

Estudio de subpoblaciones linfoides humanas

Por los Dres.:

CARLOS CERVANTES,¹³ GLADYS EXPOSITO,¹⁴ EDUARDO MUZIO¹⁴ y
EMILIO MORALES¹⁵ y las Técns.: MARIA ELENA GARCIA¹⁶ y MIRIAM
ZALDIVAR¹⁷

Cervantes, C. y otros. *Estudio de subpoblaciones linfoides humanas*. Rev Cub Med 17:
4, 1978.

Se estudian las poblaciones linfoides en 30 donantes sanos mediante diferentes marcadores de linfocitos T y B. Se discuten los resultados de las rosetas E totales y de la alta densidad de receptores. Se discuten los resultados de linfocitos B totales y las diferencias encontradas con cada método de cuantificación; no se excluye la posibilidad de que diferencias menores puedan tener una base geográfica. Se analiza la utilidad resultante del uso de verografín en la preparación de células linfoides para estudios de inmunidad.

INTRODUCCION

Desde que los linfocitos fueron caracterizados por Gowans¹ como efectores celulares en la respuesta inmune, mucho se ha trabajado con estas células; en otros momentos han sido consideradas sin función importante en los mecanismos de defensa. Así, ha sido posible definir 2 sistemas de células linfoides según su participación en la respuesta inmune, uno encargado de las respuestas de hipersensibilidad retardada, y el otro de las respuestas de tipo humoral, ambas estrechamente interrelacionadas e interdependientes.²

Los linfocitos causantes de las respuestas de hipersensibilidad retardada se consideran derivados del timo (T), mientras que los linfocitos encargados de la producción de los mediadores de la respuesta humoral (es decir, anticuerpos) se derivan de la bursa en las aves, aunque en los mamíferos no se ha podido definir un órgano equivalente y se ha considerado como posible, la médula ósea.³

Si importante ha sido la definición de estos dos sistemas, también ha sido de relevante interés la creación de una tecnología que posibilita asignar a qué sistema pertenece un elemento u otro en una población linfoide, y por tanto, su cuantificación. Esta tecnología se basa en marcadores presentes en las células linfoides que permiten clasificarlas como linfocitos T o B. De esta manera se ha definido que los linfocitos T presentan antígenos timoespecíficos en el hombre,¹⁷⁻⁵ ratón,⁶ rata,⁷ conejo⁸ y

13 Jefe del departamento de biología de tumores, IOR.
14 Médico especialista del laboratorio de inmunología tumoral, IOR.
15 Jefe del laboratorio de inmunología tumoral, IOR.
16 Técnica del laboratorio de inmunología tumoral, IOR.
17 Sones, F. M. Coronary Arteriography. Pre-

bovinos.⁹ Los linfocitos T humanos forman además rosetas espontáneas (E) con eritrocitos de carnero,^{10,11} y es éste el marcador T más frecuentemente usado.

Los linfocitos B presentan, por su parte, inmunoglobulina de superficie celular (IgSC) fácilmente detectable¹⁻ y receptores para el complemento (C).¹¹ Presentamos nuestros resultados al estudiar las poblaciones linfoides obtenidas por sedimentación en gradientes de densidad con verografin, en donantes de sangre normales.

MATERIAL Y METODO

Muestras: Se obtuvo sangre por punción venosa, de 30 donantes de banco de sangre, anticoagulada con heparina libre de preservativos (25 U/ml/de sangre).

Obtención de linfocitos: Los linfocitos se obtuvieron depositando 10 ml de sangre diluida a partes iguales con solución de Hanks sobre 5 ml de verografin (Sal N-metil-D-glucamínica y sal sódica del ácido 3-5 bis-acetil-amino-2, 4, 6, triiodo- benzóico (86,85: 13,15%), diluido en H₂O destilada (densidad: 1,078). Las muestras se centrifugaron a 1,500 x g, durante 30 minutos. El anillo blanquecino que se forma en la interfase es aspirado con pipetas Pasteur. Las células fueron lavadas 3 veces con solución de Hanks, a 4°C, y contadas en un hemocitómetro. La viabilidad fue chequeada con azul tripán. Se realizaron extensiones teñidas con hematoxilina-eosina.

Estudio de poblaciones

En las poblaciones linfoides obtenidas se estudió la presencia de IgSC por inmunofluorescencia, de receptores para Fe de IgG por rosetas EA y para el complemento por rosetas EAC. La formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero se realizó como marcador de linfocitos T. Con igual propósito se estudiaron las preparaciones de linfocitos

T por inmunofluorescencia indirecta, con un suero anticélula¹, de timo fetales humanas producido en un conejo y absorbido extensamente con eritrocitos AB (+) y células de leucemia linfode crónica, cuyos resultados no se informan aquí en detalle.

La inmunofluorescencia directa de linfocitos se realizó con ligeras modificaciones según *Cerettini*¹⁴ con un antisuero de oveja contra Ig humanas, marcado con isotiocianato fluoresceína (Wellcome, MFOI, loto K 9631), diluido 1:20 y se leyó en un microscopio de fluorescencia ML-2A (URSS).

Las rosetas EA se lograron por incubación de eritrocitos humanos con un antisuero de conejo inmunizado con hematíes AB (+) en concentraciones subaglutinantes. Los hematíes se lavaron 3 veces y se incubaron con los linfocitos obtenidos en un proceder similar al de *Huber*.¹⁵ Para las rosetas EAC los hematíes EA fueron lavados e incubados con suero humano normal, fresco, diluido como fuente de complemento según *Michlmayer*.¹³

Las rosetas E se realizaron de acuerdo con *Jondal*,¹⁰ excepto en que al final fueron fijadas en glutural dehidro diluido al 0, 6% (concentración final)¹¹ en solución amortiguadora T-D, pH 7,3.¹⁴

RESULTADOS

1. *Obtención de células linfoides.* Las células obtenidas por gradientes de densidad mostraron una pureza mayor del 98% de células mononucleares. Usualmente, entre un 5-15% de las células mostraron un diámetro mayor de 10-12 M (mieras) y núcleo escotado: estas células fueron consideradas monocitos. La viabilidad mostrada es habitualmente superior al 95%, según el criterio de exclusión de azul tripán. Regularmente se obtienen de 1 a 2 x 10⁵ células por ml de sangre original, utilizada de un donante de sangre normal.
2. *Estudio de rosetas EA, EAC e inmunofluorescencia.* En el cuadro I se

CUADRO I MARCADORES B

	IF	EA	EAC
M.	16,58	21,45	21,04
Ds.	5,01	6,93	6,28

M: media; Ds: desviación estándar

muestran los valores de linfocitos formadores de rosetas EA, EAC y positivos en inmunofluorescencia directa. Es de destacar que los valores de rosetas EA y EAC son prácticamente idénticos entre sí, mientras que los obtenidos por inmunofluorescencia son ligeramente inferiores.

3. *Estudio de rosetas E.* Los valores de rosetas E se muestran en el cuadro II. No son valores diferentes de los informados en la literatura utilizando la misma técnica. Encontramos usualmente alrededor de un 20% de rosetas con más de 7 hematíes de car-

CUADRO II MARCADORES T

	E _{Totales}	E _{ADR}	E _{BDR}
M.	75,23	18	57
Ds.	7,75	5,96	8,0

M: media; Ds: desviación estándar ADR: alta densidad de receptores BDR: baja densidad de receptores

ñoero unidos por linfocito. Estos linfocitos se desglosan en el cuadro y se consideran células con alta densidad de receptores (figura).

El cuadro III muestra que la suma total de las subpoblaciones no es superior al 100%; y sí escasamente inferior.

DISCUSION

El estudio de las poblaciones linfoides humanas tiene un obvio interés por su aplicación al diagnóstico y la investiga-



Figura. Linfocitos de sangre periférica. Algunos muestran entre 3-6 eritrocitos de carnero unidos, mientras otros adhieren más de 7 eritrocitos.

CUADRO III	
POBLACIONES LINFOIDES TOTALES	
E + IgSC:	92%
E + EA:	96%
E + EAC:	96%

ción clínica de las afecciones que evolucionan con alguna afección de la inmunidad. Hemos intentado por esto cuantificar diferentes poblaciones linfoides en sangre periférica humana por diferentes métodos.

En nuestros resultados las cifras de linfocitos T obtenidas son comparables a las de otros trabajos publicados^{5,18} aunque iigeramente superiores a las informadas en otras investigaciones.¹⁹ En este último caso, pudiera influenciar la estabilidad de las rosetas,²⁰ la acción fijadora del glutural dehído¹¹ y el número de eritrocitos por linfocito.²¹ Como quiera, estas cifras no parecen excesivas en el sentido de que estemos dando como positivas células que carecen de este marcador, ya que en ningún caso la suma de linfocitos T totales más linfocitos B es superior al 100%. De todas formas, los resultados con rosetas E son similares a los obtenidos con un suero antitumoral humano fetal (resultados no presentados).

La constancia de la cifra de linfocitos con más de 7 eritrocitos de carnero unidos la consideramos de interés. Esta cifra es de alrededor del 20% en donantes normales. Hemos considerado estos linfocitos *con alta densidad de receptores* para eritrocitos de carnero como una posible subpoblación de linfocitos T. Esta subpoblación disminuye selectivamente en pacientes con cáncer de mama.-- Resultados preliminares en pacientes portadores de melanoma parecen justificar esta impresión. Es posible que esta subpoblación esté relacionada con las rosetas producidas por linfocitos con receptores de alta afinidad detectados con rosetas "tempranas" o "activas." (Véase Wybran,^{23,25} y Wv).²⁰ Aunque la cifra de 28% de

Wybran y colaboradores es algo diferente a la de 20% nuestra, pueden existir detalles técnicos responsables de esta diferencia. Actualmente se investigan en nuestro laboratorio.

Los resultados para evaluar poblaciones B muestran que las rosetas EAC y EA dan valores estadísticamente indiferenciables.

Esto indica que si bien se ha descrito que los linfocitos T activados tienen receptores para el fragmento Fe modificado de IgG,^{27,29} en las muestras de sangre periférica de donantes normales, tales linfocitos T activados influyen poco los resultados y que el marcador EA detecta principalmente linfocitos B. La utilidad que pueden tener las diferencias entre linfocitos reactivos a EA y EAC es un aspecto inexplorado de inobjetable interés. Las enfermedades que evolucionan supuestamente con alteraciones de linfocitos T, con hiperactividad de éstos, y aumento de linfocitos T activados, como pudieran ser las primeras fases de la respuesta inmune antitumoral, se beneficiarían de estas diferencias.

El reverso de la cuestión, es decir, una disminución de la población EA positiva, es no menos interesante.

El valor de rosetas EAC es ligeramente superior al obtenido por inmunofluorescencia. No es fácil discutir estas diferencias si se hace abstracción de las potencialidades de sensibilidad en cada técnica. Ciertamente, la visualización de los indicadores de una y otra técnica (eritrocitos vs. moléculas marcadas) es más fácil y posible en el primer caso que en el segundo. Pueden considerarse las diferencias de sensibilidad entre las técnicas usadas.

Los resultados de las poblaciones B por inmunofluorescencia son superiores a los obtenidos en otros trabajos^{30,11} sin embargo, comparables a los de Brenner y colaboradores³² que utilizan reactivos similares. Es posible que estemos detec

tando poblaciones B con IgSC estable y lábil (según *Lobo y colaboradores*)TM aunque este mismo autor refiere que aquéllos que obtuvieron cifras de linfocitos B con IgSC por inmunofluorescencia inferiores al 20% detectan fundamentalmente la población con IgSC estable. Sin embargo, nuestras cifras promedio son aún superiores, la causa puede ser un medio geográfico diferente.

Muestras provenientes de un medio geográfico diferente han mostrado tener diferentes proporciones relativas de linfocitos T y B^{33,34} estos datos son importantes, ya que no conocemos otro estudio similar en nuestro medio. Diferencias entre distintas poblaciones se han planteado también para otras células blancas sanguíneas.³⁵

Por último, los resultados obtenidos con el verografin, demuestran que las proporciones relativas de distintas subpoblaciones linfoides no difieren de las obtenidas por otros métodos, y se obtienen buenos rendimientos de linfocitos con marcadores T o B. Estas cifras apoyan la utilidad de este sistema para preparar poblaciones linfoides con vista a su utilización en estudios de inmunidad. Aunque otros han informado anteriormente el uso de linfocitos separados de esta forma,^{36,37} en nuestro trabajo se completa la tecnología aplicable a células así obtenidas (rosetas E, EA, EAC, inmunofluorescencia directa e indirecta).

Células linfoides preparadas de igual manera se han utilizado con éxito también para estudios de transformación blástica,³⁶ doctor *Muzio*,³⁸ doctor *C. Rodríguez*.³⁹

Los resultados de pureza (más del 95% de células mononucleares) viabilidad (más del 95% también) son satisfactorios. Los rendimientos, de 1-2 x 10⁶ células mononucleares por ml de sangre original son comparables a otros procedimientos.⁴⁰

Además, la facilidad de preparación, y poco costo del reactivo son elementos que se deben tener en consideración.

CONCLUSIONES

1. El estudio realizado de poblaciones linfoides por diferentes marcadores demuestra que nuestros resultados cuantitativos de linfocitos T en sangre periférica humana son comparables a otros informados.
2. Los valores de linfocitos B por rosetas e inmunofluorescencia muestran moderadas diferencias como posible expresión de diferencias de sensibilidad en ambos métodos.
3. La separación por gradiente de veno-grafín se ha demostrado útil para obtener linfocitos de sangre periférica para clasificarlos según marcadores T o B.
4. Se consideran aquellos linfocitos con más de 7 eritrocitos de carnero unidos (linfocitos con alta densidad de receptores) como una posible subpoblación de linfocitos T.

ABREVIATURAS USADAS EN ESTE TRABAJO

Linfocito T Timoderivado o dependiente	Linfocito B
Timo independiente	IgSC
Inmunoglobulina de superficie ce-	
Fc	lular.
Ig	Fragmento cristalizante
EA	Inmunoglobulina
Roseta E cuerpo	Eritrocito recubierto de anti-
C	Eritrocito recubierto de anti
	cuerpos más complemento
	Roseta espontánea
	Complemento

SUMMARY

Cervantes, C. et al. *A study of human lymphoid subpopulations*. Rev Cub Med 17: 4, 1978.

Lymphoid populations were studied in 30 healthy donors with the aid of different T and B lymphocytes tracers. Total E rosettes as well as the high density of receptors are stressed. Total B lymphocytes and the differences from each quantification method are discussed. A possible geographic relationship with minor differences is not ruled out. The usefulness of Verografin in preparing lymphoid cells for immune studies is analyzed.

RESUME

Cervantes, C. et al. *Etude de sous-populations lymphoïdes humaines*. Rev Cub Med 17: 4, 1978.

Les populations lymphoïdes sont étudiées chez 30 donneurs sains au moyen de différents indicateurs de lymphocytes T et B. Les résultats des rosettes E totales et de la haute densité de receveurs sont discutés, ainsi que les résultats de lymphocytes B totaux et les différences trouvées avec chaque méthode de quantification. On n'écarte pas la possibilité que plusieurs différences peu importantes puissent avoir une base géographique. L'utilité qui résulte de l'utilisation de Verografin dans la préparation de cellules lymphoïdes pour les études d'immunité est analysée.

PE3KME

CepBañTec K. o zp. HccjieaoBafiae ^ejiOBe^eckKx -
HaccjieoBafiae ^ejiOBe^eckKx

HccjieiyioTCfl JiüM\$oímHüe nacejiemia y TpaímaTH 3flopoBbix .noHopoB c- **noMomBB pa3JmHHX OTMeTOK T O B. OócyauiaBTCH pe3yjii**
TaTH poseTOK E oómax O bhcokoíi imothoetO no^ynaTeJieii. OCeyamamr ch pe3yjn>TaTu jwm\$owmob B oómx o OT\$epeHnaH, oóHapyxeHHue -- npa KaamoM MeTOiie KyaTH\$HKaa0ii; He acmiiOTaeTCH bo3moshoctb Toro tto ueHíme pa3JiHHM MoryT UMeTB reorpat()HqecKyK) 0CH0By. AHaJiH3H pyeTCJi KOHeqHaa aqx|)eKTHBH0CTB acn0^B30BaHaa Beporpa\$0Ha b no^ro TOBKe Jiam\$OTHHeckii x RJieTOK c uejiBio Kccjie^oBaHii OMMYHOTeTa.

BIBLIOGRAFIA

1. *Gowans, J. L. et al.* Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Natura* 196: 651, 1962.
2. *Raff, M. C.; Tand, B.* Lymphocytes and Immune Responses. *Nature* 242: 19, 1973.
3. *Warner, N. L.* Multiple myeloma and related immunoglobulins producing neoplasms. UICC Technical Report Series 13: Geneva, 1974.
4. *Yata, J. et al.* Human lymphocytes subpopulations. *Clin Exp Immunol* 14: 319, 1973.
5. *Smith, R. W. et al.* An antigenic marker for human thymic lymphocytes. *J Immunol* 110: 884, 1973.
6. *Reif, A. E.; Alien, J. M. V.* The AKR Thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J Exp Med* 120: 413, 1964.
7. *Douglas, T. C.* Occurrence of a theta like antigen in rats. *J Exp Med* 136: 1054, 1972.
8. *Fradelizi, D. P. et al.* A membrane antigen of rabbit thymus cells. *Cell Immunol* 7: 484, 1973.
9. *Williams, R. M. et al.* Antigenic markers on cells leaving calf thymus by way of the efferent lymph and venous blood. *J Immunol* 106: 1143, 1971.
10. *Jondal, M. et al.* Surface markers on human T and B lymphocytes I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 136: 207, 1972.
11. *Pang, T. G. M. et al.* Spontaneous rosettes as a T lymphocyte marker: a modified method giving consistent results. *J Immunol* 4: 41, 1974.
12. *Raff, M. C. et al.* Immunoglobulins determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature* 225: 553, 1970.
13. *Miehlmayr, G.; Huber, H.* Receptor sites for

- complement on certain human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 105: 670, 1970.
14. *Cerottini, J. C.; Brunner, K. T.* Localization of Mouse Isoantigens on the Cell Surface as Revealed by Immunofluorescence. *Immunol* 13: 395, 1967.
 15. *Huber, H. et al.* The IgG receptor: an immunological marker for the characterization of mononuclear cells. *Immunol* 17: 7, 1969.
 16. *Haskill, J. S. et al.* Classification of thymus-derived and marrow-derived lymphocytes by demonstration of their antigen-binding characteristics. *J Exp Med* 135: 1410, 1972.
 17. *Dwyer, J. M. et al.* Disturbance of the blood T: B lymphocyte ratio in Lepromatous Leprosy. *New Eng J Med* 288: 1036, 1973.
 18. *Bobrove, A. M. et al.* Quantitation of T and B lymphocytes and cellular immune function in Hodgkin's disease. *Cáncer* 36: 169, 1975.
 19. *Whitehead, R. H. et al.* Tand B lymphocytes in Breast Cancer. Stage Relationship and abrogation of T lymphocyte depression by enzyme treatment in vitro. *Lancet* 1: 330, 1976.
 20. *Hier, H. E.* The influence of mechanical force on the rosette test. *Scand J Immunol* 3: 677, 1974.
 21. *Chisholm, R. L.; Tubergen, D. G.* The significance of varying SRBC/Lymphocyte ratio in T cell Rosette formation. *J Immunol* 116: 1397, 1976.
 22. *Cervantes, C.E. y otros.* Evaluación inmunológica del paciente con cáncer de mama. Presentado en el Congreso Latinoamericano de Ginecología y Obstetricia, La Habana, enero 1976.
 23. *Wybran, J.; Fudenberg, H.* Thymus-Derived Rosette-Forming Cells in Various Human Diseases States: Cáncer, Lymphoma, Bacterial and Viral Infections, and Other Diseases. *J Clin Invest* 52: 1026, 1973.
 24. *Wybran, J.; Fudenberg, H.* Thymus-derived Rosette-forming cells. *New Engl J Med* 288, 1072, 1973.
 25. *Fudenberg, H. H.* T-rosette forming cells, cellular immunity and cáncer. *New Engl J Med* 292: 475, 1975.
 26. *Tak Yan Yu, D.* Human Lymphocyte subpopulation. Early and late rosettes. *J Immunol* 115: 91, 1975.
 27. *Grey, H. M. et al.* Thymus-derived (T) cell immunoglobulins. *J Exp Med* 136: 1323, 1972.
 28. *Van Boxel, J. A.; Rosenstreich, D. L.* Binding of aggregated gammaglobulin to activated T lymphocytes in the guinea pig. *J Exp Med* 139: 1002, 1974.
 29. *Stout, R. A. et al.* Fe receptor on thymus Derived lymphocyte. Mixed lymphocyte reactivity and cell mediated lymphocactivity of Fe and Fct T lymphocyte. *J Exp Med* 144: 55, 1976.
 30. *Lobo, P. I. et al.* Identification of two populations of immunoglobulin bearing lymphocytes in man. *J Immunol* 114: 116, 1975.
 31. *Winchester, R. J. et al.* IgG on lymphocyte surfaces; technical problems and the significance of a third cell population. *J Immunol* 114: 1210, 1975.
 32. *Brenner, A. I. et al.* Surface characteristics of synovial fluid and peripheral blood lymphocyte in inflammatory arthritis. *Arth Rheum* 18: 297, 1975.
 33. *Méndez, N. F. et al.* Technical aspects of the rosette test used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte Binding (T) lymphocytes. *J Immunol* 113: 860, 1973.
 34. *Brain, P. et al.* T and B lymphocytes in three population groups. *Clin Exp Immunol* 23: 248, 1976.
 35. *Wassermann, H. P.* Leucocyte counts in ethnic groups. *Lancet* 852: 1972.
 36. *Medzihrad, K. J.; Babusiková, O.* Diminished in vitro toxic. Effect of Phytohaemagglutinin for lymphocytes of rats bearing syngeneic tumours. *Neoplasma* 20: 4, 1973.
 37. *Brooks, H. III, et al.* Depressed cell mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of a humoral immunosuppressive factor. *J Exp Med* 136: 1631, 1972.
 38. *Muzio, E.* Comunicación personal, 1976.
 39. *Rodriguez, C.* Comunicación personal, 1976.
 40. *Mookerjee, B. K.* Influence of separation techniques on the distribution and function of lymphocyte subpopulations. *Transplantation* 22: 101, 1976.