

27. Haden, D. ft.; D. A. Montgomery; ft. J. Skelly: **Maturity onset diabetes mellitus: Response to intensive dietary management.** *Brit Med J* 2: 276-278, 1975.
28. Beck Nielsen, H.; O. Pedersen; N. S. Sorensen: **Effects of dietary changes on cellular insulin binding and in vivo insulin sensitivity.** *Metabolism* 29: 482-487, 1980.
29. Madsen. J.: **Extrapropancreatic and intrapancreatic action of antidiabetic sulfonylureas. A review.** *Acta Med Scand (Suppl)*. 476: 109-122, 1967.
30. Feinglos, M. N.; H. E. Lebovits: **Sulfonylurea treatment of insulin independent diabetes mellitus.** *Metabolism* 29: 488-494, 1980.

Recibido: 5 de octubre de 1982.

Aprobado: 12 de noviembre de 1982.

Dr. **Roberto González Suárez** Hospital
Fajardo. INEM Zapata y D. Vedado
Ciudad de La Habana.

INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E INMUNOLOGIA

Valores normales para la técnica de reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT) en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos humanos

Por:

Lic. R. A. RIVERO JIMENEZ*, Téc. L. E. PALMA SALGADO* y Dr. J. M. BALLESTER SANTOVENIA***

Rivero Jiménez R. A. *Valores normales para la técnica de reducción intracelular del azul de nitrotetrazolio (NBT) en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos humanos.* *Rev Cub Med* 22: 1, 1983. /

Es bien conocido el papel del leucocito polimorfonuclear neutrofilo en el fenómeno de la fagocitosis y la posterior digestión intracelular del material fagocitado al luchar contra las partículas infestantes que podrían causar enfermedades. El azul de nitrotetrazolio (NBT) es una sustancia redox que se utiliza como marcador intracelular para detectar actividad metabólica en estas células. Los valores de reducción del NBT obtenidos en neutrófilos de 71 individuos sanos, dan como media aritmética el 8,4% de células formazán positivas con una desviación standard de $\pm 4,0\%$. Estos resultados confirman los hallazgos de otros investigadores. Esta técnica permite conocer la integridad funcional de esta importante célula fagocítica en circunstancias basales.

* Licenciado en Microbiología. Master en Inmunología. Departamento de Inmunología.

**Técnica en Microbiología. Departamento de Inmunología.

*** Especialista de I grado en Hematología. Investigador Titular. Jefe del Departamento de Inmunología.

INTRODUCCION

Si bien es conocido que el mecanismo de la fagocitosis llevado a cabo por micrófagos y macrófagos es importante en la resistencia de los hospederos contra el material particulado que penetra en el organismo, así como contra el material dañino engendrado en él, la muerte intracelular que sigue a esa ingestión no lo es en menor grado.

Una variedad de sistemas intraleucocitarios son los responsables de la actividad microbicida, y constituyen el armamento defensivo de la célula fagocítica más pequeña: el leucocito polimorfonuclear neutrófilo (PMN),^{1,2}

Obviamente, un defecto en la actividad microbicida puede ser el resultado de la falla de un sistema o el producto de una combinación de defectos en los mismos. Sin embargo, en el laboratorio de diagnóstico inmunológico, solamente dos técnicas han recibido un amplio uso, entre ellas la prueba de reducción intracelular del NBT en polimorfonucleares neutrófilos humanos no activados.

MATERIALES Y METODOS

Donantes normales: Un grupo de 71 donantes que acudieron al Banco de Sangre se seleccionan al azar para la realización de este trabajo. Tres mililitros de sangre periférica se extraen y desfibrinan mediante agitación con cuentas de vidrio.

Soluciones: 1) Se prepara una dilución de azul de Nitrotetrazolio (NBT) al 0,1% en solución salina fisiológica estéril (Na^+ 153 mEq C1' 153 mEq). 2) Se prepara una dilución de glucosa al 0,2% en solución fosfato amortiguada (bufferada) (PBS) (140 mM NaCl; 4,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,3 mM NaH_2PO_4) pH 7,2.

Tubos: Se emplean tubos plásticos de 10 ml de capacidad con fondo cónico.

Método: Para determinar el grado de reducción del NBT se empleó una modificación de la técnica de *K. Okamura y colaboradores*:³ 0,2 ml de sangre venosa periférica desfibrinada se mezcla con 0,1 ml de solución de NBT al 0,1% y con 0,1 ml de solución de glucosa al 0,2% en el momento en que cada parte de esta mezcla haya alcanzado los 37°C de temperatura. A partir de la mezcla, se inicia la incubación a 37°C en baño de María por un período de 15 minutos con agitación manual cada 5 minutos. Al concluir la incubación, la mezcla se extiende sobre una lámina portaobjeto y se colorea por el método de Giemsa (esquema 1).

El recuento de cada lámina se llevó a cabo con un lente de inmersión en aceite en un microscopio de luz visible, se consideró como positivas

Esquema 1

FLUJO DE LA TECNICA DE REDUCCION INTRACELULAR DEL AZUL DE NITROTETRAZOLIO (NBT)

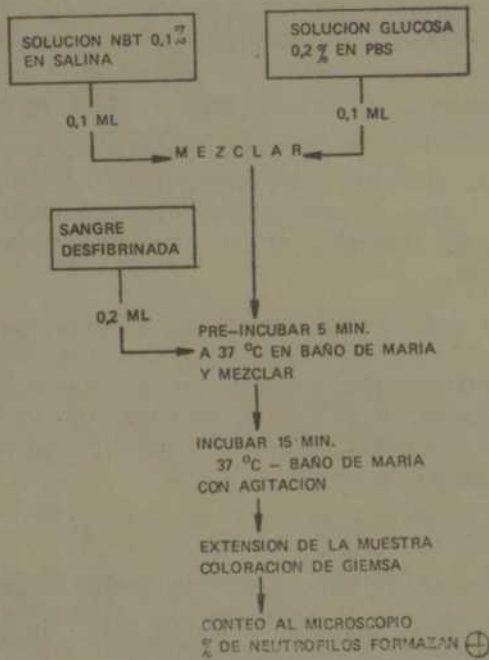
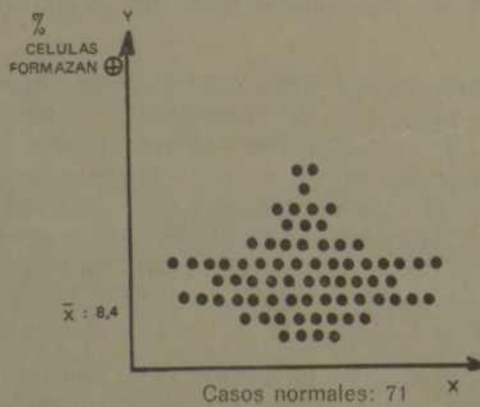


Gráfico 1

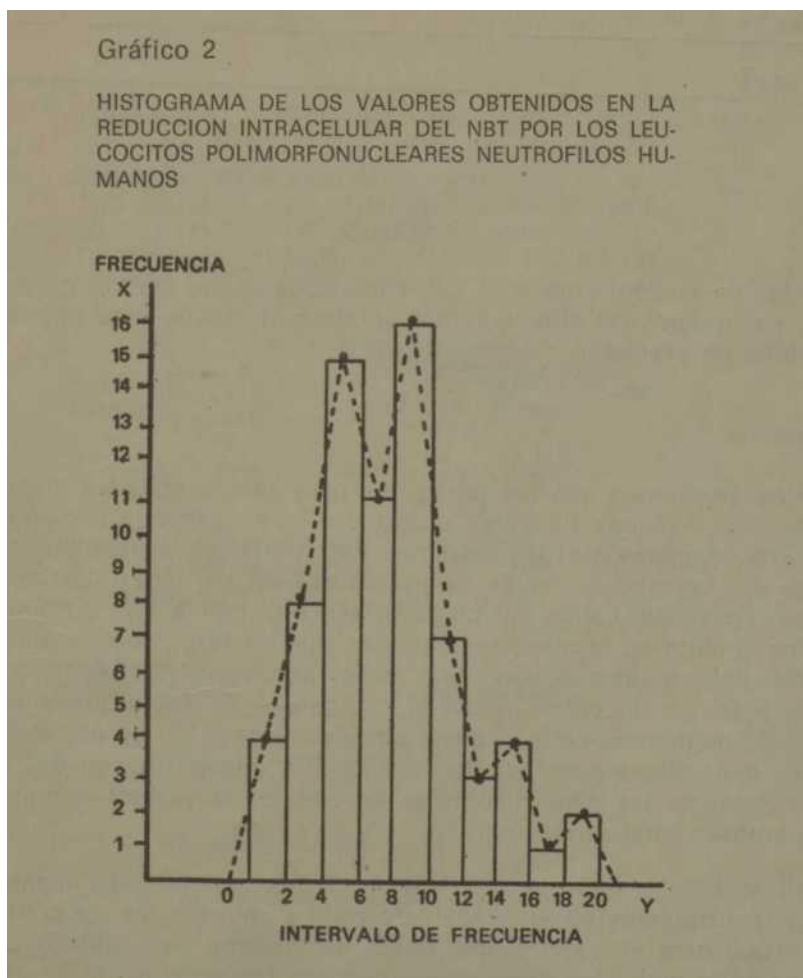
DISTRIBUCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS 71 MUESTRAS NORMALES PROCESADAS POR ESTE METODO

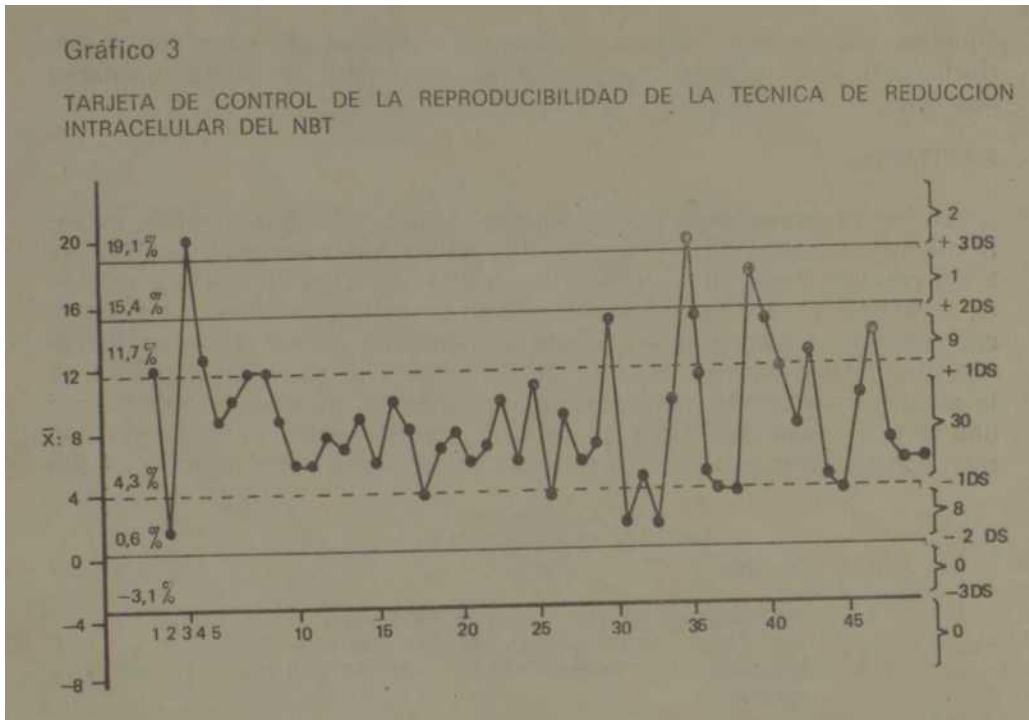


aquellas células que poseían inclusiones celulares de color azul-índigo (formazán), y se expresó el resultado en por ciento de células formazán positivas.

RESULTADOS

En los 71 casos normales estudiados, todos adultos, de ambos sexos, la media aritmética del porcentaje de células formazán positivas fue de 8,4% con una desviación *standard* de $\pm 4,0\%$ (gráfico 1). A estos valores se le aplicó el *test de Kolmogorov Smirnov* para determinar su normalidad estadística dentro de un líquido de confianza de $\alpha = 0,05$, resultando una distribución normal.⁴ (gráfico 2). Para controlar la reproducibilidad de la técnica se empleó el método gráfico, pasando los valores obtenidos a una tarjeta. Como los datos se comportaron como una distribución normal, aproximadamente el 95% de ellos se movieron en el rango ± 2 DS





(límites de acción) para $X \pm DS$, calculados según las 20 primeras muestras y ploteando las subsiguientes (gráfico 3). Según esta tarjeta no hubo cambios de precisión ni de exactitud.

DISCUSION

Hoy se conoce que las partículas para ser fagocitadas necesitan que sustancias inmunes llamadas opsoninas (anticuerpos y componentes del sistema complemento) las recubran. Esto permitirá el reconocimiento, por parte del fagocito, a través de receptores en su superficie para el fragmento Fe y C3b. Luego del contacto entre la célula y la partícula, ocurre un incremento en la membrana celular, que se refleja en un aumento sustancial del consumo de O_2 y una mayor producción de peróxido de hidrógeno H_2O_2 , por la célula activada^{5,6} Además de las enzimas oxidasas a nivel de membrana celular, en el citoplasma también se activarán las oxidasas dependientes del NAD^+ y del $NADP^+$ que participan del metabolismo celular en las vías glicolíticas de Embden-Meyerhoff-Parnas y en las de pentosas, respectivamente.^{7,8}

El azul de nitrotetrazolio (NBT), 3,3'-(3,3-dimethoxy-4,4'-biphenyl)- bis 2-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride, es un colorante redox tóxico para el hombre", que debe manipularse con cuidado para evitar daños en la piel y las membranas mucosas (especialmente la conjuntival).

Tiene un color amarillo en su forma oxidada que pasa a azul-índigo (formazán) cuando se reduce. En los tejidos, este colorante es capaz de comportarse como una sustancia liofílica, que se adosa a la membrana de los fagocitos, los cuales la ingieren y reducen intracelularmente a NBT. 2H (formazán) por acción, tal vez, de las oxidasas dependientes del NAD⁺ y del NADP⁺; así el citoplasma se colorea con inclusiones formazán positivas.

La reacción bioquímica planteada para este sistema red-ox se muestra en el esquema 2.

Por tanto, esta técnica ha servido para determinar indirectamente si el proceso de glicólisis y su consiguiente generación de NADPH⁺ y NADH⁺ se llevan a cabo correctamente y, a través de esto, si el metabolismo celular produce suficiente H₂O₂ para la muerte intracelular de las partículas infectantes.

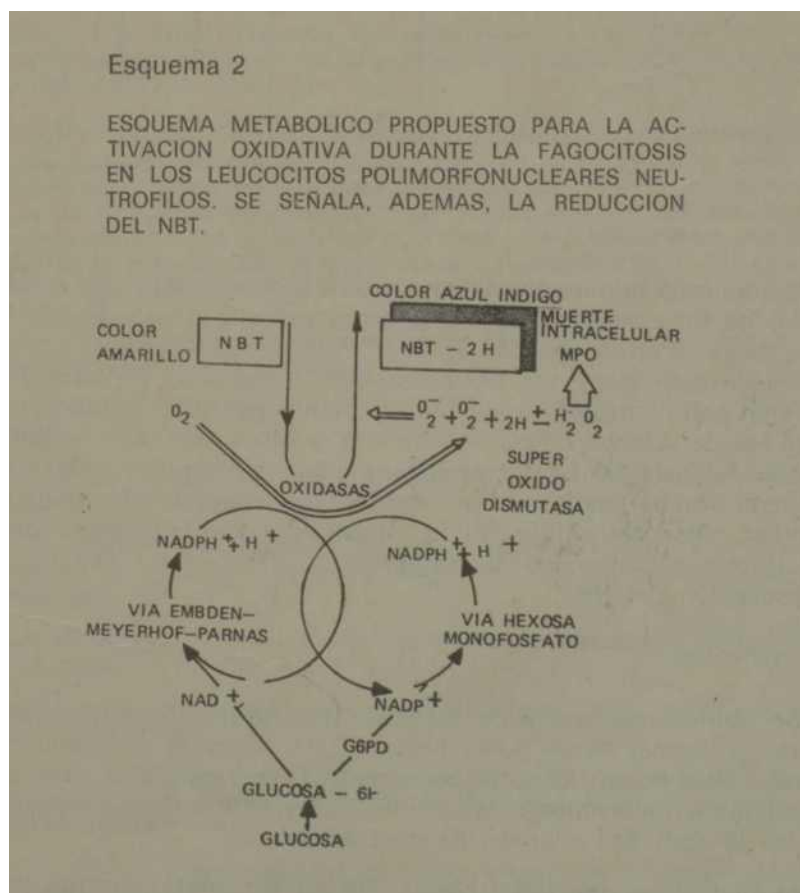
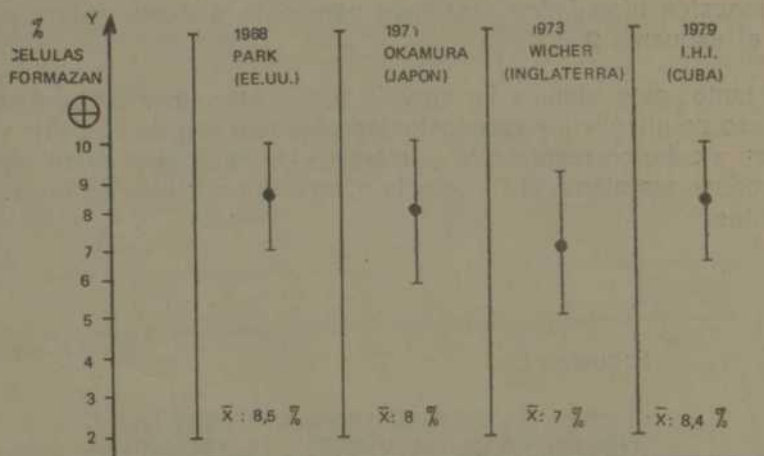


Gráfico 4

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR DIFERENTES AUTORES AL APLICAR EL METODO CITOQUIMICO PARA LA DETERMINACION DE LA REDUCCION INTRACELULAR DEL NBT (CONTROLES NORMALES)



Los valores que arrojó nuestro estudio no se alejan de resultados encontrados internacionalmente por otros investigadores de EE. UU. ingla-terra, Japón y otros, (gráfico 4). *B. H. Park*,⁹ en 1968, demostró que la aplicación de esta técnica a pacientes con infecciones bacterianas en comparación con controles sanos fue altamente positiva. Estudios posteriores como los de *Wicher*,¹⁰ *Koch*,¹¹ *Okamura*³ y otros, han corroborado esta evidencia. Además se han realizado estudios en algunas enfermedades en que esta prueba puede ser útil para detectar defectos funcionales del polimorfonuclear neutrófilo: en la enfermedad granulomatosa crónica, los déficits de glucosa-6-P-deshidrogenasa y otros donde hay valores nulos de reducción del NBT.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una media de 8,4% de neutrófilos formazán positivos con un rango normal desde 4,4% hasta 12,4%. En este estudio se aplicó un método bioquímico indirecto para medir la potencialidad oxidativa de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y, por ende, es un buen estimador de la actividad microbicida intracelular.

La técnica es sencilla y rápida. Por su economía, permite ser empleada para el estudio de pesquisaje de grandes cantidades de muestras que

permiten detectar defectos funcionales groseros en las células fagocíticas (PMN)), considerando como rango para el pesquisaje los valores normales comprendidos entre $8,4 \pm 4\%$.

SUMMARY

Rivero Jiménez, R. A. *Normal values for nitroblue-tetrazolium (NBT) intracellular reduction technique in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes*. Rev Cub Med 22: 1, 1983.

The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte on the phagocytotic phenomenon and posterior intracellular digestion of phagocytized material struggling against infecting particles that should cause diseases, is well known. Nitroblue-tetrazolium (NBT) is a redox substance that is used as intracellular marker in order to detect metabolic activity in these cells. NBC reduction values obtained in neutrophils of 71 healthy individuals gives, as arithmetical mean, 8,4% positive formazan cells with $\pm 4,0\%$ standard deviation. These results verified the findings of other investigators. This technique allows to know functional integrity, under basal conditions, of this important phagocytic cell.

RÉSUMÉ

Rivero Jiménez, R. A. *Valeurs normales pour la technique de réduction intracellulaire du bleu de nitrotétrazolium (NBT) dans les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles humains*. Rev Cub Med 22: 1, 1983.

Il est très bien connu le rôle qui joue le leucocyte polymorphonucléaire neutrophile dans le phénomène de la phagocytose et l'ultérieure digestion intracellulaire du matériel phagocyté lors de lutter contre les particules infestantes qui pourraient occasionner des maladies. Le bleu de nitrotétrazolium (NBT) est une substance red-ox utilisée comme marqueur intracellulaire pour le dépistage de l'activité métabolique dans ces cellules. Les chaleurs de réduction du NBT obtenues sur des neutrophiles de 71 individus sains, offrent comme moyenne arithmétique 8,4% de cellules formazan positives, avec un écart type de $\pm 4,0\%$. Ces résultats confirment les trouvailles d'autres chercheurs. Cette technique permet de connaître l'intégrité fonctionnelle de cette importante cellule phago-cytaire dans des circonstances basales.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bachner, R. L.*: Microbe ingestion and killing by neutrophils: Normal mechanisms and abnormalities. Clinics in Haematology 4: 609-633, 1975.
2. *Miller, M. E.*: Assays of phagocytic function. In Laboratory Diagnosis of Immunology Disorders. C. N. Vyas, D. P. Stites and G. Brecher. Ed., Gruñe E. Stration. Pp. 130- 131. New York, 1975.
3. *Okamura, K. et al.*: An improved nitroblue tetrazolium test and its correlation with toxic neutrophils. Am J Clin Pathol 62: 27-31, 1974.
4. *Thielmann, K.*: Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. La Habana, Ed. Organismos, 1975. P. 104.
5. *Sbarra, A. J.; N. L. Kamovsky*: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 234: 1355-1362, 1959.
6. *Segal, A. W.; T. J. Peter*: Analytical subcellular fractionation of human granulocytes with Special reference to the localization of, enzymes involved in microbicidal mechanisms. Clin Sci Mol Med 52: 429-442, 1977.

7. *Evans. W. H.; M. L. Karnovsky*: A possible mechanism for the stimulation of some metabolic functions during phagocytosis. J Biol Chem 236: PC 30-32, 1961.
8. *Bachner, Ft. L.; M. L. Karnovsky*: Deficiency of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidase in chronic granulomatosis disease. Science 162: 1277-1279, 1968.
9. *Park. B. H. et al*: Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet II: 532-534. 1968.
10. *Wicher, V.; et al*: Nitroblue tétrazolium test in experimental syphilis. Brit J Venereal Dis 53 : 292-294, 1977.
11. *Koch, C.; N. Hoiby; A. Wiik*: Nitroblue-teatrazolium (NBT)-reduction by human peripheral neutrophil granulocytes in the parensis of bacterial antigens. Acta Pathol Microbiol Scand Section C. 83: 144, 1975.

Recibido: 2 de noviembre de 1982. Aprobado:
5 de diciembre de 1982.

Lic. *R. A. Rivero Jiménez* Instituto
de Hematología e Inmunología
Ciudad de La Habana.

Los accidentes cerebrovasculares como problema de salud pública. Sus posibilidades de prevención*

Por el Dr.:

IGNACIO MACIAS CASTRO **

Macías Castro, I. *Los accidentes cerebrovasculares como problema de salud pública. Sus posibilidades de prevención*. Rev Cub Med 22: 1, 1983.

Los accidentes cerebrovasculares constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en la mayoría de los países. En Cuba representan la tercera causa de muerte, y son responsables del 9% del total de defunciones para todas las edades. En Cuba la prevalencia de las ECV es de 5% para los sujetos de 50 y más años y de 13% para los de 65 y más años. La incidencia se calcula en los alrededores del 120 por 100 000

* Trabajo presentado en el VIII Congreso Internacional de la Federación Internacional de Higiene, Medicina Preventiva y Medicina Social. México, D.F. Marzo, 1978.

** Profesor de Medicina Interna del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Ciudad de La Habana. Presidente de la Comisión Nacional del Programa de Atención Integral al Adulto. Presidente de la Comisión Nacional de Hipertensión.