



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA**  
**ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLINICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**“COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE GRADIENTE DE PERCOLL  
Y FICOLL-HIPAQUE PARA EL AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DE  
SANGRE PERIFÉRICA HUMANA, HOSPITAL SANTA MARÍA DEL  
SOCORRO ICA”**

**AUTOR: ALBERTO MORA GUTIERREZ**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO TECNÓLOGO MÉDICO**

**ASESOR:**

**Mg. Julia Cecilia Morón Valenzuela**

**Ica, Perú**

**2017**

Mora, A. 2017. Comparación de las técnicas de gradiente de percoll y ficoll-hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana / Alberto Mora Gutiérrez. 84 páginas.

Nombre del tutor: Mg. Julia Cecilia Morón Valenzuela

“Disertación académica en licenciatura en Tecnología Médica – Universidad Alas Peruanas 2017”



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGIA MÉDICA  
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLINICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

HOJA DE APROBACION

TEMA

**“COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE GRADIENTE DE PERCOLL Y FICOLL-HIPAQUE PARA EL AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA, HOSPITAL SANTA MARÍA DEL SOCORRO ICA”**

AUTOR: ALBERTO MORA GUTIERREZ

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de licenciado en Tecnología Médica por la Universidad Alas Peruanas.

PRESIDENTE: MG. GIRALDO MENDOZA DANTE MARTIN .....

SECRETARIO: Lic.TM. TRILLO LOVERA EVELING LISETH .....

MIEMBRO: Lic.TM. SILVA OCHOA ANDRES SEGUNDO .....

ICA- PERÙ

2017

La presente tesis está dedicado:  
A dios; por ser manantial de amor y vida.  
A mis padres; por su apoyo y sus  
consejos en toda mi formación  
profesional.

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta tesis:

Al T.M. Jaime Rosales Rimache por haberme brindado la oportunidad de recurrir a sus conocimientos científicos.

Al HOSPITAL SANTA MARIA DEL SOCORRO ICA y a sus miembros que integran el área de laboratorio clínico.

## RESUMEN

**Objetivos.** Comparar las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana. **Materiales y métodos.** Se diseñó un estudio prospectivo, transversal y analítico, dirigido a la evaluación de dos técnicas de concentración linfocitaria, para el cual se colectaron muestra de sangre de individuos sanos en tubos EDTA con sistema al vacío, basado en un muestreo probabilístico; posterior a la aplicación de ambas técnicas, se determinó el recuento de linfocitos, viabilidad celular e impurezas celulares de los concentrados, y se realizó análisis pareado para contrastar las hipótesis de estudio. **Resultados.** Se evidenció un mayor recuento de linfocitos ( $p < 0.001$ ) obtenido por el método de ficoll-hipaque ( $10836 \pm 3269$  células/ $\mu\text{L}$ ) en comparación con el método de percoll ( $5608 \pm 3261$  células/ $\mu\text{L}$ ); en contraste a la viabilidad la cual fue mucho mayor ( $p < 0.001$ ) en el método por Percoll ( $71.3 \pm 15.3\%$ ), que el de Ficoll-Hipaque ( $31.0 \pm 23.8\%$ ) y finalmente el nivel de impureza celular obtenida por el método de percoll ( $36.9 \pm 17.9\%$ ), fue mayor ( $p < 0.001$ ) en comparación con el obtenido por el método de Ficoll-Hipaque ( $19.4 \pm 10.1\%$ ). **Conclusiones.** Los resultados de recuento, viabilidad e impurezas celulares presentaron diferencias significativas entre las técnicas de ficoll-hipaque y percoll.

**Palabras clave:** *Gradiente de percoll, gradiente de ficoll-hipaque, linfocitos*

## **ABSTRACT**

**Objectives.** To compare gradient techniques of percoll and ficoll hyphaque for the isolation of human peripheral blood lymphocytes. **Materials and methods.** A prospective, cross - sectional and analytical study was designed to evaluate two techniques of lymphocyte concentration, for which blood samples were collected from healthy individuals in EDTA tubes with vacuum system, based on probabilistic sampling; After the application of both techniques, the lymphocyte counts, cell viability and cellular impurities of the concentrates were determined, and a paired analysis was performed to test the hypotheses. **Results.** There was a higher lymphocyte count ( $p < 0.001$ ) obtained by the ficoll-hyphaque method ( $10836 \pm 3269$  cells /  $\mu\text{L}$ ) compared to the percoll method ( $5608 \pm 3261$  cells /  $\mu\text{L}$ ); In contrast to viability, which was much higher ( $p < 0.001$ ) in the Percoll method ( $71.3 \pm 15.3\%$ ) than Ficoll-Hipaque ( $31.0 \pm 23.8\%$ ) and finally the level of cellular impurity obtained by the method Of percoll ( $36.9 \pm 17.9\%$ ), was higher ( $p < 0.001$ ) than that obtained by the Ficoll- hyphaque method ( $19.4 \pm 10.1\%$ ). **Conclusions.** The results of counting, viability and cellular impurities presented significant differences between the techniques of ficoll-hyphaque and percoll.

**Kew words:** *Percoll gradient, ficoll-hyphaque gradient, lymphocytes*

## **TABLA DE CONTENIDOS**

Portada	i
Epígrafe	ii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Tabla de contenidos	viii
Listado de tablas	x
Listado de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>15</b>
1.1. Descripción de la situación problemática	15
1.2. Formulación del problema de investigación	16
1.3. Objetivos	16
1.4. Justificación e importancia	17
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1. Antecedentes de la investigación	18
2.2. Bases teóricas	22
2.3. Bases legales	31
2.4. Definición de términos básicos	33
<b>CAPITULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>	<b>36</b>
3.1. Hipótesis general	36
3.2. Hipótesis específicas	36
3.3. Variables	37
<b>CAPITULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>38</b>
4.1. Tipo y diseño de la investigación	38
4.2. Nivel de la investigación	39
4.3. Método	39
4.4. Población y muestra de la investigación	40
4.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de los datos	41
4.6. Consideraciones éticas	45

CAPÍTULO V: ANÁLISIS Y RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	46
5.1. Resultados	46
5.2. Discusión de resultados	59
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS DE INFORMACIÓN	64
ANEXOS	
Anexo N° 01: Operacionalización de variables	71
Anexo N° 02: Matriz de consistencia	72
Anexo N° 03: Obtención de linfocitos por gradiente de ficoll-hipaque	73
Anexo N° 04: Obtención de linfocitos por gradiente de percoll	74
Anexo N° 05: Tinción de Wright	75
Anexo N° 06: Determinación de la viabilidad con trypan blue	76
Anexo N° 07: Ficha de recolección de datos	77
Anexo N° 08: Manual de procedimientos generales para el aislamiento de mononucleares	78

## LISTADO DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Estadísticos descriptivos del recuento de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	42
Tabla 2. Estadísticos descriptivos de la viabilidad de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	43
Tabla 3. Estadísticos descriptivos de la pureza de PBL y otras células obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	44
Tabla 4. Evaluación de la normalidad de datos obtenidos por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll	45
Tabla 5. Evaluación de la igualdad de varianzas para la pureza de PBL obtenidas por ambos métodos	46
Tabla 6. Evaluación de la igualdad de varianzas para el recuento de otras células obtenidas por ambos métodos	47
Tabla 7. Comparación de resultados de recuento de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	48
Tabla 8. Comparación de resultados de la viabilidad de PBL obtenida por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	49
Tabla 9. Evaluación de igualdad de medias para la pureza de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	50
Tabla 10. Evaluación de igualdad de medias para las impurezas (otras células diferentes a PBL) generadas de los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll	51
Tabla 11. Correlación entre los resultados de recuento de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	52
Tabla 12. Correlación entre los resultados de viabilidad de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	53
Tabla 13. Correlación entre los resultados de pureza de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	54
Tabla 14. Correlación entre los resultados de impurezas obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	55

## LISTADO DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Comparación de la distribución de datos de recuento de PBL obtenidos por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	83
Figura 2. Comparación de la distribución de datos de la viabilidad de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	84
Figura 3. Comparación de la distribución de datos de la pureza de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	85
Figura 4. Comparación de la distribución de datos de las impurezas (otras células) obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll	85
Figura 5. Dispersión de datos para el recuento de PBL obtenido por ambos métodos.	86
Figura 6. Dispersión de datos para la viabilidad de PBMC obtenido por ambos métodos.	86
Figura 7. Dispersión de datos para la pureza de PBMC obtenido por ambos métodos.	87
Figura 8. Dispersión de datos para las impurezas obtenidas por ambos métodos.	

## LISTADO DE ABREVIATURAS

- ❖ **PBMC**: Células mononucleares de sangre periférica
- ❖ **PBL**: Linfocitos de sangre periférica
- ❖ **EDTA K3**: Acido etilendiaminotetraacético tripotásico
- ❖ **CFU**: Unidad formadora de colonia
- ❖ **pH**: Potencial de hidrogeniones

## INTRODUCCIÓN

Muchos de los avances en biología celular y molecular son el resultado de estudios llevados a cabo en células especializadas. Como los tejidos y órganos que componen un ser vivo están formados por múltiples tipos celulares, una de las primeras tareas a las que se enfrenta el investigador consiste en aislar una población pura de un determinado tipo de células. Además, tras la separación, se tendrán que utilizar otro tipo de técnicas para contar el número de células obtenidas y para determinar su viabilidad, es decir, para comprobar que siguen vivas (1).

Los linfocitos son células importantes del sistema inmune y han sido ampliamente utilizados para los estudios morfológicos. Sin embargo, la literatura sobre técnicas de preparación de estas células es escasa y antigua, especialmente para los linfocitos cultivados in vitro (2).

Las diversas técnicas de separación se basan en las diferencias existentes entre los distintos tipos celulares como, por ejemplo, el tamaño y la densidad de las células, la afinidad de anticuerpos hacia determinados epítopos de la superficie celular, la dispersión de luz, la emisión de fluorescencia. Con frecuencia, para conseguir una separación eficaz es necesario utilizar dos o más métodos (3). Así mismo, por una cuestión de practicidad, factibilidad y costos, los métodos más empleados son los basados en gradientes de densidad, siendo el ficoll-hipaque y el percoll los compuestos más utilizados en la separación de células linfocitarias de sangre periférica (4, 5). Sin embargo, no existen evidencias claras que indiquen diferencias significativas entre ambos métodos, razón por la cual la presente propuesta de tesis busca compararlas para establecer diferencias mediante un modelo analítico.

## **CAPITULO I**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1. Descripción de la realidad problemática**

Las líneas linfocitarias obtenidas de sangre periférica son parte importante para el desarrollo y ejecución de ensayos de diagnóstico in vitro (inmunológico, hematológico, citogenético, entre otros) y de investigación (ensayos experimentales), en el cual el objetivo es obtener cantidad suficiente de células requeridas para el ensayo (6), así como la garantía de que sean células viables. No obstante, muchos de los ensayos que requieren células linfocitarias suelen trabajar con sangre total, como por ejemplo para procedimientos de cultivo celular (7), generando limitaciones en la proliferación celular, viabilidad celular disminuida y bajos índices mitóticos, debido a que la sangre total contiene hematíes que como parte de su degradación liberan hemoglobina y hierro el cual genera radicales libres que deterioran la membrana celular de otras células, incluida los linfocitos (8, 9), limitando el proceso de cultivo, y por ende la calidad de diagnóstico e investigación. A pesar que el método más empleado para el aislamiento de linfocitos es el gradiente con ficoll-hipaque, no se tienen datos precisos de la calidad del proceso en comparación a otras alternativas similares que pueden resultar de igual o superior eficacia.

## **1.2. Formulación de problema**

### 1.2.1. Problema principal

- ✓ ¿Existen diferencias significativas entre el recuento de linfocitos de sangre periférica humana aislados por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque ,Hospital Santa María del Socorro Ica ?

### 1.2.2. Problemas secundarios

- ✓ ¿Existe diferencia significativa en el recuento de linfocitos aislados por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque ,Hospital Santa María del Socorro Ica?
- ✓ ¿Existe diferencia significativa en la viabilidad linfocitaria obtenida por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque,Hospital Santa María del Socorro Ica?
- ✓ ¿Cuál es el nivel de impurezas celulares generadas por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque,Hospital Santa María del Socorro Ica?

## **1.3. Objetivo de la investigación**

### 1.3.1. Objetivo general

- ✓ Comparar las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana,Hospital Santa María del Socorro Ica.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el recuento de linfocitos obtenidos por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque,Hospital Santa María del Socorro Ica
- ✓ Evaluar la viabilidad linfocitaria obtenida por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque,Hospital Santa María del Socorro Ica.
- ✓ Evaluar el nivel de impurezas celulares generadas por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque,Hospital Santa María del Socorro Ica.

#### **1.4. Justificación e importancia de la investigación**

El hecho de contar con técnicas adecuadas y validadas para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica es un aporte fundamental para la optimización de los procesos que impliquen diagnóstico citogenético (estudio de cariotipo previo cultivo de linfocitos), inmunohematológico (estudio de citometría de flujo para sub poblaciones linfocitarias), y ensayos experimentales que dan soporte a líneas de investigación en toxicología celular (modelos experimentales para valorar dosis-efecto), clonación, producción de vacunas mediante el empleo de hibridomas, entre otros usos que se le da a las técnicas de gradientes de concentración linfocitaria. Además, resulta importante tener opciones distintas a la usual técnica de aislamiento linfocitario con ficoll-hipaque, más aun considerando que el percoll es un compuesto más estable, económico y que además puede ser empleado para el aislamiento no solo de líneas linfocitarias, sino de cualquier elemento forme de la sangre (líneas eritroides, monocitos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos), así como otras líneas celulares tales como espermatozoides.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes de la investigación**

##### Antecedentes Nacionales

Cuando se realizó la búsqueda de antecedentes de investigación en páginas nacionales como ciber tesis, Google académico y Scielo Perú, no se encontraron trabajos que evalúen viabilidad celular en células linfocitarias de sangre periférica, salvo algunos estudios utilizando como técnica de viabilidad a la citometría de flujo, instrumento que no ha sido utilizado en la presente investigación. El método de fluorescencia ha sido poco explorado en nuestro país, a excepción de su aplicación en el sector veterinario donde se evalúa la viabilidad de parásitos intestinales. Por tal razón, no se ha considerado antecedentes nacionales, puesto que distan significativamente del objetivo central de esta investigación.

##### Antecedentes internacionales

Chang et al (10) evaluaron la capacidad de dos métodos para aislar MSCs (células mesenquimales) de médula ósea humana. Los fibroblastos formadores de colonias (CFU-Fs) se consideran colonias de células madre y progenitoras. Por lo tanto, se propuso que las

MSCs sean representados por CFU-Fs. Por lo tanto, comparamos las eficacias relativas de dos medios, Ficoll y Percoll, en el aislamiento de fibroblastos con actividad de fosfatasa alcalina (CFU-F / ALP (+)) y porcentajes de CD166 (+) / CD34, Células CD90 (+) / CD34 (-), SH3 (+) / CD34 (-) y CD105 (+) / CD34 (-) en todas las células nucleadas de la médula ósea. Se pudo aislar un número significativamente mayor de células nucleadas con Ficoll que con Percoll. Los porcentajes de células que fueron CD166 (+) / CD34 (-), CD90 (+) / CD34 (-), SH3 (+) / CD34 (-) y CD105 (+) / CD34 (-) fueron significativamente mayores para Ficoll. La eficacia de formación de colonias a partir de aislados de Ficoll (119 +/- 69 CFU-F / ALP (+)) también fue mayor que la de los aislados de Percoll (46 +/- 35 CFU-F / ALP (+) por plato) ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, el tamaño promedio de las colonias, el porcentaje de CFU-F con ALP (+) y las capacidades de diferenciación de CFU-F no fueron significativamente diferentes entre los grupos. En conclusión, el Ficoll es superior al Percoll en la preparación de hMSCs.

Yeo et al (11) compararon los recuentos de BM-MNC (células mononucleares de médula ósea roja) y sus subconjuntos celulares obtenidos después del aislamiento usando Ficoll-Paque y Lymphoprep - dos medios de gradiente de densidad diferentes usados en los ensayos clínicos. Se tomaron muestras de médula ósea de pacientes ingresados en el ensayo clínico REGENERATE-IHD después de 5 días de inyecciones subcutáneas de factor estimulante de colonias de granulocitos. Cada muestra se dividió por igual para el aislamiento de BM-MNC usando Ficoll-Paque y Lymphoprep, manteniendo todos los demás procedimientos constantes. Las fracciones aisladas se caracterizaron por células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales, linfocitos T, linfocitos B y células NK usando marcadores de superficie celular CD34 (+), CD133 (+) VEGFR2 (+), CD45 (+) CD3 (+) CD19 (+) y CD45 (+) CD16 (+) CD56 (+), respectivamente. No hubo diferencias significativas en los recuentos y el porcentaje de recuperación celular de varios tipos de células mononucleares recuperados después de la separación utilizando

cualquiera de los medios de gradiente de densidad. La viabilidad celular y la proporción de varios fenotipos celulares investigados fueron similares entre los dos medios. También fueron igualmente eficaces en la exclusión de glóbulos rojos no deseados, granulocitos y plaquetas de los productos celulares finales. Se demostró que la composición y la cantidad de tipos de células encontradas en las preparaciones terapéuticas BM-MNC para su uso en ensayos clínicos de trasplante de células madre cardíacas no están influidas por el tipo de gradiente de densidad de los medios utilizados al comparar Ficoll-Paque y Lymphoprep.

Bourzac et al (12) compararon 3 protocolos para el aislamiento de BM MSC equino: adherencia a un plato de cultivo de plástico (Clásico) y 2 protocolos de separación por gradiente de densidad (Percoll y Ficoll). Los aspirados de BM fueron obtenidos por punción en el esternón de 6 yeguas y las MSCs aisladas por los 3 protocolos. Se determinó la viabilidad celular después del aislamiento, el rendimiento MSC, el número de MSCs obtenidos después de 14 días de cultivo y las características funcionales (auto-renovación (CFU) y capacidad de diferenciación multilineal) para los 3 protocolos. La media +/- DS del protocolo de Percoll fue significativamente mayor (6,8 +/- 3,8%) que el protocolo Clásico (1,3 +/- 0,7%). Los recuentos de MSCs recuperados después de 14 días de cultivo por 10 ml de muestra de BM fueron de 24,0 +/- 12,1, 14,6 +/- 9,5 y 4,1 +/- 2,5 x 10<sup>6</sup> para los protocolos Percoll, Ficoll y Clásico, respectivamente, significativamente mayores para el Percoll comparado con el protocolo clásico. Estos datos sugieren que el protocolo de separación de densidad por gradiente de Percoll fue el mejor en términos de rendimiento de MSC y potencial de auto-renovación de los recuperados de MSC y que éstos con el protocolo Ficoll tenían la auto-renovación más baja.

Pösel et al (13) evaluaron al Ficoll-Paque y cómo afecta el rendimiento y composición de BMNCs en comparación con métodos de aislamiento alternativos, tales como Percoll o separación inmunomagnética de

polimorfonucleares (PMNs). Cada procedimiento de aislamiento fue confundido por una pérdida significativa de BMNCs que fue máxima después del gradiente de Ficoll-Paque, moderada después de la DGC de Percoll ajustada y menor después de la depleción de PMN inmunomagnético ( $25,6 \pm 5,8\%$ ,  $51,5 \pm 2,3$  y  $72,3 \pm 6,7\%$  de BMNCs totales en Médula ósea lisada). Curiosamente, las proporciones de las subpoblaciones BMNC se asemejan a los de la médula ósea lisada indicando pérdida de BMNC simétrica independiente del protocolo de aislamiento. El contenido de células madre hematopoyéticas (HSC), determinado por las unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM), se redujo significativamente después de Ficoll-Paque DGC en comparación con Percoll DGC y el agotamiento PMN inmunomagnético. Los hallazgos indican que el método común para aislar BMNCs tanto en preclínica y la investigación clínica puede ser considerablemente mejorada mediante la sustitución de Ficoll-Paque con Percoll, o particularmente por inmunodepleción de PMNs.

Chilvers et al (14) desarrollaron un método óptimo de aislamiento y purificación de células granulosas humanas a partir de fluido folicular ovárico. Se recogió líquido folicular de pacientes sometidos a recuperación de ovocitos. Se llevó a cabo una serie de técnicas de aislamiento y purificación, que incluían la centrifugación con gradiente de densidad y el uso de diferentes complejos de anticuerpo-perla. El mayor rendimiento porcentual de células granulosas purificadas vivas procedía de la centrifugación con gradiente de densidad usando polímero de sacarosa seguido de selección positiva de células granulosa usando anticuerpo primario contra MISRII y anticuerpo secundario acoplado a perlas de óxido de hierro. Se concluye que el nuevo protocolo es óptimo para la purificación de células de granulosa que produce muestras que están en gran parte libres de células no deseables. Este protocolo proporciona una solución de purificación, especialmente para muestras de pacientes que tienen una contaminación significativa con hematíes.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Linfocitos**

Las células del linaje linfoide son los linfocitos, que se diferencian en los tejidos linfoides primarios. Estas células son responsables de desencadenar la respuesta inmune de tipo específico. Existen dos tipos fundamentales de linfocitos: las células T y las células B. Ambos tipos celulares poseen en su membrana receptores capaces de reconocer el antígeno de una forma específica. Las células B se diferencian en los mamíferos en el hígado durante la vida fetal y en la medula ósea en adultos. La principal característica de los linfocitos B es su capacidad de producir anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig). Estas moléculas forman parte del receptor específico para antígeno de las células B (SCR). Existen cinco formas de Igs, denominadas isotipos porque hacen lo mismo (reconocer antígenos), con estructura muy similar: Ig G, M, A, D y E. La mayoría de las células B humanas que circulan por la sangre expresan dos isotipos en su membrana plasmática: Ig M e Ig D. Las células B que producen Ig (células plasmáticas) se encuentran en su mayor parte en la medula ósea, los ganglios y el bazo y apenas circulan (15).

Los linfocitos T provienen de precursores que se originan en la medula ósea y de allí pasan al timo, donde maduran. Las células T tienen un receptor de membrana de estructura similar a las inmunoglobulinas, conocido como receptor de la célula T (TCR). Mediante este receptor los linfocitos T son capaces de identificar el antígeno de forma específica (16).

A diferencia de los linfocitos B, las células T necesitan que el antígeno sufra una serie de modificaciones antes de que lo puedan reconocer. Por un lado, las proteínas antigénicas deben ser degradadas. Típicamente los TCR reconocen péptidos cortos, de unos 8-30 aminoácidos de longitud. Además, estos péptidos deben estar unidos a una molécula del sistema principal de histocompatibilidad (MHC o HLA), para que el TCR pueda reconocerlo. Por esta razón se dice que

las moléculas de histocompatibilidad, que son de dos tipos conocidos como MHC de clase I y MHC de clase II, «presentan» los péptidos a los linfocitos T (15, 16).

Existen dos tipos fundamentales de linfocitos T: los linfocitos T citolíticos (Tc), que son portadores de la molécula CD 8 en su membrana plasmática, y los linfocitos T cooperadores (Th, helper), que expresan la molécula CD 4. Los linfocitos Tc detectan los péptidos presentados por moléculas MHC de clase I. Su función es lisis de las células que presentan péptidos extraños al organismo; por ejemplo, péptidos de virus. Los linfocitos Th reconocen los péptidos cuando están unidos a moléculas MHC de clase II. Su función es la de ayudar a que tanto los linfocitos Tc como las células B y los fagocitos funcionen correctamente. Hay un tercer tipo de linfocito T que utiliza un TCR distinto a los Th y Tc y que se llama linfocito T $\gamma\delta$ . Su función parece ser la lisis de células infectadas por virus o micobacterias (17).

#### 2.2.2. Técnicas para aislamiento de linfocitos

Muchos de los avances en biología celular y molecular son el resultado de estudios llevados a cabo en células especializadas. Como los tejidos y órganos que componen un ser vivo están formados por múltiples tipos celulares, una de las primeras tareas a las que se enfrenta el investigador consiste en aislar una población pura de un determinado tipo de células. Además, tras la separación, se tendrán que utilizar otro tipo de técnicas para contar el número de células obtenidas y para determinar su viabilidad, es decir, para comprobar que siguen vivas (18).

Las diversas técnicas de separación se basan en las diferencias existentes entre los distintos tipos celulares como, por ejemplo:

- ✓ El tamaño y la densidad de las células (19)
- ✓ La afinidad de anticuerpos hacia determinados epítopos de la superficie celular (20)
- ✓ La dispersión de luz (21)

- ✓ La emisión de fluorescencia (22)

Con frecuencia, para conseguir una separación eficaz es necesario utilizar dos o más métodos.

a. Sedimentación isopícnica

Esta técnica permite separar células en función de su densidad. Este método es ideal para separar células cuyas densidades difieren en más de 0,02 g/mL. Para ello se utilizan centrifugadoras convencionales y se aplican campos gravitatorios de baja intensidad. La separación se consigue haciendo sedimentar las células en un gradiente de densidad, es decir, en un medio cuya densidad aumenta con la profundidad del tubo (23).

Se distinguen dos tipos de gradiente de densidad:

- ✓ Gradiente discontinuo: se genera superponiendo capas de densidad decreciente (24)
- ✓ Gradiente continuo: se genera con un formador de gradientes o, en algunos casos, se generan ellos solos al centrifugarlos a velocidades elevadas (25)

El medio con el que se forma el gradiente de densidad debe ser muy soluble en agua para poder abarcar un amplio rango de densidades. Además, debe ser inerte, no debe ser tóxico, no debe ser viscoso a concentraciones elevadas y no debe ejercer mucha presión osmótica en disolución. Ejemplos de este tipo de medios son la sacarosa, el cloruro de cesio, metrizamida y polímeros de elevado peso molecular como los dextranos, el Ficoll o el Percoll, etc (26).

En un gradiente de densidad, las células sedimentan hasta alcanzar aquella posición en la que su densidad iguala a la del medio. Una vez separadas, hay que extraer las células del gradiente de densidad. Una forma de hacerlo es introducir un medio de flotación (muy denso)

directamente en el fondo del tubo para que vaya desplazando el gradiente y las células hacia arriba. Las células son canalizadas hacia el tubo de salida y se recogen en una placa con múltiples pocillos que ya tienen medio de cultivo. Las células diluidas ya separadas se cultivan hasta alcanzar el número deseado para realizar los experimentos planeados (24, 25).

b. Elutriación centrífuga

Este método separa las células en función de su tamaño. El elutriador consiste en una centrifugadora adaptada para utilizar un rotor especialmente diseñado para la separación de células. El proceso comienza cuando las células, que están suspendidas en el medio de cultivo, son bombeadas hasta la cámara de separación, localizada en el interior del rotor, mientras éste está girando. El diseño de la cámara también ayuda a la separación porque, al ser más estrecha en el extremo más alejado del eje del rotor, el flujo del medio es más rápido en esa zona y genera una fuerza centrípeta más intensa. Una vez en el interior de la cámara, se establece un equilibrio de fuerzas. Por un lado, la fuerza centrífuga tiende a empujar las células hacia las paredes del rotor. Por otro lado, el bombeo de medio de cultivo a través de la cámara establece una fuerza centrípeta de intensidad variable que contrarresta la velocidad de sedimentación de las células (27).

Si la población celular fuese uniforme se alcanzaría una situación de equilibrio en la que las células permanecerían en una posición fija. Como hay varios tipos celulares con distinto tamaño y densidad, las células tienden a sedimentar a distintas velocidades, y cada tipo de célula alcanza su equilibrio en distintas posiciones de la cámara. La cámara de sedimentación está iluminada por una luz estroboscópica y se puede observar directamente a través de un visor. Cuando las células alcanzan el equilibrio se incrementa la velocidad del flujo y las células son empujadas hacia el exterior, donde se recogen en tubos apropiados (28).

El equilibrio se alcanza en pocos minutos y la separación se puede llevar a cabo en unos 30 minutos. En cada separación se pueden llegar a obtener hasta 10<sup>8</sup> células. Las células se pueden cultivar inmediatamente después de su separación, hasta alcanzar la concentración deseada. Dos inconvenientes de esta técnica son que el aparato es bastante caro y se necesita adquirir mucha experiencia antes de llegar a conseguir separaciones eficaces (27, 28).

c. Separación inmunomagnética

Estas técnicas se basan en el uso de anticuerpos unidos a la superficie de unas esferas formadas por un material superparamagnético (es decir, que sólo son magnéticas en presencia de un campo magnético) recubierto de un polímero. Los anticuerpos se unen de manera específica a un antígeno presente en la superficie de un tipo celular concreto y, mediante un simple imán, se pueden separar las células que se han unido a los anticuerpos de las demás. Existen en el mercado dos sistemas de separación de células basados en el uso de esferas superparamagnéticas unidas a anticuerpos: Dynabeads<sup>®</sup> y MACS<sup>®</sup> (29, 30)

c.1. Dynabeads<sup>®</sup> (Invitrogen)

Son unas esferas de poliestireno cuyo interior contiene hierro, lo que le confiere propiedades superparamagnéticas. Su tamaño es uniforme, con un diámetro de 4,5 micras (comparable al tamaño de una célula). Sobre su superficie se pueden unir covalentemente diversos ligandos biorreactivos: anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios, estreptavidina, oligonucleótidos, etc. Veamos, a modo de ejemplo, cómo se realiza la separación de tipos celulares con Dynabeads<sup>®</sup> unidas a un anticuerpo (primario o secundario) (29).

c.2. Microesferas MACS<sup>®</sup> (Magnetic-activated cell sorting) (Miltenyi Biotec)

Son partículas superparamagnéticas formadas por óxido de hierro y polisacáridos (dextranos). Son muy pequeñas, con un diámetro aproximado de 50 nm (aproximadamente 100 veces menor que el de las Dynabeads®), y se encuentran unidas a anticuerpos específicos. Al ser tan pequeñas, no alteran ni la estructura, ni la función, ni la actividad de las células. No son tóxicas y son biodegradables. Aunque se las denomina “microesferas”, en realidad se trata de nanopartículas, de modo que sería más correcto decir que son “nanoesferas”. La separación se lleva a cabo haciendo pasar la muestra a través de una columna que contiene una matriz de esferas ferromagnéticas recubiertas de un material inerte que no daña las células. Cuando se coloca la columna sobre un imán, las esferas crean un campo magnético de gran intensidad que atrae fuertemente las microesferas MACS® y las células unidas a ellas, mientras que las células que no se han unido a las microesferas MACS® fluyen libremente a través de la columna. Se necesita un campo magnético muy intenso porque las microesferas son muy pequeñas y las células están mínimamente marcadas (30).

d. Citometría de flujo

La citometría de flujo permite analizar, de forma simultánea, diversos parámetros de cada una de las células presentes en una población celular heterogénea. Además de contar las células, esta técnica obtiene información relacionada con el tamaño y la complejidad interna de cada célula. Utilizando anticuerpos marcados fluorescentemente también es posible determinar el grado de expresión de determinadas proteínas localizadas sobre la superficie celular. El citómetro de flujo hace pasar las células, de una en una, a través de un rayo láser. La luz que emerge de cada célula cuando el láser incide sobre ella es captada por distintos detectores y analizada. Cada detector ofrece un tipo de información distinto. Los datos recogidos se analizan estadísticamente mediante el software del aparato, que elabora un informe detallado sobre las características de las células como, por ejemplo, su tamaño, su complejidad interna o su fenotipo (31).

### 2.2.3. Gradiente de separación con ficoll-hipaque

Los productos de ficoll-hipaque son soluciones acuosas que contienen ficoll PM400 y diatrizoato de sodio con ácido disódico cálcico. El ficoll PM400 es un polímero sintético de alto peso molecular (400 KDa) de sacarosa y epiclohidrina que es fácilmente soluble en agua. Las moléculas de Ficoll PM400 son altamente ramificadas, esféricas y compactamente enrollada con un radio de aproximadamente 10 nm. El Ficoll PM400 tiene una baja viscosidad intrínseca (17 mL/g) en comparación con los polisacáridos lineales del mismo peso molecular (por ejemplo el dextran) y las soluciones de Ficoll PM400 tienen bajas presiones osmóticas. El diatrizoato de sodio es un compuesto conveniente para usar con Ficoll PM400 ya que forma soluciones de baja viscosidad con alta densidad. El diatrizoato de sodio (635,92 Da) es la sal sódica del ácido 3,5-diacetamido-2,4,6-triiodobenzoico. Dado que el diatrizoato sódico es sensible a la luz, todos los productos Ficoll-Hipaque deben ser almacenados protegidos de la luz. La función de Diatrizoato de sodio en los productos Ficoll-Hipaque es proporcionar la densidad óptima y la osmolaridad necesarias para aumentar la eficiencia (32).

El aislamiento de células mononucleares utilizando medios de separación como el ficoll-hipaque se basa en los extensos estudios de Bøyum (33, 34, 35). La sangre desfibrinada o tratada con anticoagulantes se diluye con un volumen igual de solución de sal equilibrada, sobre el producto Ficoll-hipaque (sin mezclar) y se centrifuga durante 30 a 40 min. La migración diferencial de las células da como resultado la formación de capas que contienen diferentes tipos de células:

- ✓ La capa inferior contiene eritrocitos, que han sido agregados por el Ficoll PM400 y por lo tanto el sedimento completamente en la capa de gradiente de densidad de Ficoll-Paque.
- ✓ La capa inmediatamente por encima de los eritrocitos contiene principalmente granulocitos, que a la presión osmótica de la solución

de medio Ficoll-hipaque, alcanzan una densidad lo suficientemente alta para migrar a través de la capa de medio.

- ✓ En la interfase entre el plasma y la capa de Ficoll-hipaque, las células mononucleares se encuentran junto con otras partículas de sedimentación lenta (por ejemplo, plaquetas) con baja densidad.

Varios factores contribuyen al éxito de esta separación. En la centrifugación, las células de la muestra de sangre se sedimentan hacia la interfaz de la sangre/Ficoll-hipaque, donde entran en contacto con el Ficoll PM400 presente en los productos Ficoll-hipaque. Los glóbulos rojos se agregan eficientemente por este agente a temperatura ambiente. La agregación aumenta la tasa de sedimentación de los glóbulos rojos, que se acumulan rápidamente como un gránulo en el fondo del tubo, donde están bien separados a partir de células mononucleares. Los granulocitos también sedimentan al fondo de la capa de medio Ficoll-hipaque. Este proceso es facilitado por un aumento en sus densidades causadas por el contacto con los medios Ficoll-hipaque ligeramente hipertónicos. Así, al final de la centrifugación, tanto los granulocitos como los glóbulos rojos se encuentran en la parte inferior del tubo, los linfocitos, monocitos y plaquetas no son suficientemente densos para penetrar en las capas de medio Ficoll-Paque que tienen densidades de 1,077 y 1,084 g/mL; por lo tanto, estas células se recogen como una banda concentrada en la interfase entre la muestra de sangre original y los productos de Ficoll-hipaque que tienen densidades de 1,077 y 1,084 g / ml. Este anillado permite la recuperación de células mononucleares con alto rendimiento en un pequeño volumen en poca mezcla con el medio Ficoll-Paque. Cuando el Ficoll-Hipaque de densidad 1.073 se utiliza, algunos linfocitos con densidades > 1.073 entrarán en la capa media de Ficoll-Paque y la preparación celular resultante se enriquecerá para células de menor densidad como las células estromales mesenquimales/madre y monocitos El lavado y la centrifugación de las células cosechadas eliminan posteriormente las plaquetas, y cualquier Ficoll-Hipaque contaminante (36).

#### 2.2.4. Gradiente de separación con percoll

Las propiedades físicas de Percoll han sido ampliamente estudiadas por Laurent et al. (37, 38, 39). El examen microscópico de electrones muestra la sílice en forma de un compuesto coloide polidisperso compuesto de partículas de 15 a 30 nm, con un diámetro medio de partícula de 21 a 22 nm. Las medidas hidrodinámicas (Viscosimetría y sedimentación) dan valores de 29 a 30 nm y 35 nm en NaCl 0,15 M y agua, respectivamente. La viscosidad de Percoll depende de la fuerza iónica, y es menor en soluciones salinas fisiológicas (por ejemplo, NaCl 0,15 M) que en agua o en sacarosa 0,25 M (22). Esto tiene el efecto de hacer la formación de gradiente en NaCl 0,15 M mucho más rápido que en Sacarosa 0,25 M cuando las soluciones se centrifugan en condiciones idénticas (37, 38).

El Percoll se suministra como una solución coloidal al 23% (p/p) en agua que tiene una densidad de 1,130/gpm 0,005 g/L. Se pueden conseguir gradientes que varían entre 1,0 y 1,3 g/mL por centrifugación. Todas las partículas biológicas que tienen valores de coeficiente de sedimentación de > 60S se puede unir con éxito en los gradientes de Percoll, y la mayoría tienen densidades mayores de < 1,13 g / ml en Percoll (39).

El Percoll tiene un pH de aproximadamente 9,0, ajustable entre 5,5 y 10,0 sin ningún cambio en sus propiedades. Si el pH cae por debajo de 5,5, se puede producir gelificación. La gelificación también puede ser causada por la presencia de cationes divalentes, un efecto que se exagera por temperaturas elevadas (37).

El Percoll tiene una osmolalidad muy baja (<25 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) y puede por lo tanto formar un gradiente de densidad sin producir ningún gradiente significativo de osmolalidad propiamente dicho. Esto hace posible que se puedan trabajar con gradientes de densidad que son iso-osmóticos y ajustados a condiciones fisiológicas. Esto es muy importante para obtener preparaciones de células que tienen una

concentración extremadamente alta, viabilidades y morfología intacta (40). Debido a este hecho, los gradientes de Percoll también proporcionan una oportunidad para observar el efecto de la osmolalidad sobre la densidad aparente flotante de las células y partículas subcelulares (41).

Las partículas de Percoll tienen un núcleo interno de sílice que es muy denso ( $r=2,2$  g/mL) y un tamaño medio de partícula hidratada de 29 a 30 nm en NaCl 0,15 M y 35 nm en agua (46). Así, cuando una solución de Percoll (en solución salina 0,15 M o Sacarosa 0,25 M) se centrifuga a  $> 10\ 000 \times g$  en un rotor de cabeza angular, las partículas de sílice revestidas comenzarán a sedimentar. Esto resulta en una distribución de partículas y, por tanto, gradientes de densidad. Dado que Percoll es un coloide polidisperso, sus partículas componentes sedimentarán a diferentes tasas, creando un gradiente muy suave (38, 40).

## **2.3. Bases legales**

### **2.3.1. Normativa internacional**

- ✓ ISO 9001:2015. Es la base del sistema de gestión de la calidad ya que es una norma internacional y que se centra en todos los elementos de administración de calidad con los que una empresa debe contar para tener un sistema efectivo que le permita administrar y mejorar la calidad de sus productos o servicios (42).
  
- ✓ ISO 15189. Es una norma internacional desarrollada por ISO (International Organization for Standardization) para el laboratorio de análisis clínicos que quiere especificar los requisitos generales para su competencia técnica. Bajo esta norma los laboratorios clínicos pueden acreditarse (43).
  
- ✓ ISO 17025. Es una normativa internacional desarrollada por ISO (International Organization for Standardization) en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración. Se trata de una norma de Calidad que tiene base en la

serie de normas ISO 9000, aunque introduce una serie de requisitos técnicos imprescindibles para lograr la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración (44).

- ✓ BPL. Es un conjunto de reglas, de procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) Organization for Economic Cooperation and Development (OCDE), o la Food and Drug Administration (FDA), etc.), que se consideran de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en determinados tipos de investigaciones o estudio (45).

### 2.3.2. Normativa nacional

- ✓ Ley N° 26842, Ley General de Salud. Norma sobre el cual se rige todo el sistema nacional de salud en Perú. Es de aplicación y alcance para instituciones estatales y privadas (46).
- ✓ NTS N° 0021- MINSA/DGSP V.01. Este documento busca contribuir a la mejora de la organización de los servicios de salud estableciendo claramente las categorías de establecimientos necesarios para cada nivel de atención. Esta norma técnica se aprobó con Resolución Ministerial N° 769-2004/MINSA, Norma Técnica de Categorías de Establecimientos del Sector Salud (47).
- ✓ NTP-ISO 15189:2004. Esta norma fue aprobada con Resolución N° 0071-2004/CTR-INDECOPI y especifica los requisitos relativos a la calidad y la competencia de los laboratorios clínicos y además para uso de los laboratorios clínicos en el desarrollo de sus sistemas de gestión de la calidad y la evaluación de sus propias competencias, y para uso por los organismos de acreditación en la confirmación o reconocimiento de la competencia de los laboratorios clínicos (48).
- ✓ Resolución Ministerial N° 588–2005/MINSA, Listado de Equipos Biomédicos Básicos para establecimientos de Salud. Esta norma

enlista los equipos de equipos biomédicos básicos que deben ser utilizados en los establecimientos del primer, segundo y tercer nivel de atención (49).

- ✓ NTS N° 050–MINSA/DGSP-V02. Norma Técnica de Salud para la Acreditación de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo. Esta norma fue aprobada con N° 777-2007/MINSA y busca contribuir a garantizar a los usuarios y al sistema de salud que los establecimientos de salud o servicios médicos de apoyo, según su nivel de complejidad, cuenten con capacidades para brindar prestaciones de calidad sobre la base del cumplimiento de estándares nacionales previamente definidos (50).
- ✓ NTS N° 072-MINSA/DGSP-V.01. Norma que busca establecer los criterios para la organización y el funcionamiento de la UPS de Patología Clínica, que permita una adecuada gestión en la misma. También permite (i) regular las condiciones de infraestructura, equipamiento y recursos humanos para brindar el servicio de Patología Clínica, (ii) establecer los criterios referidos a gestión, organización y prestación de servicios de la UPS de Patología Clínica con énfasis en la calidad, seguridad y oportunidad y (iii) asegurar el flujo adecuado de los recursos destinados a la atención de los pacientes en la UPS de Patología Clínica, así como promover el uso racional de los mismos (51).

#### **2.4. Definición de términos básicos**

- ✓ BPL. Siglas en castellano que indican Buenas Prácticas de Laboratorio y es un conjunto de directrices que deben cumplirse en cada actividad desarrollada dentro del laboratorio clínico.
- ✓ CLIA. Siglas en inglés que indican Clinical Laboratory Improvement Amendments, el cual es una institución que señala los requerimientos que deben cumplir los laboratorios clínicos en Estados Unidos, y se utiliza como referencia en muchos laboratorios a nivel mundial.

- ✓ EDTA. Es el ácido etilendiaminotetraacético, la cual es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica. Es utilizada como agente anticoagulante de la sangre, quelando al calcio en sangre para evitar la activación de la cascada de coagulación.
- ✓ Error. Es la desviación de un valor observado respecto a un patrón de referencia o valor real.
- ✓ Ficoll-Hipaque: Es un polisacárido hidrofílico altamente ramificado, y es soluble en soluciones acuosas.
- ✓ ISO. Siglas que proviene de los términos en inglés “International Organization for Standardization”, institución dedicada a la creación de estándares internacionales compuestos por diversas organizaciones nacionales de estandarización.
- ✓ Percoll: Es una herramienta para realizar separaciones por densidad de forma más eficiente. Se emplea para el aislamiento de células, orgánulos y/o virus mediante centrifugación en gradiente de densidad.
- ✓ Precisión. Es el grado de dispersión de un conjunto de datos con respecto a un valor central.
- ✓ UPS. Unidad productora de servicios, es una denominación que se utiliza en la normativa de establecimientos de salud para definir a una unidad de apoyo al diagnóstico, tal como lo es el laboratorio clínico o UPS de patología clínica.
- ✓ Variabilidad. Es una cualidad que permite valorar el grado de tendencia de un conjunto de variables.
- ✓ Venipunción. Es la extracción de sangre de una vena, generalmente tomada por un profesional y/o técnico de la salud.

- ✓ Viabilidad celular: se refiere a las células que están vivas y representan una proporción respecto al recuento total de células.

## **CAPITULO III**

### **HIPÓTESIS Y VARIABLES**

#### **3.1. Hipótesis general**

- ✓ Existen diferencias significativas entre las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana, Hospital Santa María del Socorro Ica.

#### **3.2. Hipótesis específicas**

- ✓ Existe diferencia significativa en el recuento de linfocitos obtenidos por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica.
- ✓ Existe diferencia significativa en la viabilidad linfocitaria obtenida por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica.
- ✓ El nivel de impurezas celulares generadas por la técnica de gradiente de percoll es menor comparada con la técnica de ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica.

3.3. **Variables de estudio** (ver anexo 01 para operacionalización)

- ✓ Gradiente de ficoll-hipaque
- ✓ Gradiente de percoll

## **CAPITULO IV**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **4.1. Tipo y diseño de la investigación**

##### **4.1.1. Tipo de investigación**

- Según la manipulación de la variable

Estudio Observacional: Estos implica que no hubo manipulación de las variables de estudio y se colectaron los datos tal cual se presenten en un momento determinado. Para el estudio, este fue representado por el recuento de linfocitos y viabilidad celular.

- Según la fuente de toma de datos

Prospectivo: La fuente de recolección de datos se realizó durante el mes de febrero del año 2017. Esto implicó la obtención de muestras de sangre para su análisis respectivo con generación de resultados de forma progresiva sin la necesidad de recolectar datos históricos.

- Según el número de mediciones

Transversal: Las variables se midieron en una sola ocasión, posterior a la obtención de linfocitos por los dos métodos de gradientes de densidad.

- Según el número de variables a analizar

Análítica: Implica que se buscó conocer si existen diferencias significativas o no entre las variables de estudio mediante empleo de la estadística inferencial. Para el caso de la investigación, se buscó definir si los métodos de gradiente de ficoll hipaque y percoll permitieron obtener linfocitos con diferencias significativas a la comparación.

#### 4.1.2. Diseño:

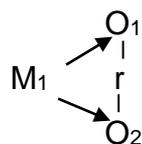
Se diseñó un estudio observacional, prospectivo, analítico, de corte transversal.

### 4.2. Nivel de Investigación

Relacional: Ya que se busca establecer si existe diferencia significativa o no entre los resultados generados por dos técnicas que evalúa la misma condición: recuento de linfocitos de sangre periférica, y secundariamente su viabilidad celular.

### 4.3. Método

El presente trabajo de investigación es de carácter analítico que sigue un método comparativo, ya que nos permitió conocer la totalidad de los hechos y fenómenos de la realidad estableciendo sus semejanzas y diferencias en forma comparativa, de tal modo que nos permita lógicamente aceptar o rechazar las hipótesis planteadas. El esquema del estudio es el siguiente:



M: Muestra  
O: Observación de las variables  
r: Relación

#### 4.4. Población y muestra de la investigación

##### 4.4.1. Población

Estuvo constituido por todas las muestras de sangre colectadas en el mes de Julio, para la obtención de células mononucleares de sangre periférica en el laboratorio clínico del Hospital Santa María del Socorro del Distrito de Ica.

Criterio de Inclusión:

- ✓ Muestras de sangre de individuos (indistinto la edad y sexo).
- ✓ Muestras de sangre colectadas en tubos con sistema de extracción al vacío de 4 mL y anticoagulante EDTA K<sub>3</sub>
- ✓ Muestras de sangre obtenidas según procedimientos establecidos en el laboratorio clínico del laboratorio clínico del Hospital Santa María del Socorro del Distrito de Ica.

Criterio de Exclusión:

- ✓ Muestras de sangre obtenidas en tubos que no tengan sistema de extracción al vacío
- ✓ Muestras de sangre de individuos con enfermedades oncohematológicas.
- ✓ Muestras de sangre de pacientes que estén recibiendo tratamiento quimioterápico

##### 4.4.2. Técnica de muestreo

Determinación del tamaño de la muestra

El muestreo fue probabilístico considerando la comparación de dos muestras emparejadas en función a la media. Se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos EPIDAT versión 4.1, asumiendo los siguientes parámetros para el cálculo del tamaño de muestra:

Método 1:	10,000
Método 2:	1,000

Coeficiente de correlación:	0,700
Diferencia de medias a detectar:	5,000
Nivel de confianza:	95,0%

Potencia (%)	Muestra
80,0	30

#### Elección de los miembros de la muestra

La selección de las muestras de sangre fue según el cumplimiento de los criterios de elegibilidad y condiciones pre-analíticas requeridas para la ejecución de las dos técnicas de concentración por gradientes de densidad.

### 4.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de los datos

#### 4.5.1. Técnicas

- ✓ El Fichaje: Es una técnica auxiliar en investigación científica; consiste en registrar los datos que se van obteniendo en los instrumentos a través del uso de fichas, las cuales, debidamente elaboradas y ordenadas contienen la mayor parte de la información que se recopila en una investigación.
- ✓ La Observación: Es una técnica que consiste en observar atentamente el fenómeno, hecho o caso, tomar información y registrarla para su posterior análisis. La observación es un elemento fundamental de todo proceso investigativo; en ella se apoya el investigador para obtener el mayor número de datos. Gran parte del acervo de conocimientos que constituye la ciencia ha sido lograda mediante la observación.

#### 4.5.2. Instrumentos

- ✓ Toma de muestras biológicas: La toma de muestra de sangre se realizó por venipunción en el antebrazo utilizando sistema de extracción al vacío en tubos de 4 mL con anticoagulante EDTA K3. El procedimiento para la extracción se realizó según las

recomendaciones establecidas en el manual de procedimientos de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (53).

- ✓ Obtención de linfocitos por Ficoll-Hipaque: Consiste en la separación de los componentes de la sangre periférica con el uso un agente coloidal de densidad cercana a 1.077 g/mL y a la centrifugación. Este proceso permitió la formación de capas que contienen diferentes tipos de células en base a su densidad. La capa inferior contiene a los hematíes y por encima una interfase de linfocitos entre el plasma y el agente coloidal. Los linfocitos se recuperaron de la interfase y se someterán a pasos de lavado cortos con una solución isotónica para eliminar restos de plaquetas, hematíes y plasma. Ver anexo 03
  
- ✓ Obtención de linfocitos por Percoll: Se trata de una suspensión de partículas (5.15 nm) de ácido silícico revestidas de un derivado de polivinilo (polivinilpirrolidona, PVP) que presenta baja viscosidad a densidades altas, no afecta prácticamente a la presión osmótica del medio y es estable a pH comprendidos entre 5 y 10. Es soluble en solución acuosa y estable en ellas siempre que no haya aniones bivalentes (sulfato), especialmente a bajos pH. El compuesto puede ser utilizado para centrifugaciones zonales, preformando gradientes, o bien para centrifugación isopícnica, ya que la centrifugación de percoll en rotores angulares durante 20-30 minutos y 20.000-100.000g produce un ligero gradiente, independientemente de la densidad inicial del percoll. Ver anexo 04
  
- ✓ Tinción de Wright: Esta coloración es conocida como policromática debido a que produce varios colores. Es una solución de alcohol metílico de un colorante ácido (eosina) y otro básico (azul de metileno). El alcohol sirve como un fijador del frotis sanguíneo al portaobjetos. El amortiguador, que consiste en una solución tamponada, mantiene el pH del colorante y favorece la mejor absorción por los diferentes componentes celulares. Ver anexo 05

- ✓ Determinación de la viabilidad con Trypan Blue: Este método determinó la viabilidad celular mediante la coloración azul que toman las células no viables luego del tratamiento con trypan Blue debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular. Por lo tanto, las células viables fueron incoloras y las células no viables tuvieron una coloración azul a través del microscopio de luz visible. Se utilizó la cámara de Neubauer para realizar el montaje lo cual permitió que se determine el recuento celular al mismo tiempo que la viabilidad utilizando un microscopio binocular con luz visible. Ver anexo 06

#### 4.5.3. Procedimientos para la recolección de los datos

- ✓ Obtención de datos  
Los datos del recuento de linfocitos y su viabilidad celular fueron expresados en porcentaje para ambas técnicas de concentración y se ingresaron a un formulario para el registro inequívoco de los mismos (Ver Anexo 06).
- ✓ Clasificación de datos  
Los datos obtenidos de las técnicas de gradientes de densidad para obtención de linfocitos no fueron categorizados, se mantuvieron en su condición de numéricos porque bajo esa característica se realizó el análisis estadístico empleando las pruebas de contraste de hipótesis a fin de estimar si existen diferencias significativas entre los resultados de ambas técnicas.
- ✓ Codificación  
No fue necesaria la asignación de códigos o valores a los resultados obtenidos, puesto que están no serán categorizadas. Los resultados numéricos fueron ingresados tal cual se obtuvieron del recuento y evaluación microscópica.

✓ Tabulación de datos

La información fue ingresada en el paquete estadístico STATA versión 14, en columna las variables y en filas los casos con el propósito de consolidar y totalizar en cifras a los resultados obtenidos, y generar información a través de los valores representativos y de estas el conocimiento para facilitar su posterior análisis e interpretación.

4.5.4. Criterios de validez y confiabilidad de los instrumentos

Para asegurar la confiabilidad de los resultados y no se genere sesgo debido a factores pre-analíticos se procesaron las muestras de sangre inmediatamente después de la extracción de sangre por punción venosa. La separación por gradientes de densidad fue realizada en una cabina de seguridad biológica para evitar contaminación de la muestra, y la tinción con wright y azul tripano fueron realizados en paralelo a fin de evitar diferencias debido al tiempo de procesamiento a partir de los linfocitos obtenidos por ambas técnicas de gradiente de densidad.

4.5.5. Técnicas de análisis e interpretación de datos

Los resultados a evaluar fueron de características cuantitativas; por lo tanto, se representaron mediante el uso de medidas de tendencia central tales como la mediana y media aritmética; así como el rango intercuartílico y la desviación estándar, coeficiente de asimetría y curtosis para determinar el grado de dispersión en cada técnica aplicada con un intervalo de confianza del 95% (o también percentil 2.5 y 97.5, representado como rango). Para establecer si existen diferencias significativas entre los resultados generados por ambas técnicas, se utilizó una prueba estadística de contraste de hipótesis, dependiendo de si los datos siguen o no distribución normal, la cual fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk a un nivel de confianza del 95%. Si la distribución de datos es normal, se empleó la prueba del t-student; y si no se empleó la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney; en ambos casos tomando como diferencia significativa un valor  $p < 0.05$ . Finalmente, para ver el nivel de relación entre los

resultados de ambas técnicas se utilizó el coeficiente de Pearson o Spearman, nuevamente dependiente de la normalidad o no de los datos.

#### **4.6. Ética de la investigación**

El presente estudio no tuvo como unidad de análisis a las personas, sino a sus resultados derivados de la aplicación de dos técnicas para obtener linfocitos a partir de sangre total obtenida de personas atendidas rutinariamente en el laboratorio clínico del Hospital Santa María del Socorro del Distrito de Ica. El investigador se comprometió al correcto manejo y tratamiento de datos de un modo confidencial, y garantizando el anonimato de los resultados; además de respetar los principios bioéticos de confidencialidad, beneficencia, no maleficencia, equidad y justicia.

## **CAPÍTULO V**

### **ANÁLISIS Y RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **5.1. Resultados**

El presente estudio tuvo por objetivo comparar dos técnicas (ficoll vs percoll) basadas en el principio de gradientes de concentración para la obtención de linfocitos de sangre periférica (PBL), y otras características celulares como la viabilidad y la pureza de los concentrados.

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis descriptivo del recuento celular obtenido por los métodos de concentración con ficoll-hipaque y percoll. Se evidencia un mayor recuento obtenido por el método de ficoll-hipaque ( $10836 \pm 3269$  células/ $\mu$ L) en comparación con el método de percoll ( $5608 \pm 3261$  células/ $\mu$ L). También se aprecia los valores de curtosis y coeficiente de asimetría (skewness), los cuales posiblemente indican que la distribución del recuento de células por el método de ficoll-hipaque se acerca más a una distribución normal, en comparación con el método de percoll, cuyos valores de asimetría y curtosis se alejan de 0 y 3, respectivamente.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos del recuento de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Estadísticos	Recuento de PBL/ $\mu$ L	
	Ficoll	Percoll
N	30	30
Promedio	10835.8	5608.3
Desviación estándar	3268.9	3260.7
Mediana	11287.5	4900.0
Rango intercuartílico	3350	4275
Percentil 5	4850	2100
Percentil 25	9400	3175
Percentil 75	12750	7450
Percentil 95	15250	11450
Asimetría	-0.44	1.40
Curtosis	2.57	5.38

La distribución de los datos del recuento de PBL obtenidos por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, se muestran en el gráfico 1, el cual evidencia claramente una diferencia en las medianas y rangos intercuartílicos del recuento para ambos métodos.

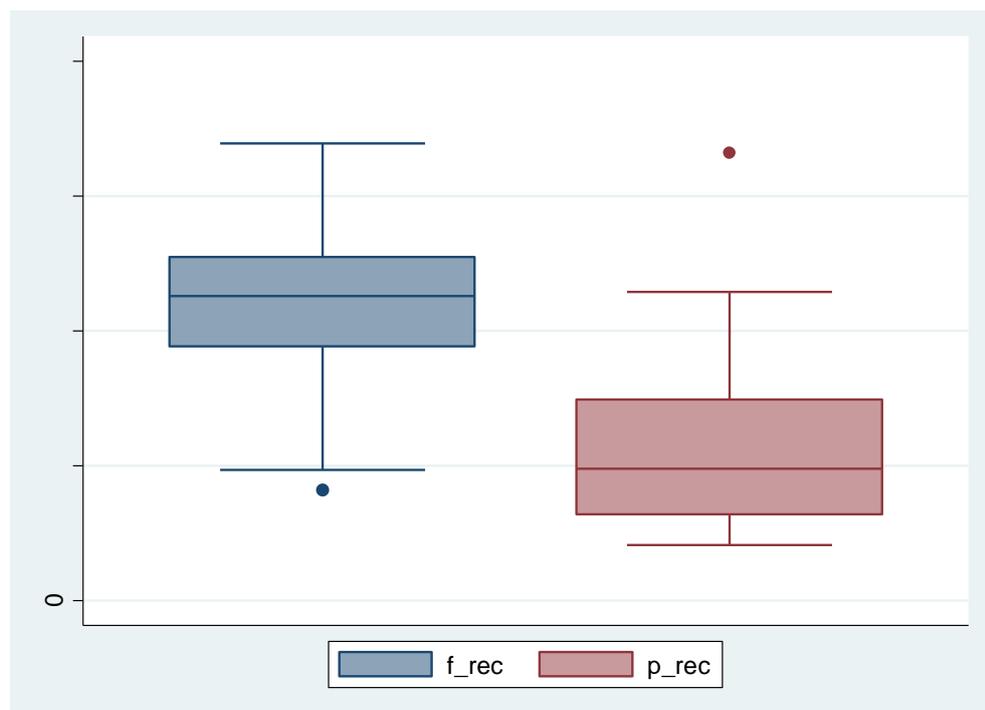


Figura 1. Comparación de la distribución de datos de recuento de PBL obtenidos por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

En la tabla 2 se muestran los hallazgos descriptivos para la viabilidad en PBL obtenida de la concentración por Ficoll-Hipaque y Percoll, y en contraste al parámetro de recuento estudiado anteriormente, se observa que la viabilidad es mucho mayor en el método por Percoll ( $71.3 \pm 15.3\%$ ), en comparación con el método de Ficoll-Hipaque ( $31.0 \pm 23.8\%$ ). La dispersión en este último fue muy grande, el cual se evidencia a través de sus valores mínimo y máximo (2.1 y 97.8), en comparación con el método de Percoll (32.2 y 95.4). También se muestran los valores de curtosis y asimetría, los cuales para el método de Ficoll-Hipaque se alejan de lo sugerido para una distribución normal, a diferencia de los obtenidos para la viabilidad por el método de Percoll, los cuales sugieren que siguen una distribución normal.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de la viabilidad de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Estadísticos	Viabilidad de PBL (%)	
	Ficoll	Percoll
N	30	30
Promedio	31.0	71.3
Desviación estándar	23.8	15.3
Mediana	32.6	71.4
Rango intercuartílico	35.3	19.9
Percentil 5	3.6	47.2
Percentil 25	10.2	63.4
Percentil 75	45.5	83.3
Percentil 95	84.6	93.6
Asimetría	0.87	-0.44
Curtosis	3.64	2.76

En el gráfico 2 se aprecia la distribución de la viabilidad en PBL obtenida por ambos métodos y nuevamente se muestra una clara diferencia en las medianas y rangos intercuantiles para ambos métodos.



Figura 2. Comparación de la distribución de datos de la viabilidad de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

El nivel de pureza de las PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque fue mayor ( $80.6 \pm 10.1\%$ ), en comparación con el obtenido por el método de Percoll ( $63.1 \pm 17.9\%$ ); y por ende fue inverso para el nivel de impurezas (otras células).

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de la pureza de PBL y otras células obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Estadísticos	Pureza de PBL y otras células (%)			
	PBL-F	PBL-P	Otras-F	Otras-P
N	30	30	30	30
Promedio	80.6	63.1	19.4	36.9
Desviación estándar	10.1	17.9	10.1	17.9
Mediana	80.2	59.4	19.9	40.6
Rango intercuartílico	11.6	22.1	11.6	22.1
Percentil 5	64.7	39.5	1	1
Percentil 25	73.8	51.1	14.6	26.8
Percentil 75	85.4	73.2	26.2	48.9
Percentil 95	99	99	35.3	60.5
Asimetría	0.26	0.57	-0.26	-0.57
Curtosis	2.49	2.71	2.49	2.71

También es apreciable que los valores de curtosis y asimetría para la pureza de PBL obtenida por ambos métodos se acercan a lo sugerido a una distribución normal.

En los gráficos 3 y 4 son complementarios, en el sentido que evalúan el nivel de pureza e impureza celular obtenida por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll. Se muestra una mediana mucho mayor para el nivel de pureza en el método de Ficoll-Hipaque en comparación con el método de Percoll.

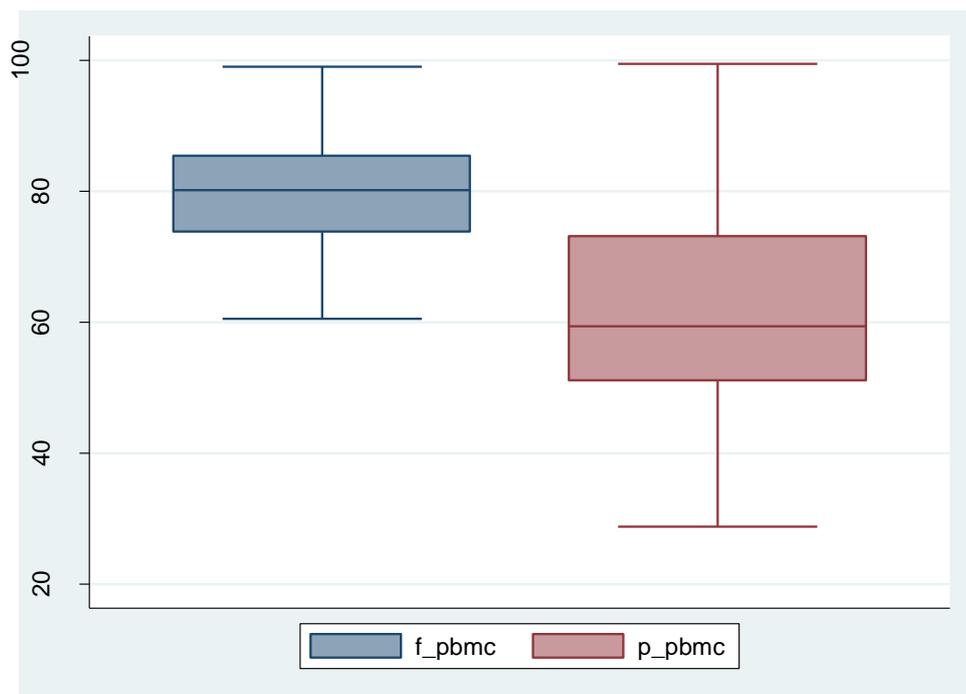


Figura 3. Comparación de la distribución de datos de la pureza de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Por consiguiente, en el gráfico 4 se muestra un mayor valor de la mediana para las impurezas (otras células distintas a las PBL, tales como neutrófilos) obtenidas por el método de Percoll, en comparación con el método de Ficoll-Hipaque.

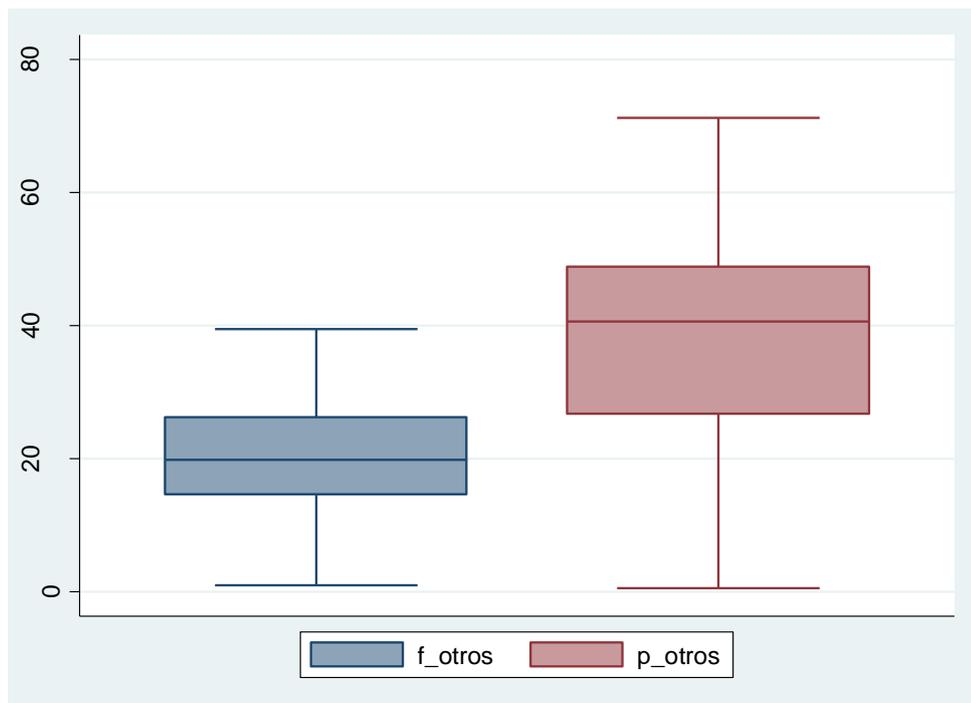


Figura 4. Comparación de la distribución de datos de las impurezas (otras células) obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

En la Tabla 4 se muestra el análisis de normalidad de datos empleando la prueba de Shapiro-Wilk, el cual señala distribución normal para aquellos valores de probabilidad mayores a 0.05; por ende, los datos obtenidos para viabilidad por Ficoll-Hipaque y recuento por Percoll, no siguen distribución normal.

Tabla 4. Evaluación de la normalidad de datos obtenidos por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll

Variable	Prueba de Shapiro-Wilk				
	N	W	V	z	p-valor
Viab-F	30	0.90020	3.172	2.387	<b>0.00849</b>
Viab-P	30	0.96799	1.018	0.036	0.48564
Rcto-F	30	0.95416	1.457	0.778	0.21818
Rcto-P	30	0.86780	4.202	2.968	<b>0.00150</b>
PBL-F	30	0.96928	0.977	-0.049	0.51955
PBL-P	30	0.96180	1.214	0.401	0.34418
Otras-F	30	0.94281	1.818	1.236	0.10828
Otras-P	30	0.94281	1.818	1.236	0.10828

El análisis de normalidad fue importante para evaluar el cumplimiento de los supuestos para la aplicación de la prueba t-student para igualdad de medias (distribución normal, igualdad de varianzas, independencia de mediciones y aleatoriedad). En el caso del no cumplimiento, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para igualdad de medianas.

En la tabla 5 se muestra los resultados de la igualdad de varianzas entre los resultados de recuento de PBL por ambos métodos, la cual fue evaluada por la prueba F, la cual evidencia que las varianzas no son iguales y existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ellas, dato importante para la evaluación posterior con la prueba t-student con varianzas desiguales.

Tabla 5. Evaluación de la igualdad de varianzas para la pureza de PBL obtenidas por ambos métodos

Variable	Radio de varianzas				
	Promedio	EE	DE	IC95%	
PBL-F	80.6	1.85	10.14	76.85	84.43
PBL-P	63.1	3.28	17.9	56.37	69.77
Combinado	71.9	2.19	16.95	67.47	76.23

EE: Error estándar; DE: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

p-valor=0.0030 (Ha: ratio  $\neq$  1)

En la Tabla 6 se muestra los resultados de la evaluación de varianzas para el recuento de otras células (impurezas) distintas a las PBMC, y se aprecia que el valor de la probabilidad a la prueba F, es menor a 0.05, por ende las varianzas no son iguales.

Tabla 6. Evaluación de la igualdad de varianzas para el recuento de otras células obtenidas por ambos métodos

Variable	Radio de varianzas			
	Promedio	EE	DE	IC95%
Otras-F	19.4	1.85	10.14	15.57 23.15
Otras-P	36.9	3.28	17.94	30.23 43.63
Combinado	28.1	2.19	16.95	23.77 35.52

EE: Error estándar; DE: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

p-valor=0.0030 (Ha: ratio  $\neq$  1)

En la tabla 7 se evalúan las medianas de los resultados de recuento de PBL obtenidos por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, y se evidencia que existe diferencia muy significativa ( $p < 0.001$ ) entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

Tabla 7. Comparación de resultados de recuento de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Método	Prueba de suma de rangos (Mann-Whitney)		
	N	Suma de rangos	Esperado
Ficoll	30	1253.5	915
Percoll	30	576.5	915
Combinado	60	1830	1830

p-valor=0.0000 (z=5.005)

En la tabla 8 se evalúan las medianas de los resultados de viabilidad de PBL obtenidos por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, también mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, y se evidencia que existe diferencia muy significativa ( $p < 0.001$ ) entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

Tabla 8. Comparación de resultados de la viabilidad de PBL obtenida por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Método	Prueba de suma de rangos (Mann-Whitney)		
	N	Suma de rangos	Esperado
Ficoll	30	539	915
Percoll	30	1291	915
Combinado	60	1830	1830

p-valor=0.0000 (z=-5.559)

En la tabla 9 de muestra el análisis de la prueba t-student con varianzas desiguales, el cual permitió evidenciar que el promedio de pureza de PBL obtenida por el método de Ficoll-Hipaque es diferente con alta significancia ( $p < 0.001$ ) comparada a la obtenida por el método de Percoll.

O sea, se obtienen concentrados de PBL con más pureza por el método de Ficoll-Hipaque, que con el método de Percoll.

Tabla 9. Evaluación de igualdad de medias para la pureza de PBL obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

Grupo	Prueba T con varianzas desiguales				
	Promedio	EE	DE	IC95%	
Ficoll	80.64	1.85	10.14	76.85	84.43
Percoll	63.07	3.27	17.94	56.37	69.77
Combinado	71.85	2.19	16.95	67.48	76.23
Diferencia	17.57	3.76		10.00	25.14

EE: Error estándar; DE: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

p-valor=0.0000 (Ha: diferencia  $\neq$  0)

En la tabla 10 de muestra el análisis de la prueba t-student con varianzas desiguales, el cual evidenció que el promedio de impureza de PBL obtenida por el método de Ficoll-Hipaque es diferente significativamente ( $p < 0.001$ ) comparada a la obtenida por el método de Percoll.

Tabla 10. Evaluación de igualdad de medias para las impurezas (otras células diferentes a PBL) generadas de los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll

Grupo	Prueba T con varianzas desiguales				
	Promedio	EE	DE	IC95%	
Ficoll	19.36	1.85	10.14	15.57	23.15
Percoll	36.93	3.28	17.94	30.23	43.63
Combinado	28.15	2.19	16.95	23.77	32.53
Diferencia	-17.57	3.76		-25.14	35.53

EE: Error estándar; DE: Desviación estándar; IC: Intervalo de confianza

p-valor=0.0000 (Ha: diferencia  $\neq$  0)

En el gráfico 5 se muestra la dispersión de datos obtenidos para el recuento de PBL por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, observándose una correlación lineal positiva por ambos métodos.

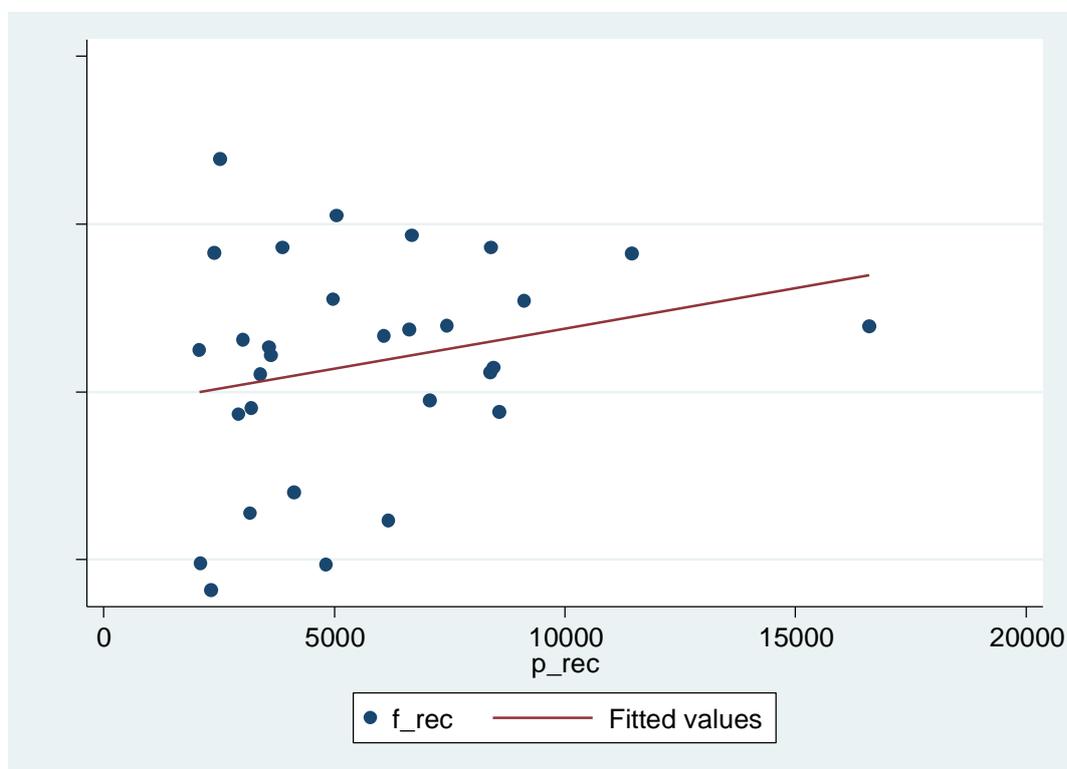


Figura 5. Dispersión de datos para el recuento de PBL obtenido por ambos métodos.

En la tabla 11 se muestra el nivel de correlación entre los resultados de recuento de PBL obtenidos por ambos métodos, siendo en general de

un nivel bajo ( $\rho=0.271$ ), y además sus resultados son independientes entre si ( $p>0.05$ ).

Tabla 11. Correlación entre los resultados de recuento de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

N	30
Rho de Spearman	0.2712
p-valor=0.1471 (Ho=las variables son independientes)	

En el gráfico 6 se muestra la dispersión de datos obtenidos para la viabilidad de PBL por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, observándose una correlación lineal positiva por ambos métodos.

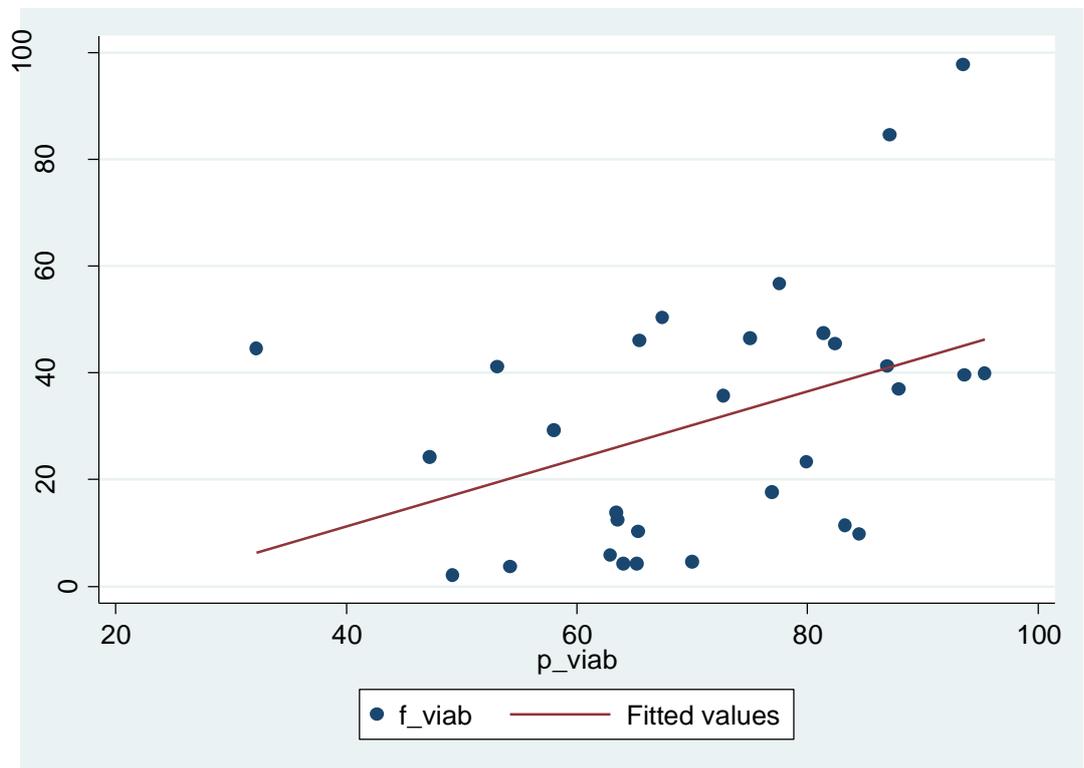


Figura 6. Dispersión de datos para la viabilidad de PBMC obtenido por ambos métodos.

En la tabla 12 se muestra el nivel de correlación entre los resultados de viabilidad de PBL obtenidos por ambos métodos, siendo en general de un nivel moderado ( $\rho=0.430$ ), y además sus resultados no son independientes entre si ( $p<0.05$ ).

Tabla 12. Correlación entre los resultados de viabilidad de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

N	30
Rho de Spearman	0.4299
p-valor=0.0177 (Ho=las variables son independientes)	

En el gráfico 7 se muestra la dispersión de datos obtenidos para la pureza de PBL por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, observándose una correlación lineal positiva por ambos métodos.

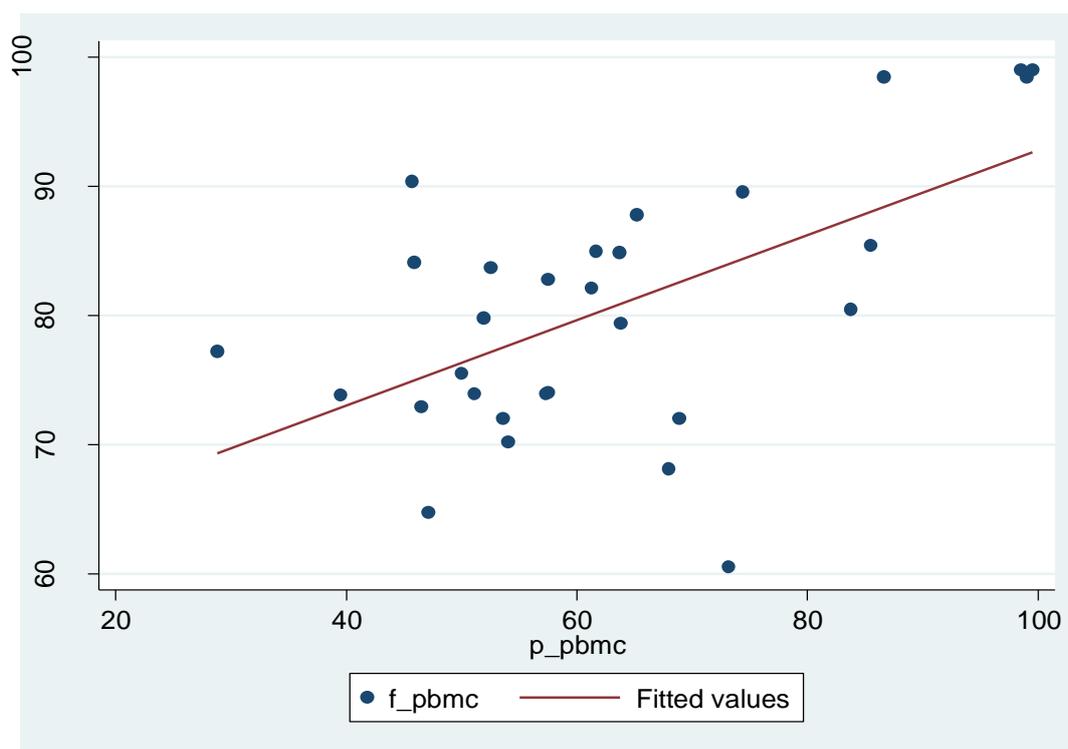


Figura 7. Dispersión de datos para la pureza de PBMC obtenido por ambos métodos.

En la tabla 13 se muestra el nivel de correlación entre los resultados de pureza de PBL obtenidos por ambos métodos, siendo en general de un nivel moderado ( $\rho=0.583$ ), y además sus resultados no son independientes entre si ( $p<0.001$ ).

Tabla 13. Correlación entre los resultados de pureza de PBL obtenido por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

	PBL-F	PBL-P
PBL-F	1.0000	
PBL-P	0.5831*	1.0000

\*Correlación de Pearson (R)

En el gráfico 8 se muestra la dispersión de datos obtenidos para las impurezas (otras células distintas a las PBL) por los métodos de Ficoll-Hipaque y Percoll, observándose una correlación lineal positiva por ambos métodos.

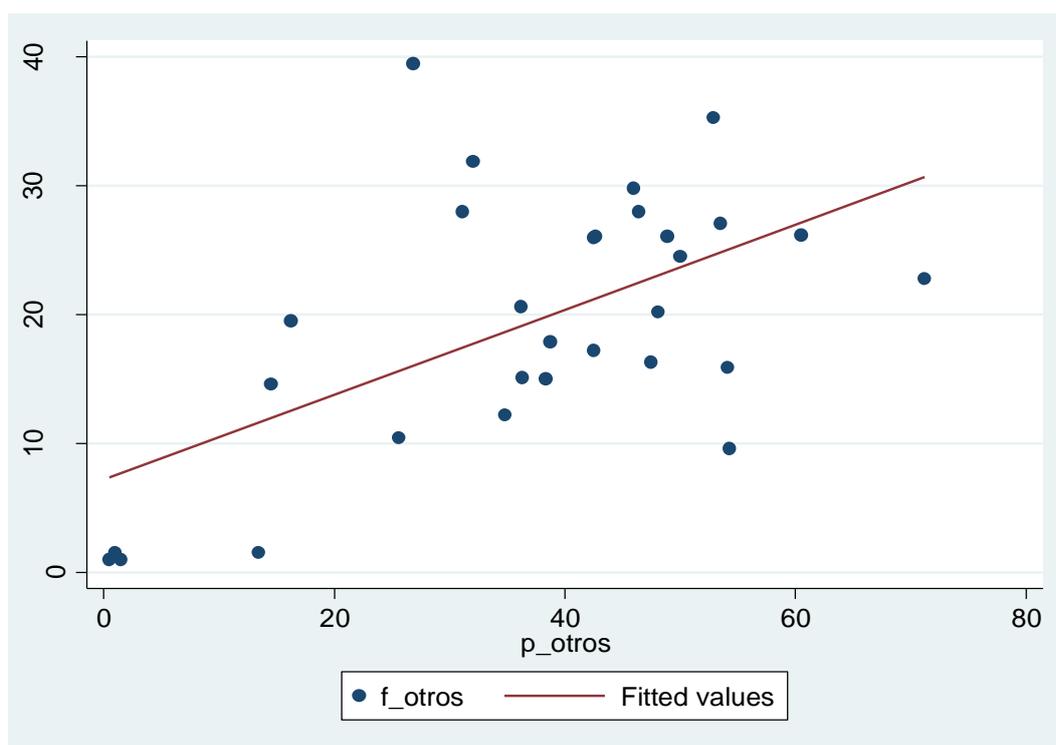


Figura 8. Dispersión de datos para las impurezas obtenidas por ambos métodos.

En la tabla 14 se muestra el nivel de correlación entre los resultados de impurezas obtenidas por ambos métodos, siendo en general de un nivel moderado ( $R=0.583$ ), y además sus resultados no son independientes entre si ( $p<0.001$ ).

Tabla 14. Correlación entre los resultados de impurezas obtenidas por el método de Ficoll-Hipaque y Percoll

	Otras -F	Otras -P
Otras-F	1.0000	
Otras -P	0.5831* 0.0007	1.0000

\*Correlación de Pearson (R)

## 5.2. Discusión de resultados

Los hallazgos encontrados en la presente tesis constituyen una importante fuente de conocimiento sobre la importancia de seleccionar adecuadamente los métodos de extracción y purificación de PBL para diversos ensayos, enmarcados en roles de diagnóstico in vitro e investigación y desarrollo (R&D). Los datos evidencian que el empleo de las gradientes con ficoll-hipaque permiten una mejor recuperación y aislamiento de PBL a partir de sangre total, en comparación con las gradientes de percoll. Estos datos son distintos a lo reportado en la literatura científica, donde el uso de las gradientes de percoll resultaron más eficientes que el ficoll-hipaque en aislar y concentrar células mesenquimales (13) y formadoras de colonia (54) derivadas de médula ósea roja. Sin embargo, hay que precisar que el método de extracción de PBL con ficoll-hipaque funciona muy bien cuando las muestras de sangre provienen de personas saludables; caso contrario sucede cuando las muestras provienen de personas con enfermedades tales como infecciones, enfermedades oncohematológicas, entre otras. Además, se ha reportado otros inconvenientes tales como el nivel de impurezas generado en el procedimiento, la cual se evidencia con presencia de otros elementos celulares como plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos (55). Estos hallazgos reportados en otras investigaciones, fue opuesto a lo encontrado en la tesis de investigación, la cual evidencia que el método de ficoll-hipaque recupera PBL con un nivel de pureza mayor a la del percoll; aunque con algunas limitaciones, ya que el nivel promedio alcanzado llega al 80%, mientras que el método de percoll a un 60%.

La evaluación del recuento de PBL obtenido por ambos métodos fue crucial en este estudio, sin embargo una característica que es fundamental para la mayoría de ensayos que utilizan como plataforma de trabajo PBL, es la viabilidad celular. Esta característica es evaluada como requisito básico en los estudios que implican cultivo celular y evaluación de condiciones fisiológicas de las células. Las evidencias de la tesis, muestran que la viabilidad promedio en PBL fue mayor en aquellas obtenidas por el método de percoll, en comparación con el método de ficoll-hipaque, con diferencias altamente significativas. Una posible explicación de este fenómeno, es que durante el proceso de extracción de PBL con el método de ficoll-hipaque (el cual es hidrosoluble e ingresa fácilmente a las células y deja remanentes en la suspensión de trabajo) exista remanentes de hemoglobina provenientes de eritrocitos lisados que no sedimentaron completamente, lo cual pudo haber inducido a la liberación del hierro divalente y su posterior oxidación vía reacción de Fenton, y por ende la producción de una gran cantidad de radicales libres como el ion peróxido, oxidrilo y singlet oxígeno, los cuales es conocido el potencial que tienen para lipoperoxidar membranas celulares (56), en particular las de PBL, induciendo citotoxicidad, la cual fue evidenciada en la dramática disminución de la viabilidad celular (57), la cual en el caso de la tesis llegó a un nivel promedio cercano al 33%. Caso contrario, se observó en la extracción con el método de percoll, el cual obtuvo una viabilidad promedio cercana al 72%, casi comparable a lo reportado en estudios similares, donde se evaluaron citotoxicidad celular (58). La explicación del porqué la viabilidad es mucho mayor con el método de percoll que con el ficoll-hipaque, radica en las características químicas y físicas del percoll (37-39), el cual por su naturaleza coloidal y efecto de gradiente en condiciones isopícnicas, permiten obtener una viabilidad en PBL mayor (40); además hay que señalar que el percoll es una sustancia no tóxica, posee una fuerza de ionización estable en condiciones de pH neutro e incluso en variaciones del mismo, no penetra a las membranas celulares y es fácilmente removible de soluciones en suspensión.

Finalmente, se puede mencionar que la selección para el uso de la técnica de gradiente por ficoll-hipaque o percoll dependerá del procedimiento experimental que se requiera, teniendo en cuenta que existen algunos que exigen al menos 10000 pbl/ $\mu$ L, en el cual sería ideal la técnica de ficoll-hipaque, y otros ensayos requieren que la viabilidad promedio de las células tenga al menos un 80% de viabilidad, en cuyo caso sería más lógico aplicar la técnica de gradiente por percoll. Por consiguiente, ambos métodos presentan bondades dentro de cada aplicación que se vaya a utilizar, así como algunas limitaciones que hay que tener en cuenta antes de emplearlas.

## CONCLUSIONES

- ✓ Existen diferencias significativas entre las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana.
- ✓ El recuento linfocitario obtenido por la técnica de gradiente de ficoll-hipaque es mayor con diferencia significativa en comparación a la técnica de gradiente de percoll.
- ✓ La viabilidad linfocitaria obtenida por la técnica de gradiente de percoll es mayor con diferencia significativa en comparación a la técnica de gradiente de ficoll-hipaque.
- ✓ El nivel de impurezas celulares generadas por la técnica de gradiente de ficoll hipaque es menor comparada con la técnica de percoll.

## RECOMENDACIONES

### **A la comunidad científica:**

- La técnica de concentración de linfocitos por ficoll-hipaque debería ser aplicada en procedimientos que requieran recuentos elevados, tales como los moleculares (donde hay que extraer una concentración importante de ADN, incluso a veces mayores a 10 ng/μL) y citogenéticos (para garantizar que el cultivo de linfocitos pueda alcanzar un número superior a las 100 metafases requeridas para la lectura y reporte de cariotipo).
- La técnica de concentración de linfocitos por percoll debería ser aplicada en procedimientos donde se requiera garantizar la viabilidad celular por encima del 80%, tal como sucede con los experimentos para evaluar citotoxicidad celular y construir curvas de dosis-respuesta.

### **Al laboratorio del Hospital Santa María del Socorro de Ica:**

- Las técnicas de extracción de linfocitos podría servir como base para métodos de diagnóstico in vitro que puedan implementarse posteriormente, como áreas en citogenética, biología molecular o hematología especial.

## REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

1. David, L.G. Dibner, M.D.& Battery, J.F. Bassin methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co. Ind. NY. 1986
2. Oliveira Naila Francis Paulo de, Dolder Mary Anne Heidi, Genari Selma Candelária. Light microscope observation of circulating human lymphocytes cultured in vitro. Braz. arch. biol. technol. 2010;53(5):1097-1100. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000500013>
3. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2003), Cellular and Molecular Immunology. 4 ed. W.B Saunders Company.pp.18
4. English D, Andersen BR: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 5:249, 1974
5. Hjorth, R., Jonsson, A.K., Vretblad, P. (1981), A rapid method for purification of human granulocytes using percoll. A comparison with dextran sedimentation. J. Immunol. Methods, 43 (1), 95-101.
6. Minami R, Yokota S, Teplitz RL. Gradient separation of normal and malignant cells. II. Application to in vivo tumor diagnosis. Acta Cytol. 1978 Nov-Dec;22(6):584-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/282758>
7. Fong CY, Peh G, Subramanian A, Gauthaman K, Bongso A. The use of discontinuous density gradients in stem cell research and application. Stem Cell Rev. 2009 Dec;5(4):428-34. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20058205>
8. Mot AC, Damian G, Sarbu C, Silaghi-Dumitrescu R. Redox reactivity in propolis: direct detection of free radicals in basic medium and interaction with hemoglobin. Redox Rep. 2009;14(6):267-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003712>
9. Rifkind JM, Ramasamy S, Manoharan PT, Nagababu E, Mohanty JG. Redox reactions of hemoglobin. Antioxid Redox Signal. 2004 Jun;6(3):657-66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130293>

10. Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J.* 2009 May-Jun;32(3):264-75. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19527605>
11. Yeo C, Saunders N, Locca D, Flett A, Preston M, Brookman P, Davy B, Mathur A, Agrawal S. Ficoll-Paque versus Lymphoprep: a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations. *Regen Med.* 2009 Sep;4(5):689-96. doi: 10.2217/rme.09.44. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19761394>
12. Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie JP, Lavery S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.* 2010 Sep;42(6):519-27. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716192>
13. Pösel C, Möller K, Fröhlich W, Schulz I, Boltze J, Wagner D-C. Density Gradient Centrifugation Compromises Bone Marrow Mononuclear Cell Yield. Pelacho B, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e50293. doi:10.1371/journal.pone.0050293. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516517/>
14. Chilvers RA, Bodenbug YH, Denner LA, Urban RJ. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2012;29(6):547-556. doi:10.1007/s10815-012-9739-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3370046/>
15. *Inmunobiologia.* 5a ed. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Ed. Masson, 2003.
16. *Inmunologia.* 5a ed. Roitt I, Brostoff J, Male D. Ed. Hartcourt, 2000.
17. *Inmunologia Celular y Molecular.* 5a ed. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Ed. Elsevier, 2003.
18. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;740:1-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468961>

19. Åkerström, G., Grimelius, L., Johansson, H. et al. Estimation of parathyroid parenchymal cell mass using density gradients., *Am. J. Pathol.* 1980;99:685-94
20. Watt, S.M., Burgess, A.W. and Metcalf, D. Isolation and surface labeling of murine polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell Physiol.* 1979;100:1-22
21. Salzman GC, Crowell JM, Martin JC, Trujillo TT, Romero A, Mullaney PF, LaBauve PM. Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytol.* 1975 Jul-Aug;19(4):374-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/808927>
22. Basu, S., Campbell, H. M., Dittel, B. N., Ray, A. Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). *J. Vis. Exp.* 2010;(41):1546
23. Håkan Pertoft, Torvard C. Laurent. Isopycnic Separation of Cells and Cell Organelles by Centrifugation in Modified Colloidal Silica Gradients. *Methods of Cell Separation. Part of the series Biological Separations.* 1977:25-65. Disponible en: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4684-0820-1\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4684-0820-1_2)
24. Gutierrez C, Bernabe RR, Vega J, Kreisler M. Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J Immunol Methods.* 1979;29(1):57-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/226632>
25. Shiono H, Ito Y. Novel method for continuous cell separation by density gradient centrifugation: evaluation of a miniature separation column. *Prep Biochem Biotechnol.* 2003 May;33(2):87-100. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12784880>
26. Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and lysosomes by density gradient centrifugation. Seale, T.W. In *Manual of Procedures for the Seminar on Biochemical Hematology*, (Sunderman, F.W., Ed.) The Institute for Clinical Science Inc., Philadelphia, PA. 1979: 355-67.
27. Grosse J, Meier K, Bauer TJ, Eilles C, Grimm D. Cell separation by countercurrent centrifugal elutriation: recent developments. *Prep Biochem Biotechnol.* 2012;42(3):217-33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509848>

28. Kauffman MG, Noga SJ, Kelly TJ, Donnenberg AD. Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation. *Anal Biochem.* 1990 Nov 15;191(1):41-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2077941>
29. Neurauter AA, Bonyhadi M, Lien E, Nøkleby L, Ruud E, Camacho S, Aarvak T. Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;106:41-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17680228>
30. Lee MY, Lufkin T. Development of the “Three-step MACS”: a Novel Strategy for Isolating Rare Cell Populations in the Absence of Known Cell Surface Markers from Complex Animal Tissue. *Journal of Biomolecular Techniques* : JBT. 2012;23(2):69-77. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336840/>
31. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;106:19-39. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728993>
32. Haff, L.A. Production of Ficoll, Percoll and albumin gradients by the freeze-thaw method. *Prep. Biochem.* 1979;9:149-56
33. Bøyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. (Paper IV). *Scand. J., Clin. Lab. Invest.* 1968; 21(97):77-89
34. Bøyum, A. Isolation of leucocytes from human blood - further observations. (Paper II). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968;21(97):31-50
35. Bøyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J., Immunol.* 1976;5(5):9-15.
36. Hokland, P., Heron, I. Analysis of the lymphocyte distribution during Isopaque-Ficoll isolation of mononuclear cells from human peripheral blood. *J. Immunol. Methods.* 1980;32:31-9.
37. Laurent, T.C., Pertoft, H. and Nordli, O. J. Physical chemical characterization of Percoll. I. Particle weight of the colloid. *Colloid Interface Sci.* 1980;76, 124-32
38. Laurent, T.C., Ogston, A.J.G., Pertoft, H. et al. Physical chemical characterization of Percoll. II. Size and interaction of colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.* 1980;76,133-41

39. Laurent, T.C. and Pertoft, H. J. Physical chemical characterization of Percoll. III. Sodium binding. Colloidal Interface Sci. 1980;76:142-5
40. Pertoft, H., Rubin, K., Kjellén, L. et al. The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll. Exp. Cell Res. 1977;110, 449-57
41. Pertoft, H., Laurent, T.C., Seljelid, R. et al. The use of density gradients of Percoll for the separation of biological particles. In Separation of Cells and Subcellular Elements, (Peeters, H., Ed.) Pergamon Press Oxford and New York 67-72. 1979
42. International Organization for Standardization. ISO 15189:2012. Medical laboratories -- Requirements for quality and competence. Disponible en: [http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail?csnumber=56115](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=56115)
43. International Organization for Standardization. ISO 9001:2015: Quality management systems - Requirements. Geneva Switzerland. 2015. Disponible en: [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=62085](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=62085)
44. International Organization for Standardization. ISO 15189:2012. Medical laboratories - Requirements for quality and competence. 2012. Disponible en: [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=56115](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=56115)
45. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005. Disponible en: [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=39883](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=39883)
46. World Health Organization. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP). 2008. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/gclp-web.pdf>
47. Ministerio de Salud. Ley N° 26842: Ley General de Salud. 1997. Disponible en: [ftp://ftp.minsa.gob.pe/intranet/leyes/L-26842\\_LGS.pdf](ftp://ftp.minsa.gob.pe/intranet/leyes/L-26842_LGS.pdf)

48. Ministerio de Salud. Norma Técnica de Salud N° 021-MINSA/DGSP versión 1.0. 2011. Disponible en: [ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2012/RM546\\_2011\\_MINSA.pdf](ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2012/RM546_2011_MINSA.pdf)
49. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI). Norma Técnica Peruana ISO 15189:2004. Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.
50. Ministerio de Salud. RM N° 588-2005- MINSA. Listados de Equipos Biomédicos Básicos para Establecimientos de Salud. 2005. Disponible en: <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2005/RM588-2005Iparte.pdf>
51. Ministerio de Salud. Norma Técnica Peruana N° 050-MINSA/DGSP- versión 02. 2007. Disponible en: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/dgsp/000\\_normaacreditacion.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/dgsp/000_normaacreditacion.pdf)
52. Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección de Servicios de Salud. Norma técnica de salud de la unidad productora de servicios de patología clínica. NTS N° 072-MINSA/DGSP- versión 01. 2009. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1457.pdf>
53. Instituto Nacional de Salud 2003. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Lima, Perú. Disponible en: [http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud\\_publica/nor\\_tec/37.pdf](http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/37.pdf)
54. Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie JP, Laverty S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. Equine Vet J. 2010 Sep;42(6):519-27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716192>
55. Perper, R.J., Zee, T.W., Mickelson, M.M. Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. J. Lab. Clin. Med. 1968;72,842-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5697393>
56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>

57. Maria E. Ariza, Gautam N. Bijur, Marshall V. Williams. Environmental Metal Pollutants, Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity: Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity. Springer Science & Business Media, Dec 6, 2012 - 189 pp. Disponible en: <http://www.springer.com/gp/book/9780792384489>
58. Kurnick, J.T., Grönvik, K.-O., Kimura, A.K. et al. Long term growth in vitro of human T cell blasts with maintenance of specificity and function. J. Immunol. 1979;122,1255-60. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/122/4/1255>

## ANEXOS

### ANEXO 01: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADORES	VALOR FINAL	ESCALA	TECN. E INSTRUM.
Gradiente de ficoll hipaque	Método isopícnico para separar células mononucleares de sangre periférica, sobre todo linfocitos, en base a un solo gradiente de densidad (1.077)	Recuento de linfocitos en hemocitómetro	Número de linfocitos / uL % viabilidad celular / 200 linfocitos	Numérica de razón	Microscopía binocular de luz visible
Gradiente de percoll	Método isopícnico para separar células mononucleares de sangre periférica, sobre todo linfocitos, en base a tres gradientes de densidad (1.065, 1.077 y 1.083)	Recuento de linfocitos en hemocitómetro	Número de linfocitos / uL % viabilidad celular / 200 linfocitos	Numérica de razón	

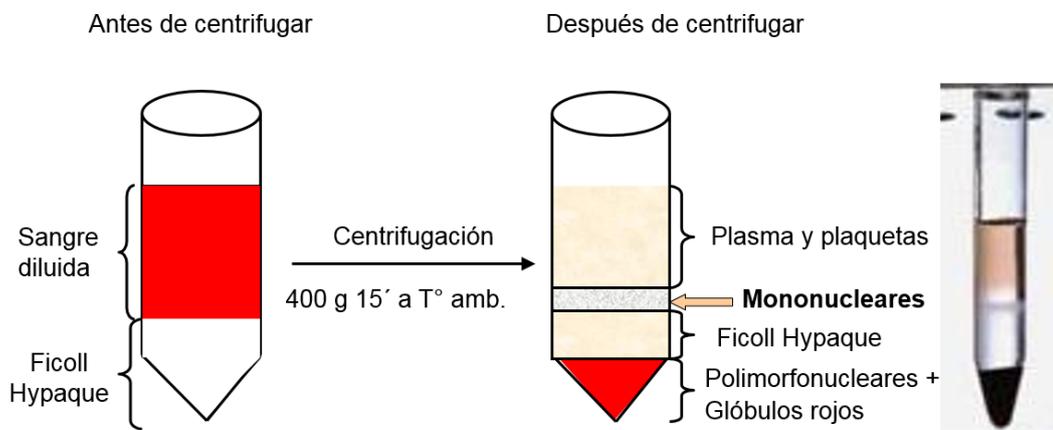
## ANEXO 02: MATRÍZ DE CONSISTENCIA

**TÍTULO:** COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE GRADIENTE DE PERCOLL Y FICOLL-HIPAQUE PARA EL AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA HOSPITAL SANTA MARIA DEL SOCORRO ICA

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	INSTRUMENTOS
<p><b>General:</b> ¿Existen diferencias significativas entre las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana, Hospital Santa María del Socorro Ica?</p> <p><b>Específico:</b> ¿Existe diferencia significativa en el recuento de linfocitos obtenidos por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica?</p> <p>¿Existe diferencia significativa en la viabilidad linfocitaria obtenida por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica?</p> <p>¿Cuál es el nivel de impurezas celulares generadas por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica?</p>	<p><b>General:</b> Comparar las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana, Hospital Santa María del Socorro Ica</p> <p><b>Específico:</b> Evaluar el recuento de linfocitos obtenidos por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica</p> <p>Evaluar la viabilidad linfocitaria obtenida por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica</p> <p>Evaluar el nivel de impurezas celulares generadas por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica</p>	<p><b>General:</b> Existen diferencias significativas entre las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana, Hospital Santa María del Socorro Ica.</p> <p><b>Específico:</b> Existe diferencia significativa en el recuento de linfocitos obtenidos por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica.</p> <p>Existe diferencia significativa en la viabilidad linfocitaria obtenida por las técnicas de gradiente de percoll y ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica.</p> <p>El nivel de impurezas celulares generadas por la técnica de gradiente de percoll es menor comparada con la técnica de ficoll hipaque, Hospital Santa María del Socorro Ica.</p>	<p>Gradiente de ficoll-hipaque</p> <p>Gradiente de percoll</p>	<p>Microscopía binocular de luz visible</p>

### ANEXO 03: OBTENCIÓN DE LINFOCITOS POR GRADIENTE DE FICOLL-HIPAQUE

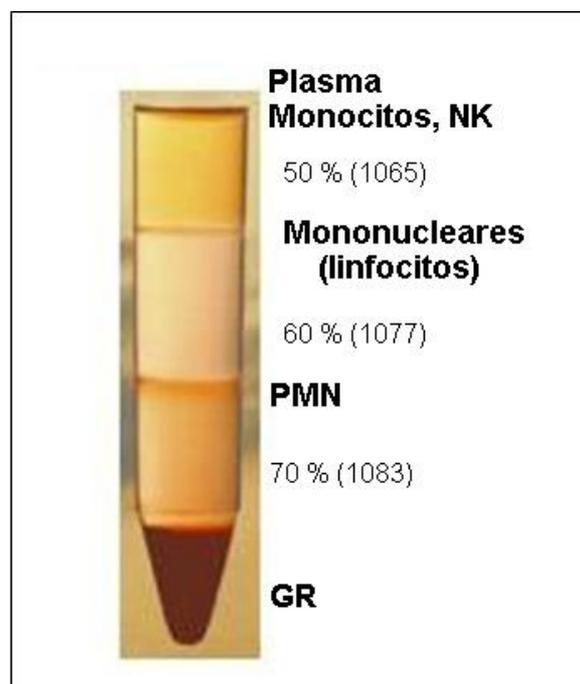
1. Agregar 3mL de Histopaque (densidad 1.077 g/mL) en un tubo de 15mL.
2. Agregar en zona 3 mL de sangre con heparina.
3. Centrifugar a 400g por 30 minutos a 4°C.
4. Luego del período de centrifugación se formará una banda de PBMCs en el tubo.
5. Extraer 500uL de la banda de PBMCs con una micropipeta de 1000uL.
6. Verter la suspensión celular sobre otro tubo y agregar sobre él 500uL de buffer fosfato salino (PBS).
7. Centrifugar a 500g por 15 minutos a 4°C.
8. Luego de la centrifugación, eliminar el sobrenadante con cuidado.
9. Resuspender las células (pellet) en 5-10mL con PBS
10. Centrifugar a 500g por 15 minutos a 4°C.
11. Resuspender las células (pellet) en 500 uL de PBS



**Monocleares: Linfocitos + monocitos**

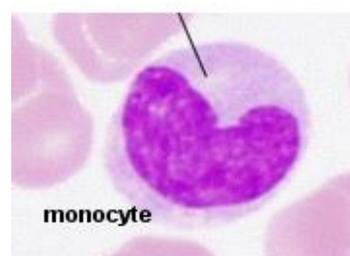
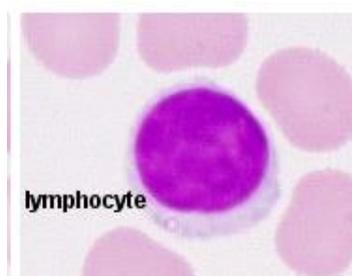
#### **ANEXO 04: OBTENCIÓN DE LINFOCITOS POR GRADIENTE DE PERCOLL**

1. Preparar los gradientes de percoll al 50% (1.065 g/mL), 60% (1.077 g/mL) y 70% (1.083) usando como diluyente Buffer de Hanks o PBS, y homogenizar con Vórtex cada solución. Depositar en un tubo cónico 1.5 mL de percoll 70%, luego 1.5 mL de percoll 60% y finalmente 1.5 mL de percoll 30%. Cada solución de percoll debe ser depositada cuidadosamente por los bordes de las paredes del tubo con una ligera inclinación.
2. Centrifugar a 2200 rpm x 10 minutos.
3. Después de la centrifugación se observa un anillo de color amarillo y turbio entre las interfases del percoll de 50 y 60%; del cual se obtiene cuidadosamente con una micropipeta dicho anillo donde teóricamente se hallan los linfocitos.
4. Este pequeño volumen del anillo se deposita en un tubo cónico para ser lavado una o dos veces con buffer de Hank o PBS para mantener más viables a los linfocitos además de crear un ambiente de presión osmótica isotónica.



## ANEXO 05: TINCIÓN DE WRIGHT

1. De los pellets obtenidos por el método de ficoll-hipaque y percoll, preparar extendidos sobre láminas portaobjetos, dejarlos secar al aire y proceder con la tinción de Wright.
2. Colocar el frotis secado al aire sobre una rejilla o cubeta de tinción con la sangre hacia arriba.
3. Cubrir completamente el portaobjetos o cubreobjetos con el colorante de Wright gota a gota. Dejarlo que permanezca en el frotis aproximadamente de 5-8 minutos, para fijar los glóbulos sanguíneos. El colorante deberá cubrir completamente el portaobjetos, pero no debe derramarse por los bordes. Deberá agregarse una cantidad adicional si éste se comienza a evaporar.
4. Agregar directamente al colorante un volumen igual de amortiguador de Wright, para evitar la coloración débil. Esperar la formación de brillo metálico. Puede usarse de igual manera agua desionizada. Dejar actuar de 10-15 minutos.
5. Lavar con agua en el chorro cuidadosamente hasta que la extensión presente un aspecto rosado al examinarlo a simple vista.
6. Limpiar el dorso del portaobjetos con una gasa o algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier resto de colorante.
7. Secar al aire y observar con el microscopio con el objetivo de inmersión.
8. Los linfocitos deberán ser diferenciados de los monocitos sobre un recuento de 200 células.



## **ANEXO 06: DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CON TRYPAN BLUE**

1. Preparar la solución de trabajo de Trypan Blue al 0.04%, para lo cual se diluirá la solución comercial de Trypan Blue (0.4%) por un factor de dilución de 10 con PBS 1X. Almacenar la solución de trabajo de Trypan Blue a 4°C.
2. Resuspender 10uL de la suspensión celular con 90 µL de la solución de la solución de trabajo de Trypan Blue en un microtubo de 0.6 mL.
3. Agregar 10 uL de la mezcla a la cámara de Neubauer y evaluar al microscopio de luz visible.
4. La viabilidad es observada luego de 5 minutos después del tratamiento.
5. Las células no viables se visualizan de color azul, mientras que las células sin coloración se observan incoloras.
6. Se contabilizan todas las células contenidas en los 4 cuadrantes de los extremos de la cámara de Neubauer, correspondiente a leucocitos a la vez que se realiza el recuento celular.

**Nota:** La cámara de Neubauer se limpiará inmediatamente luego de su uso, para lo cual se deberá exponer la corriente de agua de caño y luego se limpiará con papel lente y alcohol isopropílico. Se mantendrá boca abajo sobre papel lente hasta que haya secado completamente. No restregar.

### ANEXO 07: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código de muestra	Fecha de la prueba	Hora de la prueba	Recuento de linfocitos		Viabilidad celular	
			Ficoll-Hipaque	Percoll	Ficoll-Hipaque	Percoll
			Linfocitos/uL	Linfocitos/uL	%	%
M-01						
M-02						
M-03						
M-04						
M-05						
M-06						
M-07						
M-08						
M-09						
M-10						
M-11						
M-12						
M-13						
M-14						
M-15						
M-16						
M-17						
M-18						
M-19						
M-20						
M-21						
M-22						
M-23						
M-24						
M-25						
M-26						
M-27						
M-28						
M-29						
M-30						

**ANEXO 08: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA AISLAMIENTO DE MONONUCLEARES**

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: N° 1</b>
		<b>FECHA</b>
		<b>Página : 1 de 9</b>

**AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE**

ELABORADO POR : Lic. T.M. Jorge Luis Inolopú Cucche	
REVISADO POR : Mg. T.M. Jaime Rosales	
APROBADO POR : Dra María del Carmen Gastañaga Ruiz	
RESOLUCIÓN JEFATURAL N°:	Fecha:

Ejemplar N°:.....

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: N° 1</b>
		<b>FECHA</b>
		Página : 2 de 7

## 1.0 OBJETIVO

Aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante centrifugación en gradiente y realizar el recuento celular con una cámara de Neubauer.

## 2.0 CAMPO DE APLICACIÓN

Dirigido a investigadores involucrados a las actividades de biología celular y molecular del Laboratorio Clínico del CENSOPAS y aplicado a pruebas de biología celular.

## 3.0 REFERENCIAS O BASE LEGAL

- 3.1 Ley N° 26842 Ley General de Salud.
- 3.2 Ley N° 27657 Ley del Ministerio de Salud.
- 3.3 DS. N° 001-2003 SA. Reglamento de Organización y Funciones del INS.
- 3.4 Resolución Jefatural N° 267-2003 – J – OPD/INS Manual de organización y Funciones MOF de las Unidades Orgánicas del INS.
- 3.5 R.J. N°.554-2005-I- OPD/INS, aprueba PRA-INS-007 Elaboración, Revisión y Aprobación de los Documentos del Sistema de Gestión de la Calidad del Instituto Nacional de Salud.

## 4.0 DEFINICIONES

- 4.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs): Grupo celular correspondiente a los linfocitos, monocitos y macrófagos obtenidos en la sangre periférica.
- 4.2. Centrifugación en gradiente: Procedimiento de centrifugación mediante la cual se separan células o sus componentes mediante diferencia en la densidad.

## 5.0 FUNDAMENTO DEL METODO

Consiste en la separación de los PBMCs con el uso un agente coloidal de densidad cercana a 1.077 g/mL denominado Ficoll (Histopaque en su nombre comercial). Mediante la centrifugación se dará la formación una fina capa de PBMCs encima de los hematíes y el agente coloidal y por debajo del plasma. Los PBMCs se recuperarán y se someterán a pasos de lavado cortos con una solución isotónica y el recuento celular con una cámara de Neubauer.

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: N° 1</b>
		<b>FECHA</b>
		Página : 3 de 7

## 6.0 DESARROLLO DEL METODO

### 6.1 Condiciones previas

- Asegurar la correcta homogenización de la sangre y el anticoagulante.
- Mantener las muestras de sangre alejadas de fuentes directas de luz dado que la sobre exposición con la luz puede generar rupturas en el ADN genómico.
- Mantener la solución coloidal a la temperatura descrita por el fabricante y a oscuridad.

### 6.2 Aspectos de bioseguridad

El personal involucrado en el desarrollo del test debe cumplir las normas de Bioseguridad establecidas en el Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos, Serie de Normas Técnicas N° 18, 3ª Edición, año 2005.

### 6.3 Tipo de muestra

- Muestras de sangre periférica con anticoagulante de heparina o EDTA.

### 6.4 Equipos.

- Centrífuga basculante.
- Cabina de seguridad biológica (opcional).
- Micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 uL.

### 6.5 Materiales

- Solución de Ficoll-paque® (General Electric®) o Histopaque® (Sigma-Aldrich®), ambos con una densidad de 1.077 g/mL.
- Tubos cónicos de centrífuga de 50 mL.
- Microtubos cónicos de 1.5 mL.
- Tips de 10, 100, 200 y 1000 uL.
- Buffer fosfato salino 1X o Solución de Hank.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio óptico.
- Trypan blue (opcional).

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: Nº 1</b>
		<b>FECHA</b>
		Página : 4 de 7

## 6.6 Ejecución del método

### 6.6.1. Extracción por macrométodo.

**(Para volúmenes de 3 a 10 mL de sangre).**

1. Diluir la sangre anticoagulada con PBS 1X o solución de Hank por un factor de dilución de 2 y a un volumen final de 5 mL.
2. Con el uso de una pipeta serológica coleccionar y dispensar *en zona* la dilución sanguínea sobre el tubo de 15mL conteniendo 5 mL de Histopaque.
3. Centrifugar a 400g por 30 minutos a 15°C.
4. Luego del periodo de centrifugación identificar una banda de PBMCs entre el Histopaque y el plasma.
5. Extraer aproximadamente 500uL de la banda de PBMCs con una micropipeta de 1000uL.
6. Verter la suspensión celular sobre otro tubo de 15mL y agregar sobre él 10mL de PBS 1X o Hank y homogenizar por inversión.
7. Centrifugar a 500g por 15 minutos a 15°C (1er lavado).
8. Eliminar el sobrenadante con el uso de una pipeta serológica y conservar el precipitado celular (pellet).
9. Agregar sobre el pellet 10mL con PBS 1X o solución de Hank.
10. Centrifugar a 500g por 15 minutos a 15°C (2do lavado).
11. Eliminar todo el sobrenadante con el uso de una pipeta serológica y conservar el precipitado celular (pellet).
12. Resuspender el pellet en 500 uL de PBS 1X o solución de Hank.

Para mayores volúmenes de extracción, utilizar tubos de 50 mL, diluir la sangre anticoagulada por un factor de 2 a un volumen final de 20 mL y usar 20 mL de Histopaque. Extraer una cantidad de 1mL de PBMCs de la interfase.

### 6.6.2. Extracción por micrométodo

**(Para volúmenes menores de 500 uL de sangre).**

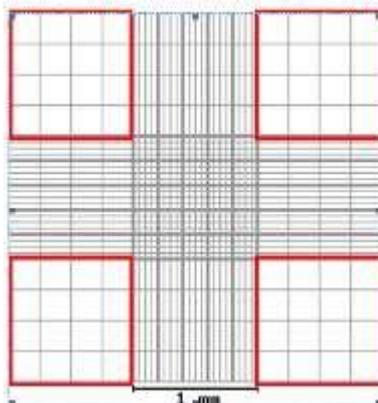
13. Diluir la sangre anticoagulada con PBS 1X o solución de Hank por un factor de dilución de 2 y a un volumen final de 600 uL.
14. Con el uso de una micropipeta coleccionar y dispensar *en zona* la dilución sanguínea sobre el tubo de 1.5mL conteniendo 600 uL de Histopaque.
15. Centrifugar a 2000g por 6 minutos a 15°C.

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: N° 1</b>
		<b>FECHA</b>
		Página : 5 de 7

16. Luego del periodo de centrifugación identificar una banda de PBMCs entre el Histopaque y el plasma.
17. Extraer aproximadamente 200uL de la banda de PBMCs con una micropipeta.
18. Verter la suspensión celular sobre otro tubo de 1.5mL y agregar sobre él 1mL de PBS 1X o Hank y homogenizar por inversión.
19. Centrifugar a 2500g por 5 minutos a 15°C (1er lavado).
20. Eliminar el sobrenadante con el uso de una micropipeta y conservar el precipitado celular (pellet).
21. Agregar sobre el pellet 1.0mL con PBS 1X o solución de Hank.
22. Centrifugar a 2500g por 5 minutos a 15°C (1er lavado).
23. Eliminar todo el sobrenadante con el uso de una micropipeta y conservar el precipitado celular (pellet).
24. Resuspender el pellet en 50 uL de PBS 1X o solución de Hank para obtener la suspensión celular inicial.

### 6.6.3. Recuento celular y viabilidad por el método de trypan blue:

1. Obtener una alícuota de 10 uL de la suspensión celular inicial y diluir en 90 uL de PBS 1X o de trypan blue (para evaluar viabilidad) obteniendo un factor de dilución de 10.
2. Agregar 10 uL de la mezcla al interior de la cámara de Neubauer.
3. Realizar el conteo de células en las áreas de los 4 extremos de la cámara de Neubauer, señalado en la Imagen n°1.



**Imagen N°1.** Áreas de conteo de PBMCs señaladas en rojo.

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: N° 1</b>
		<b>FECHA</b>
		Página : 6 de 7

4. Realizar el cálculo para obtener la concentración de células por uL de volumen de acuerdo a la siguiente fórmula:

<p><b>Fórmula de valoración (válida universalmente)</b></p> <hr style="border: 1px solid black;"/> <p>partículas por <math>\mu</math>l volumen = <math>\frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidad cámara (mm)} \cdot \text{dilución}}</math></p>
--

**Imagen N°2.** Formula tomada del catálogo de materiales para el conteo Brand: [http://www.brand.de/fileadmin/user/images/products/Clinical\\_Lab/Counting\\_Chambers/counting-s.pdf](http://www.brand.de/fileadmin/user/images/products/Clinical_Lab/Counting_Chambers/counting-s.pdf)

- **Partículas por ul de volumen:**  
Concentración de PBMCs por mm<sup>3</sup>.
- **Partículas contadas:**  
Promedio del conteo celular en las cuatro áreas contadas
- **Superf. Cont. (mm<sup>2</sup>):**  
Área promedio de conteo igual a **1mm<sup>2</sup>**.
- **Profundidad de cámara (mm):**  
Profundidad igual a **0.1mm**.
- **Dilución:**  
Razón de dilución regularmente usado: **1/10**.

5. A partir de la concentración celular obtenida se diluirá la suspensión celular con PBS 1X o solución de Hank a la concentración deseada. El ensayo cometa requiere una concentración de 5000 células/uL y un volumen final de 10 uL por cada ensayo.

## 7. INFORME DE RESULTADOS

Los resultados del aislamiento y conteo celular serán informados en un registro indicando el volumen de sangre utilizada, el recuento expresado en células totales obtenidas y el volumen de la suspensión celular.

	<b>METODO DE ENSAYO</b>	MT-CENSOPAS-12
	<b>AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE</b>	<b>Edición: N° 1</b>
		<b>FECHA</b>
		Página : 7 de 7

## 8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para poder realizar una réplica del ensayo cometa alcalino se requiere 50 000 células en 10uL de suspensión de solución de Hank por ensayo. Por ello se deberá estimar el número de células y volumen de la suspensión celular mínimo requerido para el número de réplicas a realizar.

Se debe considerar que la viabilidad obtenida por el método de Trypan blue o FDA/BrEth debe ser mayor al 95%.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Counting cell numbers using a hemocytometer and calculating PDs • TIMING 20 min. Nature Protocols 7,1366–1381. Emma Stephenson, Laureen Jacquet, Cristian Miere, Victoria Wood, Neli Kadeva, Glenda Cornwell, Stefano Codognotto, Yaser Dajani, Peter Braude.

[http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n7/box/nprot.2012.080\\_BX2.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n7/box/nprot.2012.080_BX2.html)