorme mayoría de los monocitos pero una proporción inferior al 8% permanece sin fagocitar.

La coloración con Giemsa (Fig. 2a) por su diafanidad permite apreciar con claridad (micrometrando con deli-

cadeza) la incorporación del látex por los monocitos así transformados en macrófagos, de manera mejor que luego de la reacción, la cual por su alta intensidad cubre las microsferulas en parte.

La transformación macrofágica se reconoce además por el aumento de tamaño, la coloración nuclear, su estructura de "peinada" (Bessis) a esponjosa, a veces los pseudopodios (lameliformes, filiformes, estelares, etc.) y con la reacción de FATRE por la intensa coloración que oscila entre el rojo, el granate y hasta el negro-granate con el diazocolorante Fast Garnet GBC que emplea el kit Sigma, todo ello en proporción directa con el contenido enzimático integrado en su totalidad por la FATRE, ya que las demás isoenzimas de la F. ac. T. son inhibidas por el tartrato de sodio.

Esta circunstancia hace contrastar la ausencia o baja cuantía de FATRE en los escasos monocitos no fagocitantes, que evidencian un contenido isoenzimático similar al de los circulantes, o negativo.

Estos hechos permiten relacionar el desencadenamiento de la función fagocitaria con el notable incremento de la 5^o isoenzima, en oposición con la ausencia del *burst* isoenzimático en los monocitos no fagocitantes. Sin embargo, no explica la razón por la cual ese 8% de dichos elementos no fagocita. Tal vez se trate de células desvitalizadas.

Este aspecto negativo queda lateralizado por los dos aspectos positivos más importantes que cumplen los monocitos: a) presentación de antígenos cuando circulan por los vasos; b) macrofagia fuera de ellos.

Otro punto que cabe investigar, dando por aceptado el importante aumento de FATRE en paralelo con la macrofagia y el cual se revela en el 100% de los monocitos activados a macrófagos, es la razón por la que la 5^o isoenzima se descubre solamente en parte minoritaria en los monocitos circulantes.

En consecuencia de lo expuesto se concluye que:

1. En la sangre circulante humana coexisten dos poblaciones monocitarias: una portadora de FATRE y otra sin ella, o por lo menos sin cantidad detectable.

2. Se observa coincidencia absoluta en el incremento notorio de FATRE en los monocitos al evolucionar a macrófagos.

3. El 100% de macrófagos es FATRE altamente positivo, hecho ya conocido aún cuando no se lo destaca como sucede con tricoleucocitos^{4, 5} y osteoclastos⁶ y aquí confirmado matemáticamente, con puntaje promedio de 321 sobre un máximo posible de 400.

4. De lo comprobado deriva el concepto de que la 5° Isoenzima de la Fosfatasa Ácida Leucocitaria desempeña un importante papel en la función fagocítica de los macrófagos y, por su intermedio, en la inmunidad celular humana.

Agradecimientos: En carácter de técnica colaboró Cecilia Pizarro.

Bibliografía

1. Grignaschi VJ., Maggio A, Jacquier G. Dos poblaciones monocitarias humanas diferenciables por la quinta isoenzima de la Fosfatasa Ácida Leucocitaria. Congreso Argentino de Hematología, Mar del Plata 1991; *Rev Asoc Bioq Arg* 1992; 56: 87-90.
2. Grignaschi VJ, Díaz NB, Alonso MH, Lardo MM, Lucero G. Citomorfología y citoquímica hemáticas, 2ª Ed., 1983, Buenos Aires, Editorial Britania: p 187.
3. Grignaschi VJ et al. Diagnóstico citológico de las hemopatías. Buenos Aires: Editorial Panamericana, 1991; 287-335.
4. Mover S, Li CY, Yam LT. Semiquantitative evaluation of tartrate resistant phosphatase activity of human blood cells. *J Lab Clin Med* 1972; 80: 711.
5. Yam LT, et al. Cytochemistry of tartrate resistant acid phosphatase: 15 years experience. *Leukemia* 1987; 1: 285.
6. Perkins SL, Kling SJ. Local concentration of macrophage colony-stimulating factor mediates osteoclast differentiation. *Am J Physiol* 1995; 267: E-1024-30.

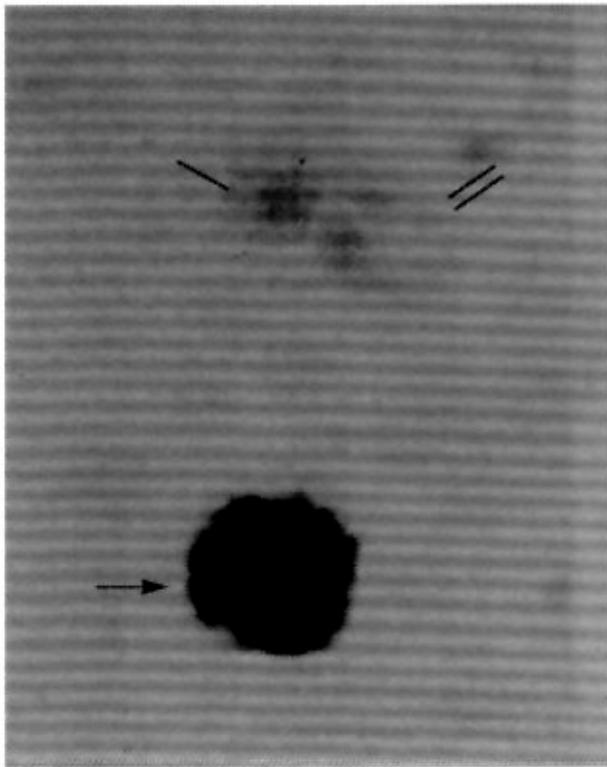
Tous les êtres qui vivent sur cette terre, quels que soient leur milieu, leur taille, leur mode de vie, qu'il s'agisse de limace, de homard, de mouche ou de girafe, tous s'avèrent composés de molécules à peu près identiques. Et même, de la levure à l'homme, persistent des groupes de molécules qui restent étroitement associées pour assurer des fonctions générales, comme la division cellulaire, ou la transmission de signaux de la membrane au noyau de la cellule.

Todos los seres que viven sobre esta tierra, sea cual sea su medio, su talla, su modo de vida, se trate de una babosa, de una langosta, de una mosca o de una jirafa, todos se componen de moléculas casi idénticas. Incluso de la levadura al hombre, perseveran grupos de moléculas estrechamente asociadas para garantizar funciones generales, como la división celular o la transmisión de señales de la membrana al núcleo de la célula.

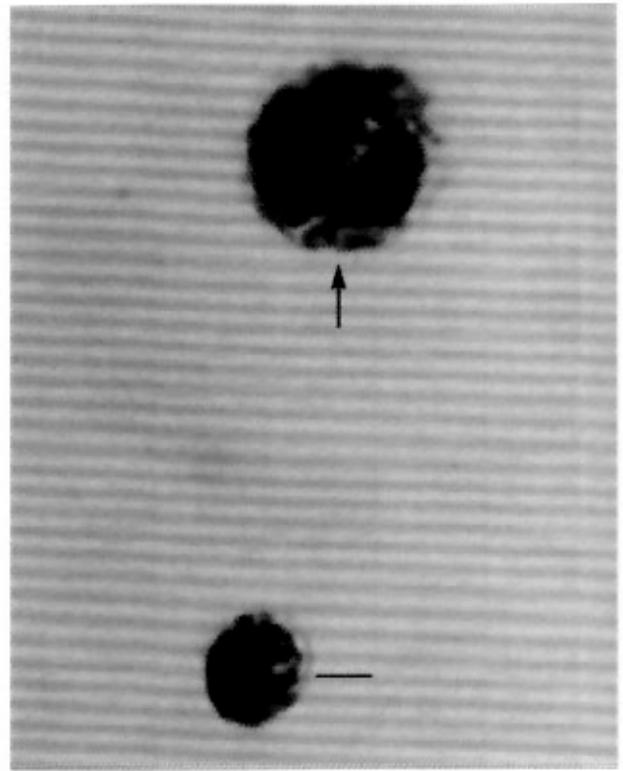
François Jacob

La souris, la mouche et l'homme. Paris: Editions Odile Jacob, 1997, p 10
(trad. *El ratón, la mosca y el hombre.* Barcelona: Crítica, 1998, p 10)

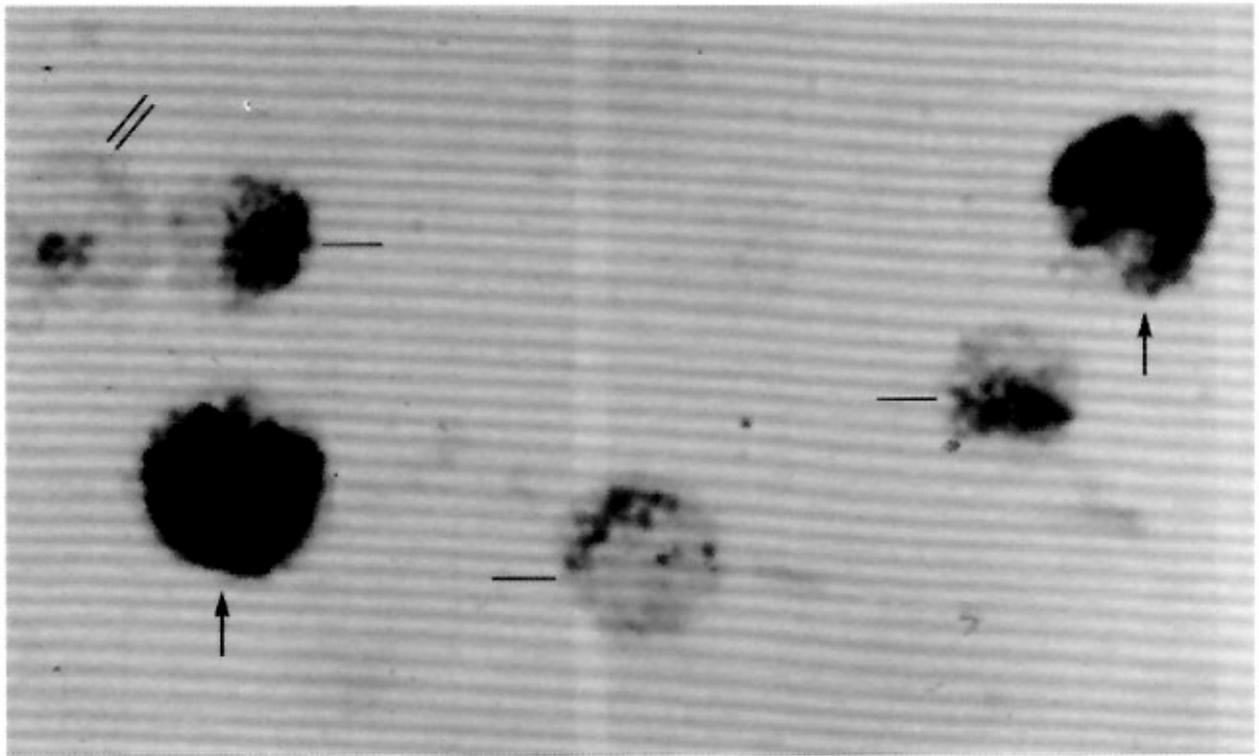
FIGURA 3



a FATRE (5ª Isoenzima). Macrófago positivo grado 4 señalado por flecha; linfocito negativo por indicador lineal simple; neutrófilo negativo, por indicador lineal doble.

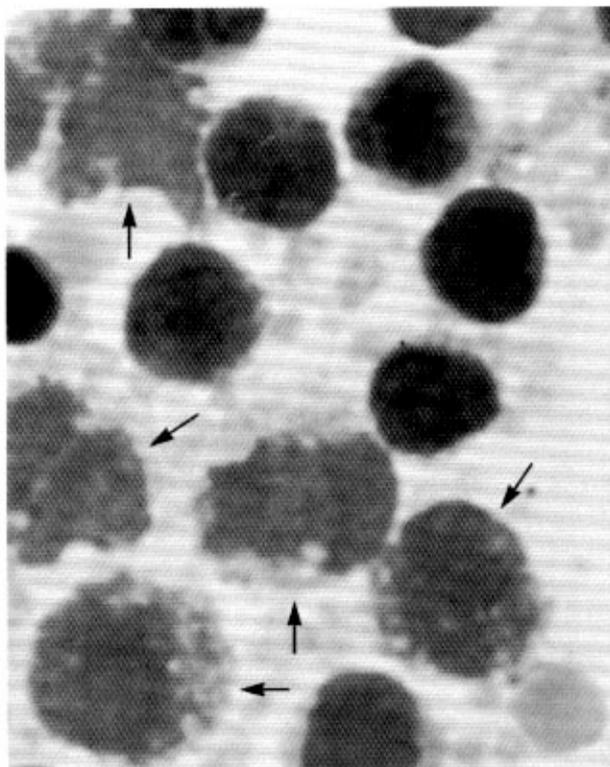


b FATRE. Macrófago positivo grado 4 señalado por flecha; monocito positivo en transformación macrófágica, por indicador lineal.

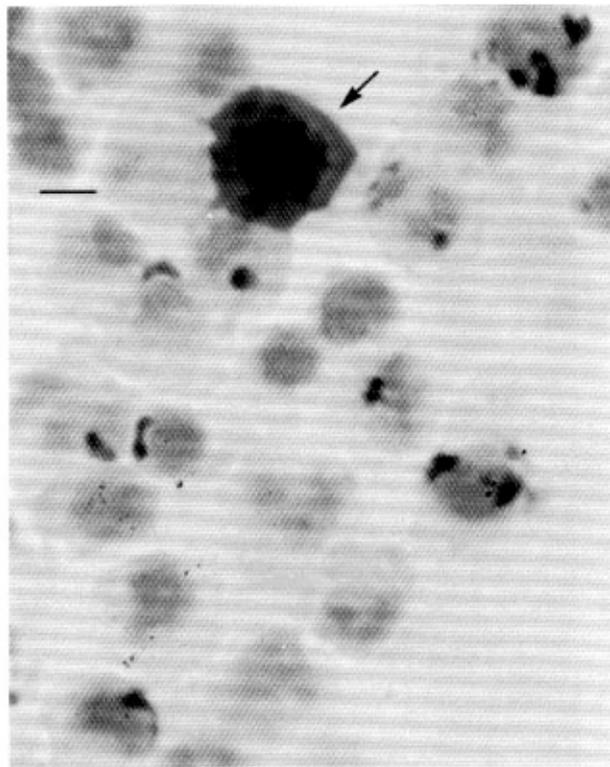


c FATRE. 2 Macrófagos grado 4, señalados por flechas y 4 monocitos positivos, tres de los cuales evolucionando a macrófagos (señalados por indicador lineal simple) y 1 no evolutivo por indicador lineal doble.

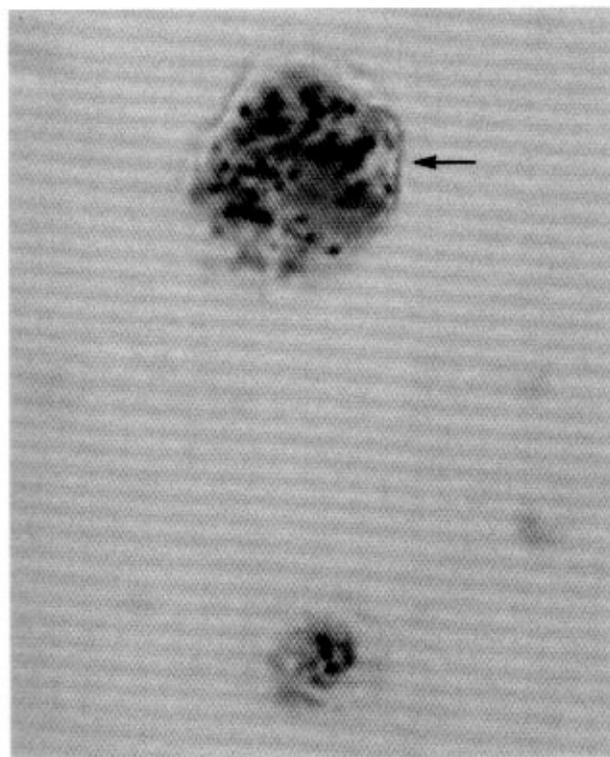
FIGURA 2



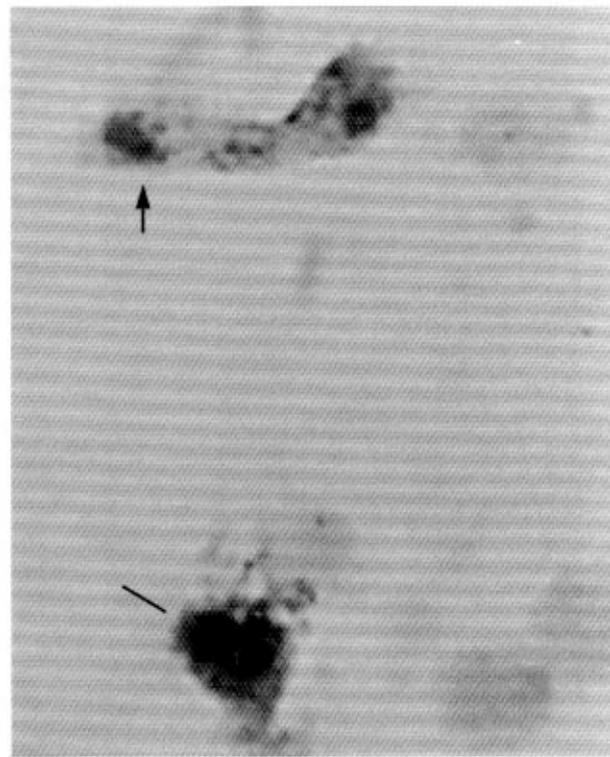
a SEPARADOR CELULAR GIEMSA 5 Macrófagos señalados por flechas muestran la fagocitosis de partículas de látex (gránulos claros). 8 Linfocitos.



b F. ac. T. (rojo oscuro) Contracolor verde de metilo. Macrófago señalado por flecha con pseudopodios filiformes. Linfocitos B negativos. Dos monocitos no fagocitantes, positivo leve difuso, señalados por indicadores lineales.



c FATRE (5-Isoenzima). Macrófago positivo grado 3 señalado por flecha. Monocito positivo.



d FATRE (5-Isoenzima). 1 Macrófago emitiendo un grosero pseudopodio que ha englobado partículas de látex en su extremo, con la reacción intensamente positiva en dicho lugar, señalado por flecha. 1 Macrófago grado 4 emitiendo pseudopodios filiformes, señalado por indicador lineal.