

## **Estudio cualitativo y cuantitativo del exudado peritoneal de ratas recién nacidas**

E. DOVALE, T. RODRÍGUEZ Y C. FINLAY

*Dpto. de Biología Celular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba*

*Recibido: 6 de junio de 1977*

**ABSTRACT.** A qualitative and quantitative study of the peritoneal exudate of rats after birth have been done. These animals have not been stimulated. Differences have been found between newborn animals and adults. Lymphocytes, eosinophils and mast cells were scarce during the first week of life, increasing with age, while macrophages and polymorphonuclear leukocytes decreased. These results together with the presence of immature cells could be an aid in explaining the functional differences reported between newborn animals and adults.

**RESUMEN.** Se realizó un estudio cualitativo y cuantitativo del exudado peritoneal de ratas de 3, 5, 9, 15 y 21 días de nacidas y adultas. Se encontraron diferencias entre el contenido celular de la cavidad peritoneal de los recién nacidos y los adultos: los linfocitos, eosinófilos y células cebadas fueron escasos en la primera semana de vida, incrementándose al aumentar la edad; mientras que en los macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos sucedía lo inverso. Estos resultados, unidos a la presencia de células inmaduras pudieran ayudar a explicar las diferencias funcionales reportadas, entre los recién nacidos y los adultos.

### **INTRODUCCION**

La morfología, origen y función de las células de la cavidad peritoneal de los animales adultos han sido objeto de diversos estudios, (*Robbins y cols., 1971; Padawer y Gordon, 1956; Seely y cols., 1937*) pues es ésta la fuente más utilizada para la obtención de los diferentes tipos celulares que en ella se encuentran, como son: macrófagos, eosinófilos, células cebadas y otros. Sin embargo, no existe un estudio cualitativo de las

células que componen el exudado peritoneal de los animales recién nacidos, lo que sería de gran interés, ya que se ha utilizado la cavidad peritoneal de los mismos para demostrar su susceptibilidad a las infecciones virales (*Hirsch y cols., 1970; Zisman y cols., 1971*) así como para estimular la producción de anticuerpos, suministrándole el antígeno por esta vía (*Argyris, 1968; Bendinelli y cols., 1971*).

Nuestro propósito, al utilizar la microscopia óptica, ha sido determinar si además de las diferencias funcionales reportadas en estas células, existen diferencias morfológicas de las mismas, así como variaciones significativas de la relación celular con respecto a la edad.

## MATERIALES Y METODOS

Se tomaron 6 grupos de ratas Wistar de distintas edades: 3, 5, 9, 15, 21 días y adultas; 10 de cada grupo, para un total de 60 animales, a los cuales se les realizó un lavado de la cavidad peritoneal con medio Parker 199. La cantidad de medio a inyectar varió con la edad de los animales, desde 1 ml en los de 3 días, hasta 40 ml en los adultos. El líquido de lavado se dejó gotear en tubos de cristal, y se centrifugó posteriormente a 500 r.p.m. durante 10'. Las centrifugaciones se realizaron individualmente desechándose el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en suero de ternero, y se realizaron extendidos que se colorearon mediante la técnica de May-Grunwald-Giemsa (*Forteza, 1963*). Se realizó el conteo diferencial de 3 000 células por día de nacido, o sea, 300 de cada animal.

Para el estudio estadístico se empleó el test de la U de Mann Whitney para comparaciones de grupos no relacionados.

## RESULTADOS

Los tipos celulares observados en todos los grupos etáreos fueron: macrófagos, monocitos, linfocitos, polimorfonucleares eosinófilos y neutrófilos, células cebadas y escasas células mesoteliales.

Los macrófagos se caracterizaron por presentar un núcleo excéntrico, de forma redondeada o arriñonada (Fig. 1), citoplasma ligeramente basófilo, en ocasiones abundante. No se encontraron diferencias cualitativas

apreciables en los macrófagos de los distintos grupos etáreos estudiados aunque desde el punto de vista cuantitativo, los macrófagos fueron las células predominantes en todos los grupos; existiendo diferencias significativas para  $p < 0,001$  entre todas las edades estudiadas a partir del tercer día de nacidas hasta las adultas, donde existe el menor número de macrófagos. (Tabla I).

Células con características similares a los monocitos fueron muy escasas en todos los grupos (Tabla I).

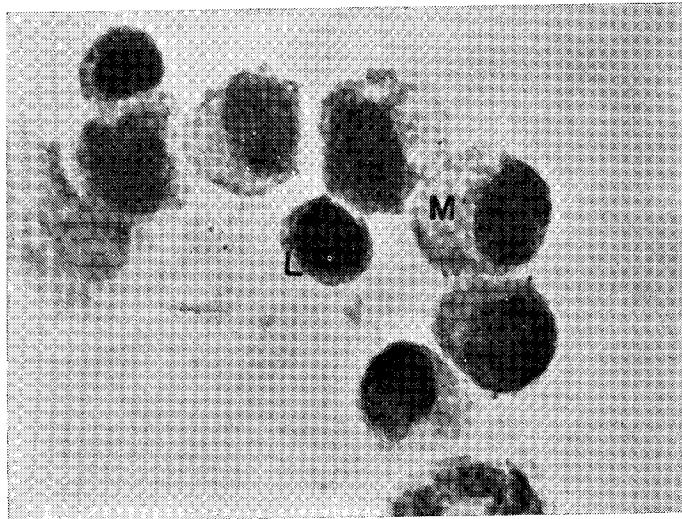


Fig. 1. Exudado peritoneal de rata de 3 días de nacida. Macrófago (M) Linfocito (L). 1020 x.

Los linfocitos no presentaron diferencias morfológicas entre los diferentes grupos (Fig. 1) ni con las descritas por otros autores (*Bloom y Fawcett, 1966; Ham, 1970*); sin embargo en el estudio cuantitativo se observó un incremento significativo a partir del 9no. día de vida, y se encontró una diferencia significativa entre los recién nacidos y los adultos para  $p < 0,001$ .

TABLA I  
D I A S D E N A C I D A S

Células del exudado peritoneal de rata	3	5	9	15	21	A
macrófagos	228,1 ± 6,6	213,3 ± 8,0	194,4 ± 13,4	185,0 ± 13,0	151,1 ± 9,0	136,8 ± 9,0
monocitos	2,6 ± 0,6	1,4 ± 0,8	3,5 ± 1,8	3,1 ± 1,2	2,0 ± 1,2	0,2 ± 0,2*
linfocitos	35,4 ± 7,3	36,7 ± 6,5	49,9 ± 5,8	61,2 ± 10,2	61,2 ± 5,1	72,40 ± 12,3
neutrófilos	3,9 ± 1,0	3,1 ± 1,8	1,4 ± 1,0	2,2 ± 1,0	1,3 ± 0,8	1,3 ± 0,8
neutrófilos de núcleo anular.	2,1 ± 1,4	3,0 ± 1,4	0,1 ± 0,1*	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,0
eosinófilos	1,4 ± 1,0	0,9 ± 0,6	8,4 ± 1,8	9,2 ± 1,6	17,3 ± 4,6	29,6 ± 2,8
eosinófilos de núcleo anular.	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,6	2,4 ± 0,4	5,6 ± 1,8	10,4 ± 2,4	27,4 ± 5,2
células cebadas	14,9 ± 4,4	18,3 ± 5,0	15,5 ± 6,6	27,7 ± 9,8	24,7 ± 6,6	27,2 ± 5,4

TABLA I. Distribución por edades de las distintas células que componen el exudado peritoneal de ratas. El número de animales por edad fue de 10 y de cada uno fueron contadas 300 células. En la tabla se muestran para todos los casos la  $\bar{x} \pm 2S\bar{x}$ , excepto en los marcados con asteriscos, donde se expresa la  $\bar{x} \pm S\bar{x}$ .

Las células cebadas presentaron durante la primera semana de vida de la rata, menor volumen que las observadas en la rata adulta, y sus gránulos citoplasmáticos fueron menos numerosos, (Fig. 2a) no observándose en el medio extracelular; a diferencia de lo que ocurre en el exudado de los animales adultos, en los que son frecuentes las granulaciones en el exterior (Fig. 2b).

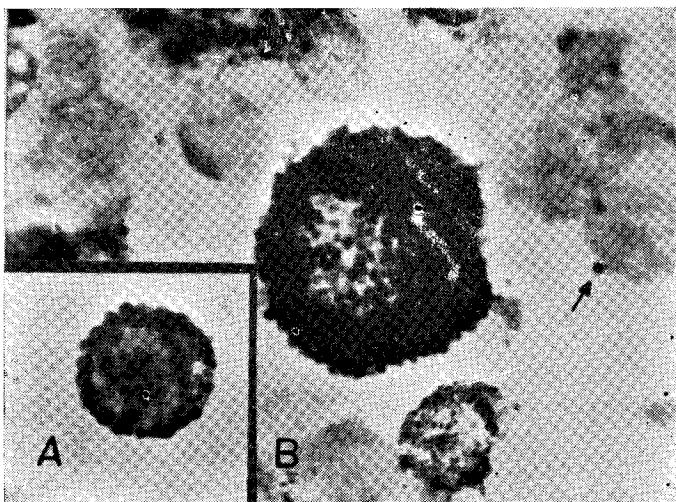


Fig. 2. a. Exudado peritoneal de rata de 3 días de nacida. Célula cebada. 1020 x.  
b. Exudado de rata adulta; se observa una célula cebada en el centro y un gránulo en el medio extra-cellular (flecha) 1020 x.

Se encontró menor número de células cebadas en los primeros 3 grupos, con respecto al resto de las edades estudiadas, siendo esta diferencia significativa para  $p < 0,01$ .

Los polimorfonucleares neutrófilos, aunque escasos en todas las edades, son relativamente numerosos hasta el 9no. día, a partir del cual disminuyen hasta el adulto, donde se encontraron los valores más bajos. Esta diferencia es significativa para  $p < 0,001$  entre la primera semana y los adultos.

Un aspecto morfológico interesante se encontró en los neutrófilos con respecto al núcleo, ya que además de las células de núcleo polilobulado,

características, (Fig. 3b) se encontraron algunas con núcleo anular (Fig. 3a), las que sólo se observaron durante la primera semana de vida.

Los eosinófilos, con sus granulaciones gruesas amarillentas llenando el citoplasma, se caracterizaron por presentar el núcleo bilobulado o anular (Fig. 3d). Su número muy bajo en la primera semana de vida se incrementó progresivamente hasta la rata adulta, en la que alcanza los valores más altos, siendo las diferencias significativas para  $p < 0,001$ .

Se encontraron eosinófilos durante la primera semana de vida con granulaciones azurófilas y núcleo esférico (Fig. 3c).

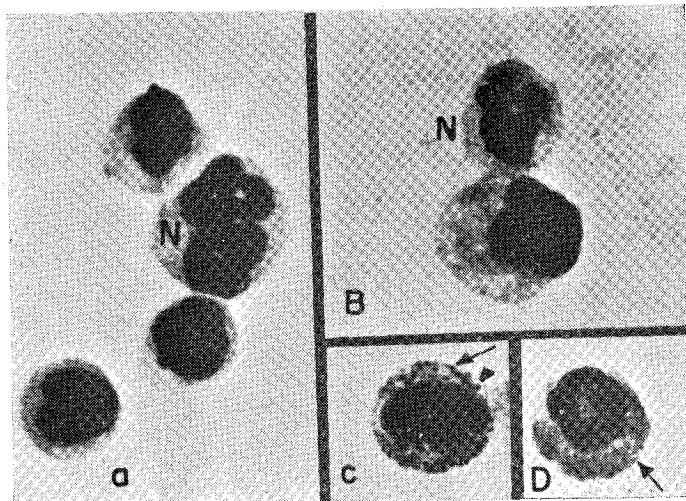


Fig. 3. Todas las macrofotografías corresponden a exudado peritoneal de rata de 3 días de nacida. 1020 x. a. Se observa polimorfonuclear neutrófilo (n), el que presenta 2 núcleos de forma aproximadamente anular. b. Neutrófilo de núcleo polilobulado. c. Polimorfonuclear eosinófilo joven; presenta el núcleo esférico granulaciones azurófilas (cabeza flecha) y eosinófilas (flecha). d. Eosinófilo de núcleo anular maduro, en el que sólo se observan granulaciones eosinófilas.

Las células mesoteliales en nuestras condiciones experimentales fueron escasas, ya que el método empleado fue el lavado y la extracción se realizó por presión y no por aspiración, además de no existir estímulo previo de la cavidad.

Las mitosis, aunque escasas, fueron más numerosas en los recién nacidos hasta el 9no. día (0,33%), mientras que después de esta edad el número mayor fue de 0,03%.

## DISCUSION

No se aprecian diferencias de los tipos celulares reportados por otros autores en animales adultos, con los observados por nosotros en animales recién nacidos.

El predominio de los macrófagos en todos los grupos etáreos coincide con los resultados de otros autores para ratas adultas (*Murczynska y cols., 1970; Robins y cols., 1971*) aunque Davis y Mc Gowan (1968) encontraron que las células más abundantes eran las mesoteliales, lo que pudiera deberse al método empleado por ellos, ya que no lavaron la cavidad peritoneal, sino que absorbieron el exudado, pudiendo desprender gran cantidad de estas células.

La disminución del número de macrófagos al aumentar la edad, se debe al incremento de otros tipos celulares (eosinófilos, linfocitos y células cebadas). Los linfocitos se incrementaron significativamente a partir del 9no. día de vida, lo que puede estar relacionado con el comienzo de la producción de anticuerpos, el cual ha sido reportado a partir de este día (*Stechner y Thorbecke, 1967*).

Las características de las células cebadas durante la primera semana de vida se corresponde con las células inmaduras (*Coombs y cols., 1965; Coombs, 1966, 1971; Ginsburg y Lagunoff, 1967; Potapova, 1968*), las que según Coombs y cols., (1965), no poseen histamina, son escasas en número y no poseen anticuerpos reagínicos. Estos hechos nos podrían explicar la disminución de los fenómenos anafilácticos de los recién nacidos en los que las células cebadas juegan un papel importante.

El núcleo anular encontrado en polimorfonucleares eosinófilos y neutrófilos y su origen común a partir del mieloblasto, (*Bainton y Farquhar, 1968a, 1968b; Wetzel y cols., 1967a, 1967b*) nos hizo pensar que esta forma sea un estadio intermedio del desarrollo, hallazgo que fue corroborado al estudiar la médula ósea y sangre periférica (*Rodríguez y Dovale, 1975, 1977*). La ausencia de datos con respecto a este hecho puede deberse

a que la mayoría de los estudios se han hecho en ratas adultas, (*Davis y Mc Gowan, 1968, Padawer y Gordon, 1956*) donde hay un número elevado de eosinófilos de núcleo anular, mientras que los neutrófilos son muy escasos, lo que ha determinado que muchos autores señalen a esta célula como el eosinófilo típico de los roedores (*Bloom y Fawcett, 1966; Higgins, 1953*).

La presencia de un mayor número de neutrófilos en la primera semana de vida de la rata y sus características morfológicas que la señalan como célula inmadura, pudiera deberse a que estas células continúan produciéndose en el hígado, durante los primeros días de vida de la rata, siendo normal su presencia en periferia; hallazgo este señalado por Morris y cols., (1975), en sangre del cordón umbilical humano. Sin embargo, con respecto a los eosinófilos, no es esta la situación, ya que aunque se encuentran células inmaduras durante la primera semana de vida, (Fig. 3c) hay células de núcleo anular en todas las edades, sufriendo un incremento similar al que sufren los eosinófilos de núcleo polilobulado, al aumentar la edad de los animales; lo que pudiera explicarse porque estas células sufren recambio constante o porque esta forma de núcleo anular, en los eosinófilos de los roedores sea típica de la periferia, representando una forma madura de este tipo celular.

## CONCLUSIONES

Existen diferencias cuantitativas y cualitativas entre el exudado peritoneal de las ratas recién nacidas y las adultas. Los macrófagos son las células más abundantes en el exudado peritoneal de todos los grupos etáreos.

Los linfocitos, eosinófilos y células cebadas fueron escasas en la primera semana de vida, incrementándose en número al aumentar la edad de los animales.

Las células cebadas de las ratas recién nacidas se diferenciaron de las adultas cualitativa y cuantitativamente.

Durante la primera semana de vida se encontraron polimorfonucleares, eosinófilos y neutrófilos con características similares a células inmaduras.

## REFERENCIAS

- ARGYRIS B. F. Role of macrophages in immunological maturation. *J. Exp. Med.*, 128, 459, 1968.
- BAINTON D. F. AND FARQUHAR M. G. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smear. *J. Cell. Biol.*, 34, 286, 1968a.
- BAINTON D. F. AND FARQUHAR M. G. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and Electron Microscopy of bone marrow cells. *J. Cell. Biol.*, 39, 299, 1968b.
- BENDINELLI M., SENESI S. AND FALCONE G. Effect of adult peritoneal cells on the antibody response of newborn mice to sheep red blood cells. *J. Immunology*, 106, 1681, 1971.
- BLOOM W. Y FAWCETT W. Tratado de Histología. 85-127. Ed. Labor, Argentina, 1966.
- COOMBS J., LAGUNOFF D. AND BENDETT E. P. Differentiation and proliferation of embryogenic mast cells of the rat. *J. Cell. Biol.*, 25, 577, 1965.
- COOMBS J. Maturation of rat mast cells and electron microscope study. *J. Cell. Biol.*, 31, 563, 1966.
- COOMBS J. An electron microscope study of mouse mast cells arising in vitro and in vivo. *J. Cell. Biol.*, 48, 676, 1971.
- DAVIS R. H. AND MC GOWAN L. Comparative peritoneal cellular content as related to species and sex. *Anat. Rec.*, 162, 357, 1968.
- FORTEZA B. G. Método de coloración citológica. Atlas de Citología Sanguínea. 3-4 Ed. Toray, 1ra. Edición, España, 1963.
- GINSBURG H. AND LAGUNOFF D. The in vitro differentiation of mast cells cultures of cells from immunized mouse lymph nodes and thoracic duct lymph on fibroblast monolayers. *J. Cell Biol.*, 35, 685, 1967.
- HAM A. W. Células del tejido conectivo laxo y leucocitos. Tratados de Histología. 229-293. VI Edición, Nueva Editorial Inter-Americana, S. A., Méjico, 1970.
- HIGGINS G. M. Hormonally induced eosinophilia of peritoneal fluid of white rats. *Amer. J. Clin. Path.*, 23, 775, 1953.
- HIRSCH M. S., ZISMAN B. AND ALLISON A. C. Macrophages and age dependent resistance to Herpes simplex virus in mice. *J. Immunol.*, 104, 1160, 1970.
- MORRIS R. B., NICHOLS B. A. AND BAINTON D. F. Ultrastructure and Peroxidase cytochemistry of normal human leukocytes at birth. *Development Biology*, 44, 223, 1975.
- MURCZYNASKA W., ANDREZEJEWSKI J. AND BOGUNOWICS A. Role of macrophages in the development of immunological maturity in rat. *Nature* 227, 721, 1970.

- PADAWER J. AND GORDON A. S. Differential counting of the cavity peritoneal cells of rat, mice, hamster, guinea-pig, rabbit, cat, bat and monkey. *Anat. Record.*, 129, 209, 1956.
- POTAPOVA W. B. The submicroscopic characteristics of young mature forms of mast cells of adult animals and embryos connective tissues in health and disease. Acad. Science of USSR. Siberian Branch, 132, 1968.
- ROBBINS D., FAHIMI D. H. AND CONTRAN R. S. Fine structural cytochemical localization of pe-oxidase activity in rat peritoneal cells: *J. Histochem. and Cytochem.*, 19, 571, 1971.
- RODRÍGUEZ T. Y DOVALE E. Estudio morfológico de los leucocitos granulosos en el desarrollo postnatal de la rata Wistar. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 8, 51, 1977.
- RODRÍGUEZ T. Y DOVALE E. Estudio morfológico de los leucocitos en periferia en ratas Wistar de 3 a 21 días de nacidas. Libro de Resúmenes V Seminario Científico del CENIC. 338-339. Ed. Orbe, Cuba, 1975.
- SEELEY S. F., HIGGINS G. M. AND MANN F. C. The cytologic response of the peritoneal fluid to certain substances. *Surgery*, 2, 862, 1937.
- STECHER V. J. AND THORBECKE G. J. Ig<sup>e</sup> and immune globulin formation in vitro by tissues from germ-free and conventional rodents of various ages. *Immunology*, 12, 475, 1967.
- WETZEL B. K., SPICER S. S. AND HORN R. G. Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in cells of rabbit blood and bone marrow. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 311, 1967a.
- WETZEL B. K., HORN R. G. AND SPICER S. S. Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil and basophil granulocytes in rabbits. *Lab. Invest. J. Exp. Pathol.*, 16, 349, 1967b.
- ZISMAN B., WHECLOCK E. F. AND ALLISON A. C. Role of macrophages and antibody in resistance of mice against yellow-fever virus. *J. Immunol.*, 107, 236, 1971.