

CUANTIFICACION DE LINFOCITOS T MEDIANTE ROSETAS CON GLOBULOS DE CARNERO Y RESPUESTA MITOGENICA A LECTINAS

Luis González S., * Elizabeth Sáenz B., * Sara Rodríguez A.* y Oscar Porras M. *

Palabras clave: Linfocitos T, Rosetas, Mitogénesis, Lectinas, Inmunodeficiencias.

RESUMEN

En el presente reporte se presentan los resultados obtenidos en las cuantificaciones de linfocitos T mediante la técnica de rosetas con glóbulos de carnero y la medición de las respuestas mitogénicas a lectinas mediante la incorporación de timidina tritiada, en 92 individuos costarricenses sanos utilizados como referencia en la evaluación de pacientes en estudio por infección recurrente.

Aunque se encontró, como ha sido descrito, una gran variabilidad, especialmente en cuanto a las respuestas mitogénicas, fue posible establecer que el promedio de células formadoras de rosetas espontáneas y totales fue de 48 ± 11 y de 56 ± 11 , respectivamente, y que el 90% de las respuestas (percentil 10) estuvo por encima de 6,2; 16,1 y 2,0, como índice de estimulación para concanavalina A, fitohemaglutinina y fitolaca americana, respectivamente.

Se comentan además aspectos del control de calidad y la estandarización

de las técnicas de laboratorio que permiten que estos procedimientos puedan usarse con fiabilidad como apoyo diagnóstico e investigación de diversos cuadros inmunológicos. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1991; 13(1-2): 37- 42).

INTRODUCCION

Las pruebas de laboratorio para evaluar el funcionamiento de los componentes del sistema inmune y ayudar a la clasificación y tratamiento de sus defectos son innumerables (1, 2). Dentro de ellas no puede dejar de considerarse la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos y la medición de la respuesta mitogénica a lectinas, particularmente concanavalina A (Con A) fitohemaglutinina (PHA) y fitolaca americana (PWM). Estas y otras pruebas se consideran rutinariamente en el estudio del componente inmunológico de diversas patologías (1, 3, 4, 5, 6).

Aunque recientemente ha sido sustituida en muchos laboratorios por los análisis por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales, la prueba de formación de rosetas con glóbulos rojos de carnero (GRC), ha sido por muchos años el método clásico para la identificación de linfocitos T. Hoy día, a pesar de sus limitaciones, esta sencilla técnica continúa siendo útil en los laboratorios con recursos económicos limitados, incluso para el aislamiento de poblaciones enriquecidas de linfocitos T para diferentes fines (2, 5).

* Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) Apdo. # 4, Tres Ríos, Costa Rica y Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz H., Caja Costarricense de Seguro Social, San José, Costa Rica.

A partir del primer informe, en 1960, acerca de la capacidad de los mitógenos para inducir la multiplicación de los linfocitos, diversos procedimientos han sido utilizados para cuantificar dichas respuestas (4, 7). El más difundido es aquel que utiliza la adición de un precursor radioactivo del ADN (usualmente timidina tritiada) y la medición posterior de la cantidad de radioactividad incorporada dentro de las células. La Con A estimula a los linfocitos CD4+ y CD8+ con actividad supresora. La PHA estimula tanto a linfocitos CD4+ y CD8+ como a linfocitos B, mientras que se sabe que la PWM estimula tanto la respuesta de células T como de células B dependientes de T (5).

Sin embargo, la difusión del uso de estos procedimientos no ha impedido que exista poca uniformidad con respecto a los criterios utilizados para la interpretación y valoración clínica de los resultados.

En el presente trabajo se describen los resultados de las cuantificaciones de linfocitos T con GRC y los valores de las respuestas mitogénicas a lectinas en 92 individuos costarricenses sanos, y se comentan los mismos con relación a los aspectos técnicos y de estandarización necesarios para el uso e interpretación adecuados de dichos procedimientos en diversas patologías.

MATERIALES Y METODOS

Se incluyó en este estudio a 92 individuos costarricenses sanos (40 hombres y 52 mujeres) con edades comprendidas entre 17 y 49 años, que entre 1986 y 1990 fueron considerados como controles sanos en las pruebas de cuantificación de rosetas con GRC y la estimulación blástica con Con A, PHA

y PWM practicadas en nuestro laboratorio a pacientes en estudio por infección recurrente, utilizando procedimientos previamente descritos (8).

Las muestras se obtuvieron por punción venosa utilizando heparina como anticoagulante (1 UI/ml) y fueron procesadas dentro de las siguientes dos horas. Las células mononucleares (CMN) fueron separadas utilizando gradientes de Ficoll-Hypaque (SIGMA). Para las mediciones de transformación mitogénica de linfocitos, 2×10^5 CMN de cada individuo fueron estimuladas por triplicado con concentraciones óptimas finales de concanavalina A (Con A, 3,25 $\mu\text{g/ml}$), fitohemaglutinina (PHA, 6,5 $\mu\text{g/ml}$) y fitolaca americana (PWM, 12,5 $\mu\text{g/ml}$) (todas obtenidas de SIGMA). Paralelamente se trazaron curvas dosis-respuesta y pruebas de reproducibilidad para determinar las concentraciones y tiempos de incubación óptimas para las pruebas.

El análisis estadístico de los resultados se hizo utilizando el programa de computación Stat View (Macintosh).

RESULTADOS

La viabilidad de las células mononucleares obtenidas de los gradientes de Ficoll-Hypaque fue siempre superior al 95%. Las curvas dosis-respuesta que fueron hechas durante el período de estudio (Figura 1), permitieron establecer que las concentraciones óptimas de mitógenos, bajo las condiciones establecidas fueron de 3,25; 6,5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ para Con A, PHA y PWM, respectivamente. Los resultados fueron muy similares en todos los casos, aun cuando durante el estudio fueron utilizados diferentes lotes de una misma casa comercial (datos no mostrados).

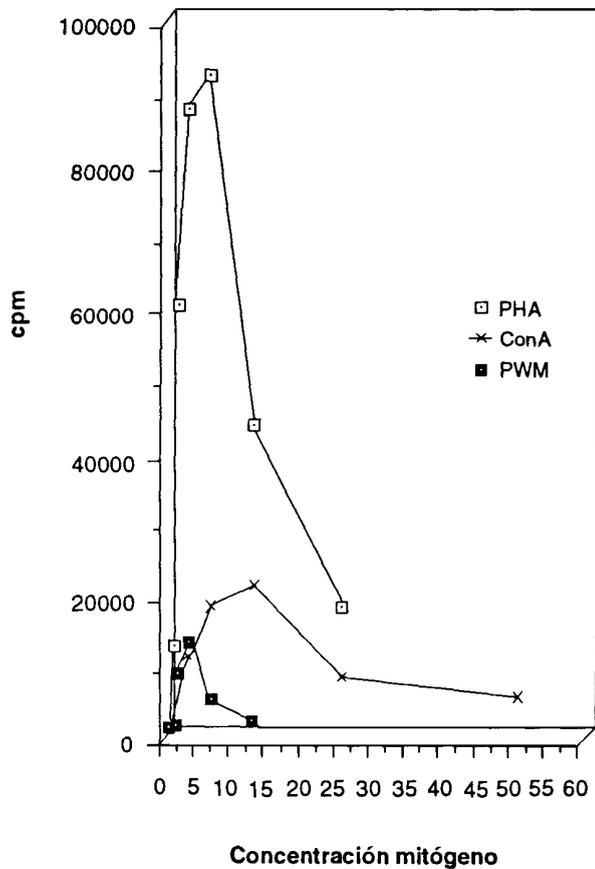


FIGURA 1. Respuesta mitogénica de células mononucleares a concanavalina A, fitohemaglutinina y fitolaca americana mediante la incorporación de timidina tritiada.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en las respuestas a mitógenos en los individuos costarricenses sanos incluidos en este análisis. No se encontró diferencias estadísticamente significativas en las respuestas entre hombres y mujeres ($p < 0,01$).

DISCUSION

Aunque el análisis de marcadores celulares por citofluorometría ha venido

a modificar dramáticamente el avance en este campo, la cuantificación de linfocitos T mediante la formación de rosetas con GRC puede tener una aplicación importante y confiable para enumerar y purificar los linfocitos T cuando se cuenta con recursos económicos y técnicos muy limitados (2, 9, 10).

Los eritrocitos de carnero forman rosetas con todos los tipos de linfocitos T humanos en un fenómeno inhibido por un anticuerpo monoclonal

CUADRO 1
CUANTIFICACION DE LINFOCITOS T MEDIANTE ROSETAS
CON GRC Y RESPUESTA MITOGENICA A LECTINAS EN 92 INDIVIDUOS
COSTARRICENSES SANOS*

	<i>n</i>	%
Rosetas espontáneas con GRC	76	48 ± 11
Rosetas totales con GRC	76	56 ± 11

	<i>n</i>	cpm	Indice estimulación
Respuesta basal	92	1087 ± 888	36 ± 40,1
Concanavalina A	91	27315 ± 20960	36,9 ± 40,1
Fitoheماغلutinina	92	45285 ± 28685	60,4 ± 51,4
Fitolaca americana	90	11740 ± 9049	15,4 ± 14,0

* Todos los valores expresados como promedio ± desviación estándar.

específico para una glicoproteína de membrana del linfocito denominada CD2(6). Aunque los linfocitos T constituyen cerca de un 80% del total de linfocitos circulantes, no es sorprendente que el promedio de células formadoras de rosetas en nuestro grupo fuera de 56% ± 10, si consideramos las condiciones de esta prueba en la cual muchas variables (la pureza de la preparación de CMN, la calidad de los GRC, la fragilidad de las rosetas al resuspenderlas, etc.) pueden tener influencia. Controlando en forma adecuada esos factores, es posible utilizar esta técnica como ayuda diagnóstica cuando no se cuente con metodologías más adecuadas para cuantificar los linfocitos T.

Las pruebas de transformación de linfocitos tienen hoy día un amplio espectro de aplicaciones diagnósticas y de investigación. En el caso de las respuestas mitogénicas a lectinas (Con A, PHA y PWM, particularmente), éstas proveen información importante sobre los defectos severos de las funciones inmunológicas en diferentes tipos de pacientes (2, 5, 11, 12). Sin embargo, aunque la cuantificación de las respuestas a estos mitógenos, usualmente llevada a cabo mediante la incorporación de timidina tritiada bajo condiciones controladas, es una prueba relativamente sencilla, existen muchas discrepancias acerca de los criterios para expresar los datos y definir los valores de referencia que ayuden a

darle validez clínica a los hallazgos de laboratorio (2).

Los resultados del presente estudio confirman los hallazgos de otros investigadores en cuanto a la gran variación individual que muestran estos parámetros (1, 7) y la necesidad de estandarización. Aun así, queda demostrado que es posible establecer en este estudio que el 90% de las respuestas (percentil 10) estuvo por encima de 6,2; 16,1 y 2,0 como índice de estimulación para Con A, PHA, PWM, respectivamente, y que es factible tomar estos valores como criterios de referencia válidos. Igualmente, según se ejemplifica con los resultados presentados en la Figura 1, la realización ocasional de curvas dosis respuesta es una ayuda importante para la estandarización adecuada de las respuestas mitogénicas.

Según ha sido descrito, el uso de índices de estimulación relativos (IER) (3) en las respuestas mitogénicas permite obtener un coeficiente de variación menor entre donadores normales y en pruebas seriadas. Esta modificación, sin embargo, implica un costo mucho mayor de las pruebas y la necesidad de contar con facilidades de criopreservación no necesariamente disponibles en todos los laboratorios. Aunque por la variabilidad individual este requisito parecería indispensable cuando se trata de estudios de seguimiento, los resultados de nuestro laboratorio en individuos sanos a quienes se les practicó pruebas seriadas durante varios años (datos no mostrados), permiten establecer que la dispersión de las respuestas expresadas como índices de estimulación, si bien es considerable, permite definir puntos de corte para los criterios de normalidad en caso de sospecha diagnóstica de algunas inmunodeficiencias.

En síntesis, los resultados de este estudio permiten contar con valores de referencia para las determinaciones de células formadoras de rosetas con GRC y las respuestas mitogénicas a Con A, PHA y PWM. Aunque en la rutina diaria lo ideal sería el uso de 3 o más controles sanos para el cálculo de respuestas relativas más confiables, en los laboratorios con recursos limitados es posible evaluar estos parámetros incluyendo un control sano en cada serie de pruebas y tomando en consideración los hallazgos aquí descritos o los valores propios de referencia.

ABSTRACT

This paper presents the results obtained with T cells counts using sheep red blood cell rosette formation as well as quantification of mitogenic responses using tritium labelled thymidine incorporation, in 92 healthy Costa Rican individuals used as reference control in the immunologic evaluation of recurrent infection patients.

Even though, as has been described, an important variability was found, especially in the mitogenic tests, it was possible to define an average of 48 ± 11 and 56 ± 11 for spontaneous and total sheep red blood cell rosettes cells, respectively, and to establish that 90 % of the responses were over a stimulation index of 6,2, 16,1 and 2,0 for concanavaline A, phytohemagglutinin and pokeweed mitogen, respectively.

Different aspects related to the quality control and the standarization of procedures are also described to conclude that these techniques can be confidently used to support the diagnosis and investigation of diverse clinical conditions.

AGRADECIMIENTO

AL Sr. Francisco Gamboa Céspedes, por el excelente apoyo técnico brindado para el procesamiento de las muestras de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Laboratory Investigations in Clinical Immunology: Methods, Pitfalls, and Clinical Indications. A Second IUIS/WHO Report. IUIS Working Group. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 49:478-497.
2. Winchester R., Ross G. Methods for Enumerating Cell Populations by Surface Markers with conventional Microscopy. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Edited by Rose N., Friedman H., Fahey JL. Third Edition. Washington: American Society for Microbiology 1986; Capítulo 31:212-225.
3. Graziano FM. and Bell CL. The Normal Immune Response and What Can Go Wrong. *Medical Clinics of North America* 1985; 69(3):439-452.
4. Jannossy G. Immune parameters in HV infection-a practical guide. *Immunology Today* 1991; 12(8):255-256.
5. Radvany RM., Schubert MSm Kiamar R. *et al.* Lymphocyte Subpopulation Profiles and Mitogen Kinetics in Immunological Deficiency Testing. *J. Clin. Immunol.* 1987; 7 (4): 312-318.
6. Selvaraj P., Dustin ML., Mitnacht R. *et al.* Rosetting of human T lymphocytes with sheep and human erythrocytes - Comparison of Human and Sheep Ligand Binding Using Purified E Receptor. *J. Immunol.* 1987; 138 (8):2690-2695.
7. Maluish AE. and Strong DM. Lymphocyte enumeration In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Edited By Rose N, Friedman H and Fahey JL. Third Edition. Washington: American Society for Microbiology 1986; Capítulo 38:274-281.
8. González L., Frajman M., Sáenz E. *et al.* Effect of tiniazole on the cellular immune response. *J. Antimicrob. Chemother* 1986; 18:499-502.
9. Hoover ML., Chapman SW. and Cuchens MA. A Procedure for the Isolation of Highly Purified Populations of B Cells T Cells and Monocytes from Human Peripheral and Umbilical Cord Blood. *J. Immunol Meth* 1985; 78:71-85.
10. Robbins DS., Donan GG. Fudenberg HH. *et al.* Functional Subsets of Human T Cells Defined by "Active" Rosette Formation. *Cell Immunol* 1981; 59:205-218.
11. Antonen J. Ranki A. Valle SL. *et al.* The validity of immunological studies in human immunodeficiency virus infection: a three-year follow-up of 235 homo-or bisexual persons. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1987; Sect C 95: 275-282.
12. Munn CG., Reuben JM., Hersh EM. *et al.* T cell surface antigen expression on lymphocytes of patients with AIDS during in vitro mitogen stimulation. *Cancer Immunol Immunother* 1984; 18: 141-148.