

INSTITUTO DE ONCOLOGIA Y RADIOBIOLOGIA

## Marcadores biológicos en la enfermedad de Hodgkin.

### I. Poblaciones linfoides T y B en sangre periférica y ganglios linfáticos

Por:

Dr. CARLOS CERVANTES\*, Dra. GLADYS EXPOSITO\*\*,  
Dr. ZOILO MARINELLO VIDAURRETA\*\*\* y Téc. Ma. ELENA GARCIA\*\*\*\*

- Cervantes, C. y otros. *Marcadores biológicos en la enfermedad de Hodgkin. I. Poblaciones linfoides T y B en sangre periférica y ganglios linfáticos.* Rev Cub Med 20: 3, 1981.

Se estudian los marcadores inmunológicos de poblaciones linfoides de sangre periférica (37 muestras) y ganglio linfático (32 muestras) de pacientes con enfermedad de Hodgkin. Los marcadores utilizados fueron rosetas E, EA, y EAC, e inmunofluorescencia directa de linfocitos con un suero antinmunoglobulinas humanas. Los resultados obtenidos muestran un perfil de población linfóide de esta enfermedad, de linfocitos IgSC<sup>+</sup> normales en sangre periférica, así como Eadr, EA y EAC aumentados y Ebdr disminuidos. En ganglio, los linfocitos IgSC<sup>+</sup> aparecen aumentados, Eadr, EA y EAC con valores similares a los de sangre periférica, y Ebdr se hallan disminuidos.

#### INTRODUCCION

En la enfermedad de Hodgkin las respuestas inmunes celulares parecen estar alteradas frecuente y tempranamente, mientras que las respuestas humorales se consideran generalmente conservadas al menos hasta los estadios avanzados de la enfermedad.<sup>1</sup> Dentro de esta disociación inmunológica se destaca la depresión de la respuesta inmune celular ejemplificada por anergia a la tuberculina durante la tuberculosis ac-

tiva,<sup>2</sup> y a otros antígenos que provocan respuestas dérmicas de hipersensibilidad retardada,<sup>3</sup> así como por retardo en la eliminación de injertos de tejidos alogénicos,<sup>1</sup> y por depresión de la respuesta blastogénica por mitógenos para linfocitos T. Las alteraciones de la inmunidad celular pueden explicarse por deficiencias funcionales de las células efectoras de las respuestas, o disminuciones cuantitativas de los elementos involucrados.<sup>4</sup> Con respecto a esto no se han señalado variaciones significativas de conteos absolutos linfocitarios en sangre periférica, en relación con la existencia o no de anergia.<sup>7</sup> Sin embargo, los linfocitos T (responsables de las respuestas inmunes celulares) pueden estar disminuidos —aspecto éste que puede evaluarse por cuantificación de

\* Jefe del departamento de biología de tumores. Candidato a Doctor en Ciencias.

\*\* Laboratorio de inmunología. Especialista de I grado en oncología.

\*\*\* Director del Instituto de Oncología y Radiobiología. Profesor.

\*\*\*\* Técnica del IOR.

las diferentes clases de linfocitos. De aquí la conveniencia de estudios de poblaciones T y B en sangre periférica y ganglios linfáticos en estos enfermos.

Hasta el presente los resultados hallados por diferentes autores no concuerdan totalmente, aunque el resultado más frecuente es la disminución de linfocitos T circulantes<sup>8,11</sup> En ocasiones éstos han sido determinados directamente,<sup>11</sup> pero en otras se han señalado disminuciones de linfocitos T a partir de determinaciones de linfocitos B por inmunofluorescencia directa.<sup>11</sup> Otros estudios han realizado determinaciones en sangre periférica y no en ganglios afectados por la enfermedad, o aún en enfermos tratados,<sup>11</sup> y no es fácil concluir si las alteraciones halladas se relacionan primariamente con el cuadro clínico o el tratamiento.

En este trabajo indicamos resultados del estudio de marcadores celulares biológicos E, EA, EAC e IgSC)\* en sangre "Periférica y ganglios linfáticos de personas afectadas de la enfermedad de Hodgkin sin tratamiento previo.

#### MATERIAL Y METODOS

*Pacientes y controles.* Estudiamos 37 pacientes en actividad: 12 del sexo femenino, 25 del masculino, comprendidas en edades de 4 a 67 años (x 28). Los ganglios de todos los pacientes fueron subclasificados históricamente de acuerdo con los criterios de *Lukes, Butler y Hicks* En tres de los pacientes la enfermedad fue clasificada como predominio linfocítico, en 10 como esclerosis

nodular, en 22 como celularidad mixta y en 2 como depleción linfocitaria. El estadiamiento clínico se realizó de acuerdo con los criterios de la conferencia sobre estadiamiento de *Ann Arber* de 1971.<sup>15</sup> Nueve de los pacientes se encontraban en etapa I, 9 en etapa II, 17 en etapa III y 2 en etapa IV. El número de pacientes estudiados, tipo histórico y etapas clínicas se muestran en el cuadro I.

Los valores porcentuales de linfocitos T y B fueron evaluados en 37 muestras de sangre periférica y en 32 muestras de ganglios linfáticos afectados. Estudiamos 30 muestras de sangre periférica de donantes de banco de sangre para obtener controles normales.<sup>10</sup> Los valores de las distribuciones de linfocitos T y B del ganglio como referencia se obtuvieron de la literatura.<sup>17,18</sup>

#### Obtención de células linfoides

Las células mononucleares se obtuvieron de sangre venosa anticoagulada con heparina libre de preservativo (25 U/ml de sangre), 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 bisacotil-amino-2, 4, 6 triiodobenzoico), diluido en agua destilada (densidad 1,078)- Las muestras se

#### CUADRO I

PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN SEGUN ETAPA CLINICA Y TIPO HISTICO

#### ABREVIATURAS\*

Rosetas E:	rosetas espontáneas.
EA-	eritrocito-anticuerpo.
EAC:	eritrocito anticuerpo-complemento.
IgSC:	inmunoglobulina de superficie celular.
T:	timo derivado.
Eadr:	linfocitos T con alta densidad de receptores.
Ebdr:	linfocitos T con baja densidad de receptores.

Tipo	E t a p a s				Total	
	Hístico	I	II	III		IV
PI		1		2	3	
EN	3		1	6	—	10
CM	5		7	9	1	22
DI	—		1	—	1	2
Total	9		9	17	2	37

PI: Predominio linfocítico.  
 EN: Esclerosis nodular.  
 CM: Celularidad mixta.  
 DL: Depleción linfocitaria.

centrifugaron a 1 500 x g durante 30 minutos. Las células extraídas del anillo blanquecino de la interfase son lavadas 3 veces con medio de cultivo Eagle- MEM a 4°C y contadas en un hemocitómetro. La viabilidad fue determinada por la exclusión de azul de tripán y usualmente superior a 95%. Se realiza con extensiones teñidas con hematoxilina-eosina.

#### Preparación de la suspensión celular de los ganglios

La pieza para la biopsia es recogida en medio de cultivo Eagle-MEM y comenzada a procesar aproximadamente a los 15 minutos de su extracción, separando mecánicamente las células, las cuales son lavadas 3 veces, contadas y ajustadas a  $2-4 \times 10^7$  cel/ml.

#### Estudio de poblaciones linfoides

Las preparaciones celulares se estudiaron con el propósito de determinar IgSC por inmunofluorescencia directa, como marcador de linfocitos B, receptores para Fe por rosetas EA y para la fracción C3 del complemento activado por rosetas EAC. La formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero (E), se realizó como marcador de linfocitos T.<sup>16</sup>

La inmunofluorescencia directa se llevó a cabo según Cerottini y Brunner<sup>19</sup> con ligeras modificaciones durante la

incubación (5 minutos a 37°C, 40 minutos a 4°C), utilizando un antisuero polivalente de oveja anti Ig humanas marcado con isotiocianato de fluoresceína (Wellcome R. Ltd., MF 01, lote K 9631), diluido 1:20 y en amortiguador TD, pH 7,4 y con lecturas inmediatas en un microscopio de fluorescencia ML-2A (URSS).

Fueron evaluadas al menos 200 células por lámina, dando como positivas las que revelaban más de 3 puntos fluorescentes en membrana mediante epiluminación, previamente identificadas en contraste de fases.

Las rosetas EA se lograron por incubación de eritrocitos humanos con un antisuero de conejo inmunizado con hematíes AB en concentraciones subaglutinantes. Los hematíes después de lavados 3 veces se incubaron con los linfocitos y las suspensiones de células ganglionares en un proceder similar al de Huber.<sup>10</sup>

Para las rosetas EAC los hematíes EA fueron lavadas e incubadas con suero humano fresco normal y diluido (como fuente de complemento) según Michlmayer.<sup>11</sup> Las rosetas E se realizaron de acuerdo con Jondal,<sup>22</sup> excepto en que al final fueron fijadas en glutaraldehído diluido al 0,6% en solución amortiguadora TD pH 7,3. Se discriminaron linfocitos que unen más de 7 eritrocitos de carnero como formadores de rosetas de alta densidad de receptores, y los que unen entre 3 y 7 eritrocitos como de baja densidad de receptores.<sup>16</sup>

CUADRO II

#### POBLACIONES LINFOIDES EN SANGRE PERIFERICA

		IgSC	Eadr	Ebdr	EA	EAC
Controles	M	16,58	18	57	21,45	21,04
	N	30	30	30	30	30
	DS	5,01	5,96	8	6,93	6,28
Enf. de Hodgkin	M	15,12	28,95	42,52	29,22	26,45
	N	37	21	21	22	22
	DS	6,64	13,97	11,32	9,03	8,56
	t (Student)	0,99	3,83	5,36	3,51	2,63
	Significación	NS	p 0,01	P 0,01	P 0,01	P 0,01

M: Media N: Número de muestras DS: Desviación estándar Eadr Rosetas alta densidad de receptores

Ebdr. Rosetas baja densidad de receptores. NS: No significativo.

El nivel de significación estadística se estableció por el test de la T de Student.

#### RESULTADOS

Las células obtenidas por gradiente de verografía mostraron una pureza mayor del 98% de células mononucleares. Usualmente, entre el 5-15% de las células mostraron un diámetro mayor de 10-12 micras y núcleo escotado; estas células fueron consideradas monocitos. La viabilidad mostrada es habitualmente superior al 95%, según el criterio de exclusión de azul de tripán. Regularmente se obtienen de  $1-2 \times 10^6$  cel/ml de sangre de un donante de sangre normal. La suspensión celular total de los ganglios linfáticos tiene una viabilidad superior al 60% por test de exclusión de azul de tripán.

##### *Células linfoides en sangre periférica*

En el cuadro II se muestran los valores porcentuales de linfocitos que presentan inmunoglobulinas de superficie celular, de los formadores de rosetas espontáneas con alta y baja densidad de receptores, de rosetas EA y EAC encontrados en la muestra normal control y en la de pacientes. Es de destacar que los valores de linfocitos IgSC son prácticamente idénticos entre sí, mientras que los de linfocitos formadores de rosetas

Eadr, EA y EAC en la enfermedad de Hodgkin están elevados y los formadores de rosetas Ebdr disminuidos.

##### *Células linfoides en ganglio linfático*

Los valores encontrados de linfocitos IgSC + EA + y EAC +, y formadores de rosetas Eadr y Ebdr se muestran en el cuadro III. En el mismo se comparan dichos valores con los encontrados para los mismos marcadores de linfocitos en sangre periférica de pacientes con enfermedad de Hodgkin. En el ganglio encontramos que la población IgSC + está aumentada con respecto a la sangre periférica (cuyos valores son similares a los de la muestra normal) (cuadro II), y la población Ebdr se encuentra disminuida si la comparamos con los valores obtenidos de sangre periférica de pacientes, con valores muy inferiores a los de individuos normales. La población linfocitoide en sangre periférica y ganglio linfático de pacientes con enfermedad de Hodgkin, según nuestros resultados, tienen un perfil que puede expresarse de la siguiente forma: linfocitos IgSC + normales, Eadr, EA, EAC aumentados y Ebdr disminuidos en sangre periférica, y valores en ganglio linfático de linfocitos IgSC + aumentados, Eadr, EA y EAC similares a los de sangre periférica, mientras los linfocitos Ebdr +, se hallan disminuidos con respecto a la misma (cuadro IV).

#### CUADRO III

POBLACIONES LINFOIDES EN SANGRE PERIFERICA Y GANGLIO LINFATICO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN

		IgSC	Eadr	Ebdr	EA	EAC
Sangre periférica	M	15,12	28,95	42,52	29,22	26,45
	N	37	21	21	22	22
	DS	6,64	13,97	11,32	9,03	8,56
Ganglio linfático	M	20,75	29,25	30,77	31,10	26,20
	N	32	20	20	20	20
	DS	6,70	15,09	13,34	9,43	9,27
	t (Student)	3,50	0,06	3,04	0,66	0,09
	Significación	p0,01	NS	p0,01	NS	NS

M: Media. N: Número de muestras. DS: Desviación estándar. Eadr: Rosetas de alta densidad de receptores. Ebdr: Rosetas de baja densidad de receptores. NS: No significativo.

#### CUADRO IV

##### PERFIL DE MARCADORES LINFOIDES EN SANGRE PERIFERICA Y GANGLIO LINFATICO

Marcador					
Muestra	IgSc	Eadr	Ebdr	EA	EAC
S. P.	N	↑	↓	↑	↑
G.L.	↑	↑	↓	↑	↑
Comparados	con	valores	de sangre periférica		

normal.

#### DISCUSION

La posibilidad de distinguir diferentes linfocitos mediante marcadores específicos de tipos celulares ha sido un gran avance en inmunología,<sup>23</sup> en estudio de hnfoproliferaciones y en las investigaciones biológicas en general. Hemos hallado un perfil de distribución de linfocitos con diferentes marcadores al investigar muestras de sangre periférica y ganglios linfáticos en pacientes con enfermedad de Hodgkin. Este tipo de trabajo ha atraído la atención de varios investigadores anteriormente. *Grifoni*<sup>24</sup> encontró un aumento de linfocitos IgSC + y lo atribuyó a una respuesta humoral antilinfocitaria. Realmente esta posibilidad es interesante, pues, los pacientes con enfermedad de Hodgkin no muestran un nivel elevado de inmunoglobulinas en suero.

Quizás esa pudiera ser la explicación para nuestros resultados con linfocitos IgSC + en ganglios. Sin embargo, un aumento de linfocitos B, compensatorio de la disminución de linfocitos T, sería una explicación alternativa.

Los niveles aumentados de células EA + y EAC + pueden intentar explicarse por la actividad funcional natural de estos receptores y el destino de los complejos antígenos-anticuerpo y antígeno-anticuerpo-complemento.

En la enfermedad de Hodgkin se ha informado la presencia de inmunocomplejos.<sup>25</sup> El aumento de células con receptores funcionales para inmunocomplejos, con complemento fijado o sin

éste, está acorde con estos hallazgos. El comportamiento de linfocitos con receptores para eritrocitos de carnero es interesante. Hemos informado antes que en muestras normales de sangre periférica<sup>11</sup> las cifras de linfocitos con 3 y 7 hematías de carnero unidos era regularmente constante, así como la fracción de linfocitos que unían más de 7 eritrocitos de carnero. Consideramos a los primeros como linfocitos de baja densidad de receptores (Ebdr) para eritrocitos de carnero, y a los últimos como de alta densidad de receptores (Eadr). Los valores porcentuales de linfocitos Eadr de la muestra estudiada no se diferencian entre sangre periférica y ganglio, lo que puede explicarse si presumimos que sea una fracción que recircula libremente entre ambos compartimientos. La fracción Ebdr se encuentra disminuida en ganglio con respecto a sangre periférica de pacientes. Este detalle es de interés porque los valores porcentuales de linfocitos Ebdr + de sangre periférica de pacientes son inferiores a los de individuos normales ( $p < 0,01$ ). Es decir, la forma disociada en que se distribuyen Eadr y Ebdr en sangre periférica y ganglio de pacientes con enfermedad de Hodgkin, puede ser un elemento más a favor de que constituyan dos subpoblaciones diferentes, o al menos, células en diferentes estadios de maduración, con diferentes capacidades efectoras.

El significado funcional de ambas poblaciones no está claro. La posibilidad de que las células Eadr desempeñen una función activa como células supresoras explicaría su aumento durante una enfermedad con deficiencias de la respuesta inmune celular. En este contexto, a las células Ebdr se les pudiera adjudicar la función de células efectoras de dicha respuesta.

Los hallazgos de otros investigadores son interesantes a la par que contradictorios. *Ramot* (1973)<sup>11</sup> encontró aumento de linfocitos B por inmunofluorescencia directa, en sangre periférica de pacientes en actividad al igual que *Gergely* (1973)<sup>26</sup>, aunque los linfocitos T no se determinaron directamente en estas in-

vestigaciones. *Kazimiera*, '-' por el contrario, encontró en 9 de 13 pacientes disminución de linfocitos B por el mismo criterio. Cohen (1973)<sup>18</sup> encontró disminución del valor absoluto de linfocitos T en 5 de 10 muestras de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Hodgkin, al igual que *Bukowsky* (1976)<sup>19</sup> en 12 de 15 pacientes. *Many* (1976)<sup>25</sup> obtuvo resultados similares, pero gran número de sus pacientes había sido tratado. *Ramat y colaboradores* (1976)<sup>26</sup> incubaron *in vitro* linfocitos con levamisol, concluyendo que la depleción de la población E + no es debida a una depleción real de linfocitos T. Los resultados obtenidos por *Strober* (1975)<sup>30</sup> sugieren que la población T no está generalmente disminuida en número. *Fróland* (1973- encontró que al inicio de la enfermedad, no se alteran los valores de linfocitos

T ni B. *Payne* (1976)<sup>17</sup> encontró valores elevados de linfocitos T tanto en ganglios afectados como en bazo no afectados por la enfermedad.

Los resultados de estudios funcionales realizados<sup>13,19,20</sup> no encuentran generalmente correlación entre alteraciones de las poblaciones y tests funcionales o características clínicas, como etapa, duración de la enfermedad, etc

Nuestros resultados concuerdan con los informados en ciertos trabajos. Las investigaciones en este campo son de gran interés.

El perfil de marcadores linfoides en sangre periférica y ganglio señalado en el presente trabajo, pudiera ser útil, como un elemento más que se aporta a otras investigaciones.

#### SUMMARY

Cervantes, C. et al. *Biological markers in the Hodgkin's disease. I. T and B lymphoid populations at the peripheral blood and lymphatic nodes.* Rev Cub Med 20: 3, 1981.

Immune markers of lymphoid populations at peripheral blood (37 samples) and lymphatic node (32 samples) from patients with Hodgkin's disease are study. E, EA and EAC-rosettes, and lymphocyte direct immunofluorescence with human antimmunoglobulin serum markers were used. The obtained results show a lymphoid population profile in this disease of normal Ig SC<sup>+</sup> lymphocytes at the peripheral blood, as well as increased Eadr, EA and EAC, and decreased Ebdr. At node, Ig SC<sup>+</sup> lymphocyte appear to be increased, Eadr, EA and EAC with similar values to those of the peripheral blood, and the Ebdr are found to be decreased.

#### RÉSUMÉ

Cervantes, C. et al. *Marqueurs biologiques dans la maladie de Hodgkin. I. Populations lymphoïdes T et B dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques.* Rev Cub Med 20: 3, 1981.

Les auteurs étudient les marqueurs immunologiques de populations lymphoïdes de sang périphérique (37 échantillons) et de ganglions lymphatiques (32 échantillons) de patients porteurs de la maladie de Hodgkin. Les marqueurs utilisés ont été les rosettes E, EA et EAC, et l'immunofluorescence directe de lymphocytes avec un sérum anti-immunoglobulines humaines. Les résultats obtenus montrent un profil de population lymphoïde, dans cette maladie, de lymphocytes Ig SC normaux dans le sang périphérique, ainsi que Eadr, EA et EAC augmentés et Ebdr diminués. Dans les ganglions, les lymphocytes Ig SC<sup>+</sup> paraissent augmentés; l'Eadr, EA et EAC ont des valeurs similaires à ceux du sang périphérique; et Ebdr sont diminués.



- of mononuclear cells. Immunology 17: 7  
1969.
21. *Michlmayer, G.; H. Huber.* Receptor sites for complement on certain human peripheral blood lymphocytes. J Immunol 105: 670  
1970.
  22. *Jondal, M. et al.* Surface markers on human T and B lymphocytes. J Exp Med 136: 207,  
1972.
  23. *Fróland, S. S.; J. B. Natving.* T and B lymphocytes in human. Transplant Rev 16: 152  
1973.
  24. *Griffoni, V. et al.* Surface immunoglobulins on lymphocytes in Hodgkin's disease. Lan-  
cet I: 848, 1972.
  25. *Kávai, M. et al.* Immune complexes in Hodgkin's disease. Lancet I: 1249, 1976.
  26. *Gergely, P. et al.* Lymphocyte surface im-  
munoglobulin in Hodgkin's disease. N Engl J Med  
289: 220, 1973.
  27. *Kazimiera, J. et al.* B lymphocytes in un-  
treated patients with malignant lymphoma and Hodgkin's  
disease. J Clin Invest 52: 3064, 1973.
  28. *Many, A. et al.* The distribution of B and T  
lymphocytes in the peripheral blood of patients with  
Hodgkins' disease. Acta Haemat 56: 1, 1976.
  29. *Ramont, B. et al.* Effect of levamisol in E  
rosette forming cells in vivo and in vitro Hodgkin's disease.  
N Engl J Med 294: 209,  
1976.
  30. *Strober, S.; H. S. Kaplan.* Quantitation of T and B  
lymphocytes and cellular immune function in  
Hodgkin's disease. Cáncer 36: 169, 1975.

Recibido: enero 15, 1980 Aprobado: noviembre  
15, 1980.  
Dr. *Carlos Cervantes*  
Instituto de Oncología y Radiobiología  
Calle F y 29, Vedado.