

Observación de células eucariontes en frotis sanguíneo

Cecilia Martínez Castillo

Facultad de Medicina. UNAM

Introducción

La célula, es la unidad estructural y funcional de los organismos vivos. Considerando los niveles de organización biológica, una célula es capaz de vivir independientemente en forma unicelular o integrarse en una organización mayor como un organismo pluricelular. Evolutivamente, estas células se diferencian como procarionte y eucarionte, dado que la complejidad celular se incrementa en la escala evolutiva. La célula como estructura, manifiesta un nivel de organización de la materia que integra todos los niveles de organización previos sobresaliendo, el nivel molecular que forma los complejos macromoleculares y supramacromoleculares, cuya organización culmina en la célula funcionalmente precisa. La complejidad de los niveles de organización se va incrementando en otros niveles como el tisular, hasta alcanzar la organización de un individuo como lo son las plantas y los animales que incluyen al hombre. La célula realiza tres tipos de funciones: la nutrición, la respiración y la reproducción.

Es un organismo unicelular, la única célula que realiza las tres funciones de forma independiente. En los organismos pluricelulares, las células se diferencian y especializan para realizar las tres funciones vitales. La nutrición comprende la incorporación de los alimentos al interior de la célula, la transformación de los mismos y la asimilación de las sustancias útiles para la estructura y metabolismo celular. Según su nutrición, las células son autótrofas y heterótrofas. Las células autótrofas sintetizan la materia orgánica necesaria a partir de la materia inorgánica del medio físico, utilizando para ello la energía química obtenida de la radiación solar. Las células heterótrofas sintetizan su materia orgánica a partir de la materia orgánica contenida en los alimentos que ingieren. La relación comprende la elaboración de las respuestas correspondientes a los estímulos captados. La relación básica de recepción de los estímulos del medio y las respuestas que las células realizan frente a esos estímulos.

La reproducción es el proceso de formación de nuevas células, a partir de una célula progenitora. Se reconocen dos formas principales, la reproducción asexual y la reproducción sexual. Considerando el conocimiento de célula eucariota en observaciones microscópicas o representaciones desarrolladas para su estudio, los esquemas de desarrollo que muestran adaptaciones estructurales que modifican la eficiencia celular en el desempeño de funciones específicas de cada estirpe celular que proviene del proceso de desarrollo durante la diferenciación celular. La estructura y funciones celulares, la transducción de señales, excitabilidad celular, regulación y expresión de la información genética ligadas a la diferenciación celular, son procesos complicados y el entendimiento de los mismos requiere la integración de conocimientos previos de biología, aprendidos durante los años 5° y 6° en Enseñanza Media Superior (EMS).

Adicionalmente, en el aprendizaje de los diferentes linajes de células y su especialización, el concepto de diferenciación celular visto como un proceso que podría explicar el flujo de la materia viva, la manipulación genética y celular, constituye un aumento progresivo del conocimiento de la complejidad estructural y funcional, en el desarrollo de los organismos incluyendo el humano.

El estudio de la célula es un tema de difícil comprensión para los alumnos de los diferentes ciclos de la EMS. Entre los problemas de comprensión se observan las deficiencias en conocimientos previos, la incomprensión de la células como unidad estructural, dificultad en la comprensión de las representaciones simbólicas que se emplean para ilustrar el proceso de construcción del aprendizaje en el aula, a pesar que se concreta en la representación de la estructura celular que debe aprender el alumno.

La dificultad en la asociación de las estructuras y subestructuras celulares con las funciones correspondientes, ya que son altamente complejas y los estudiantes no logran integrarlas dentro de una visión de conjunto que les permita comprender procesos como la respiración, la reproducción, nutrición o los mecanismos de regulación genética y la composición de los organelos [Flores *et al.*]. La amplitud del tema y los diversos niveles en los que se puede analizar. En este trabajo se utilizó el frote de sangre periférica, como una estrategia de enseñanza-aprendizaje para estudiar características comunes y diferenciales de las células eucariotas. Las propiedades morfológicas y funcionales, generales y particulares, dirigiendo el aprendizaje hacia los estándares estructurales que constituyen adaptaciones relacionadas con la especialización

Objetivo

Utilizar el frotis de sangre periférica, como una estrategia de enseñanza-aprendizaje para estudiar características comunes y diferenciales de las células eucariotas.

Material y métodos

El frotis elaborado a partir de sangre de un organismo eucariota, el ratón. Para la extracción de la muestra de sangre periférica se obtuvo una gota de sangre por corte del extremo caudal de la cola de un ratón infectado 5 días antes con una cepa de *Plasmodium yoeli yoeli*. Esta cepa es específica para ratón y produce malaria en los ratones. Alternativamente, se extrajo una muestra de sangre humana, limpiando el dedo pulgar con alcohol y haciendo una punción en la cara interna del dedo utilizando una lanceta estéril. *Plasmodium* es un parásito intracelular del eritrocito y varios de sus formas se buscaron para la observación dentro de los eritrocitos. Cuadro 2.

El frotis consistió en colocar una gota de sangre periférica en un extremo de un portaobjetos (soporte) y se extendió, utilizando otro portaobjetos (extensor), con el fin de obtener una capa delgada de sangre (Fig. 1). El portaobjetos extensor, forma un ángulo de 45° con respecto al portaobjetos soporte, asegurándose que estuvieran en contacto la superficie con el borde permitiendo que la sangre se distribuyera por capilaridad en el borde del portaobjetos. Este deslizamiento se terminó aproximadamente, a 1 cm del extremo final del portaobjetos soporte, con un movimiento ascendente respecto al portaobjetos extensor (Fig. 1). Secaron rápidamente la extensión, agitándola al aire, para que las células no se modificaran. En seguida el portaobjetos inclinado se deslizó sobre el portaobjetos horizontal en sentido contrario a donde se colocó la sangre y se dejó secar al aire.

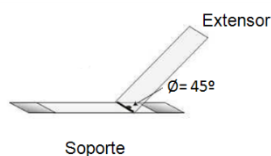


Figura 1. Distribución de los portaobjetos para realizar una extensión de sangre

La capa de sangre se fijó con metanol puro y se tiñó con un colorante específico, en este caso Giemsa, preparado en amortiguador de fosfatos dos gotas de una pipeta Pasteur en 1 ml de amortiguador. El portaobjetos se colocó conteniendo el extendido invertido sobre una placa de tinción y adicionando 1 ml del colorante. La tinción se dejó proceder durante 30 minutos, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Para evaluar las proporciones celulares presentes en la muestra se hicieron observaciones al microscopio óptico a 10X, 40X y 100 X empleando aceite de inmersión en el último objetivo.

El frotis se realizó inmediatamente después de extraer la sangre para prevenir la coagulación de la sangre fresca ya que no se utilizó anticoagulante. Cuando la muestra no se procesa durante las primeras 2 horas, se recomienda usar de anticoagulante, como ácido etilendiaminotetraacético tripotásico (EDTA) o Citrato de Sodio. Para asegurar un frote adecuado para la observación, se hicieron las siguientes consideraciones. Se prepararon los portaobjetos sumergiéndolos en una mezcla de alcohol-acetona 1:1 y se secaron con una gasa limpia. En la parte superior de la laminilla se detallaron con un marcador indeleble los datos del ratón del cual se extrajo la muestra.

El procedimiento y colorante para la tinción rápida de frotis sanguíneos se empleó como solución fijadora metanol absoluto conservado en refrigeración y tapado herméticamente para evitar el deterioro de las estructuras celulares. La solución colorante fue Giemsa (azur-eosina-azul de metileno), Merck. Para el reporte de resultados desarrollaron un cuadro de observaciones, (Cuadro 1) donde registraron la información básica relacionada con las células sanguíneas normales y las células eritrocíticas conteniendo el parásito *P. yoelii yoelii*.

Resultados

Los frotis se evaluaron antes de realizar las observaciones al microscopio y se encontraron diferentes características durante el desarrollo de las actividades. Se diferenciaron las partes que se pueden distinguir en una extensión.

1. La cabeza, que es la zona inicial de la extensión, es la región más gruesa y en ella se encuentra una mayor proporción de linfocitos, y los hematíes forman aglutinados celulares por la concentración elevada de células.
2. El cuerpo, es la zona media del frotis, el material celular es el apropiado ya que tiene una proporción equilibrada de los distintos tipos de leucocitos. Se puede identificar como la zona ideal de observación, que corresponde a la porción que coexiste con la cola.
3. La cola, es la región final de la extensión, tuvo un aspecto redondeado y correspondía a la región más fina. En esta parte del frotis se ubicaron la mayor proporción de leucocitos grandes (granulocitos y monocitos). Los eritrocitos aparecieron deformados y presentaron una tonalidad uniforme. En la porción terminal solían ser más abundantes las plaquetas.
4. Los bordes, contenían una mayor proporción de leucocitos grandes. Los frotis se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: La cabeza se localizó cerca de uno de los extremos del portaobjetos. La cola ubicada al otro extremo de la cabeza. El borde de la cola contenía una terminación difusa, diluida, o fina. Se observaron todas las extensiones finas y homogéneas que tuvieron los bordes laterales de la extensión separados de los bordes del portaobjetos por 1 mm aproximadamente de longitud. Se consideraron buenas las extensiones con una longitud de $\frac{3}{4}$ partes del portaobjetos.

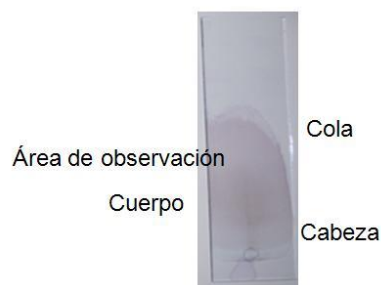


Figura 2. Estructura de un frotis.

Los frotis eliminados fueron aquellos que presentaron algún defecto de extensión, como longitud excesiva, cantidad insuficiente de muestra o longitud y/o demasiada muestra. Los errores en el desarrollo de la técnica se debieron al tamaño de la gota de sangre, así como en los cambios en la velocidad durante la extensión y/o a modificaciones en el ángulo de extensión. La presencia de escalones o estrías se debió fundamentalmente a la falta de uniformidad en el deslizamiento de la gota. La presencia de abundantes zonas redondeadas que carecen de sangre, se debió a la presencia de restos de grasa en los portaobjetos. Finalmente se descartaron los frotis con el extremo final excesivamente dentado.

Las células más abundantes fueron los eritrocitos, fueron vistas sin núcleo y se observaron de color anaranjado pálido (Fig. 4A) Los leucocitos, se identificaron por su mayor tamaño respecto a los eritrocitos y los núcleos intensamente teñidos de colores entre azul y violeta (Fig. 3). Las formas de los núcleos de los leucocitos y la coloración del citoplasma fueron importantes para su diferenciación. Las plaquetas fueron difíciles de reconocer (Fig. 3)

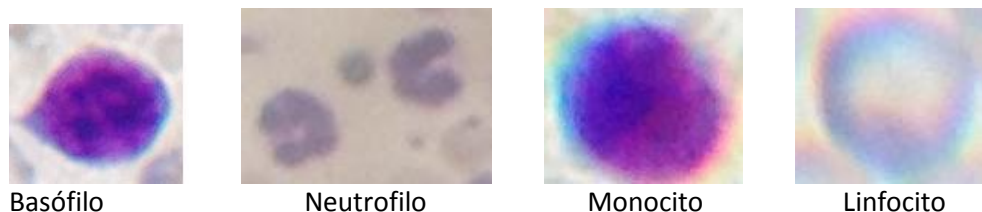


Figura 3. Diferentes linajes celulares

A pesar de que las fotografías fueron tomadas con el dispositivo móvil de telefonía, las imágenes vistas en el microscopio fueron de buena calidad y facilitaron la apreciación de las diferentes células de sangre periférica humana y de ratón, además, pudieron observar otras células eucariontes dentro de los eritrocitos infectados con *Plasmodium*. Sin embargo no se aprecia la impresión, por ello se presenta el cuadro de una referencia, ya que no se desarrolló en la estrategia. Los alumnos tuvieron mucha dificultad en la elaboración de los frotis, no es una técnica fácil y requirió de varias reproducciones para lograr un frotis que pudiera analizarse en el microscopio.

Cuadro I. Observaciones de los linajes celulares presentes en las muestras

Linaje celular	Estructura	Función Observaciones
Eritrocitos	Forma de disco bicóncavo. Sin núcleo. Transportan hemoglobina que da color rojo a la sangre.	Transporte de oxígeno y dióxido de carbono
LEUCOCITOS		
Linfocitos	Núcleo esférico que ocupa la mayor parte de la célula	Producen anticuerpos. Son responsables del rechazo de los injertos y los trasplantes.
Basófilos	Núcleo grande, dos lóbulos. Gránulos basófilos gruesos, tiñen el citoplasma de color oscuro y dificultan la observación del núcleo.	Contienen heparina (anticoagulante), e histaminas (vasodilatadores). Responsables de los cambios producidos en los vasos sanguíneos durante los procesos inflamatorios.
Eosinófilos	Nucleado, dos lóbulos. Granulados acidófilos dan una coloración rojiza al citoplasma.	Fagocitan los complejos antígeno- anticuerpo. Proliferan en las reacciones alérgicas y en las infecciones parasitarias.
Monocitos	Núcleo ovoide, en forma de herradura. Núcleo más claro que en linfocitos.	Fagocíticas. Activos al atravesar la pared de los capilares y penetrar en el tejido conjuntivo. Fagocitan sobre todo virus, hongos y protozoos.
Neutrófilos	Núcleo lobulado 3 - 5. Granulados	Fagocitosis. Pueden salir del torrente sanguíneo y penetrar tejidos para fagocitar.
Plaquetas	Son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo de células gigantes llamadas Megacariocitos originados en la médula ósea. Se observan como agregados basófilos.	Producción y propagación del coágulo.
Eritrocitos inmaduros	Color violeta, sin núcleo	Sustituyen a los eritrocitos que se están infectando en etapa temprana de la infección.
Eritrocitos parasitados	Color azul, Formas intracelulares, con núcleo color rojo. Granulaciones.	Destruyen al eritrocito. Reducción del número de eritrocitos.

Para concluir la estrategia didáctica los alumnos resolvieron un cuestionario.

- ✚ ¿Cuál es la unidad a partir de la cual están formados los organismos vivos?
- ✚ Señalar la diferencia principal entre los dos principales tipos de células.
- ✚ ¿Las células de las plantas son similares a las células de los animales?
- ✚ ¿Dónde se forman las células sanguíneas?
- ✚ ¿Qué otros componentes constituyen la sangre?
- ✚ ¿Por qué no se distingue el núcleo de los glóbulos rojos?
- ✚ La sangre también contiene glóbulos blancos, ¿cómo se observan en el frotis?
- ✚ ¿Por qué los eritrocitos se denominan también glóbulos rojos?

- ✚ ¿Cómo se diferencian las diferentes células observadas, como un leucocito, un linfocito, un eritrocito y una plaqueta?
- ✚ ¿Los eritrocitos son células carentes de núcleo, por qué se observaron estructuras en el interior de ellos? ¿A qué corresponden estas formas encontradas en el eritrocito?

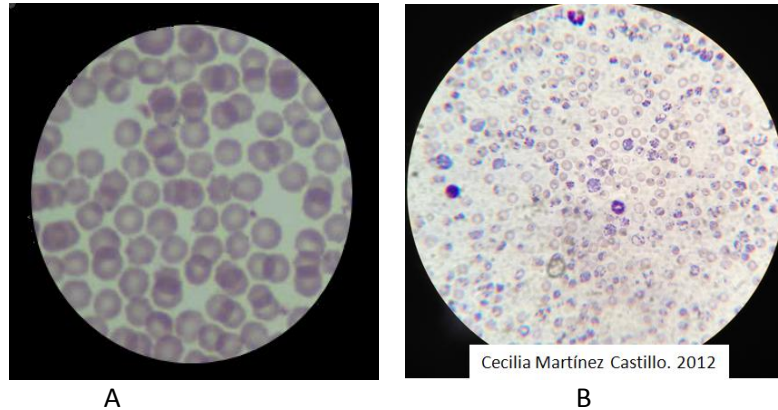


Figura 4. A. Células humanas y B. Células eritrocíticas parasitadas con diferentes formas de *Plasmodium*.

Conclusiones

























Las células observadas en los frotis fueron ejemplos claros de células especializadas, y pudo trascender en el desarrollo cognitivo de los alumnos de educación media superior. En estos casos, las características comunes de las células eucariotas y los patrones estructurales que se asociaron a la especialización y el frotis sanguíneo es un ejemplo que permitió percibir dicha especialización. En estos casos, las características comunes de las células eucariotas y los patrones estructurales que están asociados a la especialización, determinan la regularidad estructural que fue identificada en observación directa al microscopio y en las representaciones las cuales contribuyeron al aprendizaje de la célula como unidad estructural y funcional.

La sangre es un fluido que contiene una serie de células en diferente proporción y las muestras de sangre estudiadas correspondieron a sangre capilar contiene más hematíes y leucocitos y menos plaquetas que la sangre venosa, por ello fue difícil de observar las plaquetas con esta estrategia. Cada una de estas células posee una función específica sean los glóbulos rojos o eritrocitos o hematíes, los glóbulos blancos o leucocitos y las plaquetas o trombocitos.

La sangre se considera como un tejido ya que está formada por un conjunto de células en suspensión en un líquido denominado plasma. Adicionalmente los alumnos aprendieron y desarrollaron habilidades en el manejo de las muestras, a tomar medidas preventivas en el uso de tejidos biológicos y parasitarios.

Perspectivas: el dominio de la técnica mediante la repetición de la experiencia.

Cuadro 2. Diferentes estadios intraeritrocíticos de varias especies de *Plasmodium*

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	
Trophozoites	Young				
	Old				
Schizonts	Immature				
	Mature				
Gametocytes	Male				
	Female				

<http://www.slideshare.net/tpoe36/plasmodium-sp>

Bibliografía

Flores Camacho, F., Tovar Martínez, Ma. E., Gallegos Cázares, L, Velázquez Martínez Ma. E. Valdés Aragón, S, Saitz Ceballos S., Alvarado Zamorano, C y Villar Carmona, M. *Representaciones e ideas previas acerca de la célula en los estudiantes del bachillerato*. Ed. UNAM, México. 2000.
 Leslie P. Gartner y James L. Hiatt. *Texto y Atlas de Histología*. 2da edición 2002.

Cibergrafía

<http://www.ihrdiagnostica.com/tecnicas/msds/MSDSColoracionGiemsa.pdf>

Agradecimientos

M. en C. Elba Carrasco Ramírez, Dra. Norma Rivera Fernández y Dr. Filiberto Malagón Gutiérrez