

Técnicas de rosetas. Su aplicación en pacientes con alteraciones inmunológicas

Por:

CARLOS CRUZ,³ NORA L. FERNANDEZ,⁴ BENITO BERNAL,⁵ PORFIRIO HERNANDEZ⁶
y JOSE M. BALLESTER⁹

Cruz, C, y otros. *Técnicas de rosetas. Su aplicación en pacientes con alteraciones inmunológicas.* Rev Cub Med 20: 4, 1981.

Se estudiaron distintos factores que pueden influir en la técnica de la roseta espontánea (roseta E): el medio de cultivo, el anticoagulante, la acción del suero humano en el medio, el comportamiento de eritrocitos de carnero de distinta procedencia, los tiempos de incubación a 37°C y la relación linfocito-eritrocitos de carnero. Se hallaron diferencias significativas en la influencia del anticoagulante, los tiempos de incubación y la relación linfocito-eritrocitos de carnero. Se informan los resultados obtenidos con la roseta E y la roseta inmune usando eritrocitos recubiertos de anticuerpos y complemento (roseta EAC) en un grupo de sujetos normales (niños y adultos), así como en algunos pacientes con infecciones recurrentes.

Desde la década pasada se observó que una parte considerable de los linfocitos de la sangre periférica humana adherían espontáneamente a su superficie hemáticas de ciertas especies y en particular los de carnero. Hoy se sabe que los linfocitos timodependientes son los implicados en dicho fenómeno conocido con el nombre de "formación de rosetas espontáneas". Por tanto, la prueba de la formación de rosetas espontáneas (rosetas E) es ampliamente utilizada en la actualidad para enumerar los linfocitos T.

Con posterioridad se encontró que otra población linfocitaria unía complejos antígeno-anticuerpo-complemento. Actualmente se conoce que gran parte de esta población está constituida por linfocitos timo independientes o linfocitos B. Esta población puede ser estudiada por las rosetas para receptores de complemento (rosetas EAC).

En la inmunología actual ha sido de gran importancia la hipótesis de Cooper y Good¹ sobre la existencia de, al menos, dos poblaciones linfoides en los vertebrados, los cuales se han podido diferenciar claramente en las aves. El timo se considera que es el lugar donde reciben la inmunocompetencia los linfocitos T, llamados por tanto timodependientes y responsables de la inmunidad

3 Licenciado en biología. Departamento de inmunología.

4 Licenciada en biología. Departamento de inmunología. Instituto de Oncología y Radiobiología.

5 Médico especialista. Departamento de inmunología.

6 Médico especialista. Clínica de adultos.

celular. Por otra parte, tenemos a la *Bursa* de Fabricio como órgano entrenador de los linfocitos B o timoindpendientes, que luego de diferenciarse en células plasmáticas adquieren la responsabilidad de la inmunidad humoral. Aunque no se conoce con exactitud el equivalente de la *bursa* en el humano, no hay duda de la existencia en éste de linfocitos T y B.

La enumeración de ambas poblaciones linfocitarias en la sangre periférica tiene una importancia indiscutible. Las técnicas de rosetas no sólo son instrumentos valiosos en las investigaciones puras, sino que ofrecen gran ayuda en el diagnóstico de las inmunodeficiencias⁵ en la clasificación de las enfermedades linfoproliferativas⁶⁻⁸ en el pronóstico y tratamiento de ciertas enfermedades^{8,9}.

Teniendo en cuenta la disparidad de los resultados registrados en la literatura con respecto a la prueba de la roseta espontánea, parte de este trabajo se ha encaminado al estudio de los aspectos que consideramos de mayor importancia para la obtención de valores confiables en nuestras condiciones de laboratorio: el medio de cultivo, la acción del suero humano en el medio, la influencia del anticoagulante, el comportamiento de diferentes fuentes de eritrocitos de carnero, la relación eritrocito de carnero-linfocito, así como la influencia de diferentes tiempos de incubación.

El otro propósito después de optimizada la técnica de la roseta espontánea y con la aplicación de la técnica de Stjernswárd⁹ ligeramente modificada,¹⁰ ha sido el establecimiento de valores normales en niños y adultos, así como el estudio de ambas poblaciones linfocitarias (T y B) en algunos pacientes con infecciones recurrentes.

MATERIAL Y METODO

Se estudió un total de 38 sujetos sanos: veinte adultos comprendidos entre 18 y 55 años y dieciocho niños comprendidos entre 7 y 13 años.

En el grupo de pacientes se estudiaron 30 niños, cuyas edades oscilaban

entre 1 y 14 años, que padecían de infecciones recurrentes y los cuales habían recibido hospitalización por esta causa en no menos de dos ocasiones en los 6 meses anteriores a este estudio.

En las técnicas realizadas se utilizaron:

- 1) Solución de Hanks más suero AB al 25% descomplementado y absorbido con eritrocitos de carnero.
- 2) Solución salina fisiológica al 0,9% más suero AB al 25%.
- 3) Parker 199.
- 4) Heparina sin coiservadores.
- 5) EDTA.
- 6) Eritrocitos de carnero utilizados dentro de los siete días de la extracción y conservados estériles en solución de Alsever a 4°C.

Los linfocitos fueron aislados según la técnica de Bóyum¹¹ modificada utilizando Telebrix 38.

Para la detección de los linfocitos T utilizamos la técnica de Bach modificada.¹²

Los linfocitos se obtuvieron de la sangre periférica heparinizada (12 UI x ml), que se diluyó en la proporción 1:1 en solución de Hanks y se llevó a un gradiente de Ficoll-Telebrix 38 centrifugando a 500 g durante 20 minutos a temperatura de 20°C.

Los linfocitos obtenidos se lavaron 3 veces en solución de Hanks. Después del último lavado se resuspendieron en solución de Hanks que contenía suero AB al 25% y la concentración se ajustó a 4×10^6 /ml.

Se preparó una suspensión de hematíes de carnero en el mismo medio a la concentración de $1,6 \times 10^9$ /ml. Los eritrocitos habían previamente recibido 3 lavados con solución salina fisiológica al 0,9%. Se pusieron en contacto 0,25 ml de esta suspensión de hematíes con 0,25 ml de la suspensión de linfocitos y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se incubaron por

18 horas a 4°C, se fijó con glutaraldehído al 0,6% durante 20 minutos a 4°C haciéndose un lavado con solución *tampon* de fosfatos (PBS)-* Finalmente se hizo la resuspensión en 0,25 ml de PBS y se añadió una gota de azul de toluidina al 0,5% con vista a favorecer la observación. De esta forma se llevó al hematocímetro, contándose no menos de 200 células. Se consideró célula formadora de roseta aquella que tenía adheridos a su superficie no menos de 3 hematíes de carnero.

Para la detección de los linfocitos B se utilizó la técnica de Stjernswárd¹ ligeramente modificada por García Rodríguez¹⁰

Los linfocitos se obtuvieron en la forma descrita anteriormente, ajustándose a la concentración de 2×10^6 células x ml.

Los eritrocitos de carnero, después de lavados 3 veces con solución salina fisiológica y una vez con PBS, se prepararon al 5% en solución de Hanks. Se puso en contacto 5 ml de esta suspensión con 5 ml de solución de hemolisina antieritrocito de carnero diluida 1:1 000 en PBS.

Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después de este tiempo los hematíes así tratados se lavaron 2 veces en solución de Hanks. Se resuspendieron en 5 ml de esa solución y se le añadieron 5 ml de suero fresco humano AB en la proporción 1:20 en el mismo diluyente. Después se incubó a 37°C durante 20 minutos y se lavó 2 veces con solución de PBS. Finalmente dichos eritrocitos fueron ajustados al 1% poniéndose en contacto 0,25 ml de esta suspensión con 0,25 ml de la suspensión de linfocitos.

Se centrifugó 5 minutos a 200 g e incubamos 30 minutos a 37°C. Luego se hizo la resuspensión y se contaron en el hematocímetro no menos de 200 células. Se consideró como célula formadora de roseta aquella que al menos adhirió 3 hematíes en su superficie.

RESULTADOS

La evaluación del medio puede verse en el cuadro I. Los linfocitos de 5 adultos normales fueron resuspendidos en 4 medios diferentes: solución salina fisiológica más suero AB al 25% (Ia). Hanks más suero AB al 25% (Ib), PBS más suero AB al 25% (Ic) y Parker 199 (Id). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes resultados.

En el cuadro II se presentan los datos relacionados con la acción del suero humano en el medio. Los linfocitos de 3 adultos normales fueron tratados con Hanks más suero AB al 25% (IIa) y con Hanks sin suero AB (IIb); no se encontraron diferencias significativas, aunque sí valores más altos cuando se usó Hanks con suero AB al 25%.

CUADRO I

EVALUACION DEL MEDIO DE CULTIVO				
	I _a (%)	I _b (%)	I _c (%)	I _d (%)
I	63,5	59,5	70,0	63,0
II	65,0	69,5	74,0	64,5
III	66,5	68,5	64,0	69,5
IV	59,5	69,5	63,0	67,0
V	64,0	61,5	64,5	65,0

CUADRO II

INFLUENCIA DEL SUERO HUMANO EL MEDIO DE CULTIVO		
	II _a (%)	II _b (%)
I	54,6	67,0
II	59,5	65,5
III	81,5	84,5

En el cuadro III se presenta la influencia del anticoagulante en los resultados. Los linfocitos de 5 controles fueron obtenidos con el uso de 2 anticoagulantes diferentes, heparina (IIIa) y EDTA (IIIb). Se obtuvieron valores más altos cuando se utilizó la heparina con una diferencia significativa para una $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos con el uso de 4 fuentes diferentes de eritrocito de carnero se detallan en el cuadro IV. Los linfocitos de 5 controles normales se enfrentaron a hematíes de 4 carneros diferentes (C₁, C₂, C₃ y C₄).

No se encontró diferencia significativa entre los hematíes de los diferentes carneros para una $p < 0,05$.

En el cuadro V se presentan las distintas proporciones usadas de eritrocitos de carnero-linfocitos. Los linfocitos de 3 controles normales fueron tratados con 6 concentraciones diferentes de eritrocito de carnero con las relaciones 4:1, 8:1, 16:1, 24:1, 40:1, 60:1. Se encontró que la proporción 40:1 resultó óptima.

En el cuadro VI se detallan las comparaciones individuales entre las diversas proporciones encontrándose diferencias no significativas (NS) solamente entre las proporciones de 40 y 60.

Los tiempos de incubación a 37°C previos a la incubación a 4°C se presentan en el cuadro VII. Los linfocitos de 5 con-

CUADRO III
INFLUENCIA DEL ANTICOAGULANTE EN LOS RESULTADOS DE LA ROSETA E

	IIIa (%)	IIIb (%)
I	81,5	65,0
II	79,0	61,0
III	82,0	54,0
IV	66,0	55,0
V	69,0	62,0

CUADRO IV
RESULTADOS DE LA ROSETA E USANDO ERITROCITOS DE DIFERENTES CARNEROS

	C ₁ (%)	C ₂ (%)	C ₃ C ₄ (%) (%)
I	64,0	74,0	63,0 63,0
II	63,5	73,5	64,5 66,5
III	69,0	61,5	72,5 67,0
IV	76,5	75,5	78,0 80,5
V	84,0	77,5	71,5 70,0

CUADRO V
RESULTADOS OBTENIDOS CON PROPORCIONES DIFERENTES DE ERITROCITOS DE CARNERO-LINFOCITOS

	4:1 (%)	8:1 (%)	16:1 (%)	24:1 (%)	40:1 (%)	60:1 (%)
I	18,25	26,5	43,5	53,5	68,5	62,5
II	8,75	17,0	30,25	51,25	65,5	60,5
III	17,5	22,5	31,5	49,5	69,5	60,0

CUADRO VI
COMPARACION ENTRE LOS RESULTADOS
OBSERVADOS CON LAS DISTINTAS
PROPORCIONES DE ERITROCITOS DE
CARNEROS-LINFOCITOS

	4:1	16:1	16:1	24:1	40:1	60:1
4:1		---S	S	S	S	S
8:1		---	S	S	S	S
16:1			---	S	S	S
24:1				-	S	S
40:1					---	NS
60:1						—

CUADRO VII
RESULTADOS DE LA ROSETA E A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

	Tiempos de incubación a 37°C						
	0' (%)	5' (%)	10' (%)	20' (%)	30' (%)	45' (%)	60' (%)
I	74,0	59,0	63,0	52,0	44,0	45,0	37,0
II	71,0	69,0	68,0	70,0	58,0	36,0	42,0
III	68,0	57,0	35,0	33,0	28,0	36,0	37,0
IV	69,0	62,0	• 58,0	63,0	32,0	36,0	25,0
V	69,0	60,0	48,0	46,0	43,0	36,0	32,0

CUADRO VIII
COMPARACION ENTRE LOS RESULTADOS OBSERVADOS CON DISTINTOS
TIEMPOS DE INCUBACION

	Tiempo de incubación a 37°C						
	0'	5'	10'	20'	30'	45'	60'
0'	-	NS	S	S	S	S	S
5'	—	-	NS	NS	S	S	S
10'			-	NS	S	S	S
20'				-	S	S	S
30'					-	NS	NS
45'						-	NS
60'							—

R.C.M.
JULIO-AGOSTO, 1981



DISCUSION

Con respecto a los parámetros técnicos estudiados en la prueba de la roseta espontánea, observamos que el medio no es una fuente de variación. Resultados similares han sido informados por otros autores, como *Bach* y *Lay*.^{13,14} En cuanto a la presencia de suero en el medio, independientemente de que no existan diferencias significativas con el uso de suero AB humano al 25%, notamos que cuando éste se empleó, otuvimos valores mayores que cuando no se utilizó, en forma similar a lo encontrado por *Bach*.¹³ En cuanto al anticoagulante, encontramos diferencias significativas entre la heparina y el EDTA, ya que obtuvimos valores inferiores en el número de rosetas al emplear EDTA, lo que coincide con lo informado por *Jondal*.⁷ El uso de eritrocitos de diferentes carneros sanos no nos ofreció diferencias significativas, lo que también ha sido informado por *Brain*.¹⁰ La incubación a 37°C de los linfocitos durante más de 5 minutos sí produjo diferencias significativas. Sin embargo, no hubo diferencias entre la no incubación y la incubación durante 5 minutos, por lo que se optó por no incubar a 37°C. Estos resultados no concuerdan con lo informado por *Lay*.¹⁴ La proporción de linfocito-eritrocito de

carnero, en nuestra opinión, es uno de los factores más importantes. La literatura informa una gran variabilidad en este aspecto. Nuestra experiencia práctica nos hizo tomar la relación 1:40 como la óptima.

El ligero aumento observado en nuestros valores para la roseta EAC es posible que se deba a elementos contaminantes de las muestras, pues como se sabe este fenómeno no es exclusivo del linfocito B, ya que el receptor para Cub está presente en los polimorfonucleares, células rojas y macrófagos humanos, aunque nuestros resultados son similares a los informados por *García Rodríguez*¹⁰ y otros.

Cuando comparamos los resultados de la roseta E obtenidos en nuestro trabajo con los informados por otros autores,^{8,17} puede observarse que los mismos son prácticamente semejantes.

Los resultados globales que exponemos sobre niños con infecciones recurrentes, son producto de un trabajo preliminar en esta materia. Un estudio en el cual se enfoca más detalladamente a estos pacientes y en el cual se incluye un número mayor de marcadores de superficie en el linfocito será objeto de una próxima publicación.

SUMMARY

Cruz, C. et al. *Rosette techniques: its application to patients with immunological disorders.* *Rev Cub Med* 20: 4, 1981.

Several factors as culture medium, anticoagulant, human serum action at medium, behavioral sheep erythrocytes from different sources, incubation time at 37°C and sheep-erythrocyte relation, that may influence on the spontaneous rosette technique were studied. Significant difference on anticoagulant influence, incubation time and sheep lymphocyte-erythrocyte relation were found. The obtained results with E-rosette and immuno-rosette using antibody recovered erythrocytes and complement (EAC-rosette) in a group of normal subjects (children and adults) as well as a few patients with recurrent infections are reported.

RÉSUMÉ

Cruz, C. et al. *Techniques de rosettes: son application chez des patients avec des altérations immunologiques.* *Rev Cub Med* 20: 4, 1981.

Différents facteurs pouvant influencer sur la technique de la rosette spontanée (rosette E) ont été étudiés, tels que: le milieu de culture, l'anticoagulant, l'action du sérum humain dans le milieu, le comportement des érythrocytes de mouton de différente provenance, les

temps d'incubation á 37°C et le rapport lymphocytes-érythrocytes de mouton. Des différences significatives ont été trouvées en ce qui concerne l'influence de l'anticoagulant, les temps d'incubation, et le rapport lymphocytes-érythrocytes de mouton. Les auteurs rapportent les résultats obtenus avec la rosette E et la rosette immune en employant des érythrocytes couverts d'anticorps et de complément (rosette EAC) chez un groupe de sujets normaux (enfants et adultes), ainsi que chez certains patients ayant des infections récurrentes.

PE3KME

KpyC, K. H. ap. UeTOSH PO30TOE, HX npiieMHia 18 OOfthi 0 JH/UJIfOBOPH^eCKHifl nopai fI HHHI íHRev Cub Med 20: k, 1981.

Bhm Hav'janu pasumnas \$8KTopw Kotopwa Moryt noBfIHHTi la m* TOJH P0S8T0K CnOHTBHHC (DO30TKa E) L: «TOS KyITfcTHBfl, 8HT1K08.* ryirapyioBero B0®ec?Ba, ionctbisq... ejiOBfI JI CKOit chboptkh b cpaaa* noBea9HH0 (5ap8Hi>ero apnI podii?a paajonjoro nnoHCxoiaeuHfl, Bpa-HHiry6am!H npi TeimepaType b 37 C a cbsb iraii(O)0ima-9pHip0 - qua dapaua. EhuH o.CRapyxenH SHa^HTOJiBiHa aB\$sepe&ann b 8nth, - KoaryOTpyDnen B0®ecTBo, bpoMohh miKyOaqii I cbsb MM<J>oiyia-aii ppoqua fiapaua.B MacroHmefi pafiOTa HHijopirapyBtoa peayiii Taru, Jjytl SHHie C PO30TK00 E H HMMYHHOH PO30TKO* npiMOHH apHTpOqaj nojiy^eHHI as auTioa h KomuajioRTa (po30TJta BAC) b ppydne - HopiiasBiHx cyTiaKIOB ta0T0* h BspoeiHx), a raree y pasaiwHr- namefIOB e B03Bpatreini in KqniUii.

BIBLIOGRAFIA

1. Cooper, M. D. et al. The two component concept of the lymphoid system. In immunologic deficiency diseases of man. Page 7, Editors D. Bergsma and R. A. Good. Birth Defects Series. The National Foundation, Washington, 1968.
2. Lisner, H. et al. Deficiency of lymphocytes forming rosettes with sheep erythrocytes in partial D; George Syndrome, 43 Annals Meeting. The Society for Pediatric Research, May 17-19, San Francisco. Pediatr Res 7: 363, 1973.
3. Wybran, J. et al. The human rosette forming cell as a marker of a population of thymus derived cells. J Clin Invest 51: 25, 1972.
4. Wybran, J. et al. Rosette forming cells, immunologic deficiency disease and transfer factor. N Engl Med 288: 710, 1973.
5. Yata, J. et al. Lymphocytes in primary immunodeficiency diseases. VIII Congreso Internacional de Alergología, Tokio. Excerpt Med International Congress Series, 3170 1973.
6. Smith, J. L. Characterization of malignant mediastinal lymphoid neoplasm (Sterberg sarcoma) as thymic in origin. Lancet I: 74 1973.
7. Wybran, J. et al. Isolation of normal T cells in chronic lymphatic leukaemia. Lancet I: 126, 1973.
8. Wybran, J.; H. H. Fudenberg. Thymus derived rosette-forming cells in various human disease states: Cancer, lymphoma, bacterial and viral infection and other diseases. J Clin Invest 52: 1026, 1973.
9. Stjernswárd, J. et al. Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by radiation for mammary carcinoma. Lancet I: 1352, 1972.
10. Garcia Rodriguez, M. C. y otros. Test de rosetas. Algunas consideraciones técnicas y aplicación práctica en las inmunodeficiencias. Allerg Immunopathol 2: 247, 1974.
11. Bóyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21 (Supl. 97): 77, 1968.
12. Bach, J. F. et al. Evaluation of T-cells and thymic serum factor in man using the rosette technique. Transplant Rev 16: 196-217, 1973.
13. Bach, J. F. et al. In vitro rosette inhibition by antihuman antilymphocyte serum. Corre-

- lation with skin graft prolongation in sub- human primates. *Transplantation* 8: 265, 1969.
14. *Lay, H. L. et al.* Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature* 230: 531, 1971.
 15. *Jondal, M. et al.* Surface markers on human T and B lymphocytes. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 136: 207, 1972.
 16. *Train, P. et al.* Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 6: 681, 1970.
 17. *Schafer, R. A. et al.* Permanent slide preparations of T lymphocyte-sheep red blood cell rosetes. *J Immunol Methods* 8: 241, 1975.

Recibido: octubre 15, 1979.
Aprobado: junio 2, 1980.

Lic. *Carlos Cruz*
Instituto de Hematología e Inmunología
Apartado 8070. Zona 8
Ciudad de La Habana.