

SEPARACION DE LINFOCITOS B EN SANGRE PERIFERICA

G. ESCOVAR, N. PULIDO, R. E. ORTEGA, M. ATEHORTUA

Empleamos los métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasas indirectas utilizando antisueros contra IgA, IgG e IgM, para detectar linfocitos B en sangre periférica. Los linfocitos se aislaron por un gradiente de densidad obtenido con Ficoll tipo F-P. Se discute además la aplicación de esta metodología en el diagnóstico diferencial de enfermedades neoplásicas del sistema linfoide y otras entidades.

INTRODUCCION

La presencia de IgA, IgG e IgM en la superficie de la membrana citoplasmática de los linfocitos B, ha llevado a su identificación específica y correlación en los mecanismos inmunológicos mediados por este tipo de células (1).

Funcionalmente son conocidas dos poblaciones diferentes de linfocitos: los B derivados de la Bursa de Fabricio en las aves y de la médula ósea en los mamíferos, asociados con la inmunidad humoral; y los T derivados de la médula ósea, modificados en el timo y responsables de la inmunidad celular (2).

Los dos tipos de linfocitos se diferencian por la presencia de una serie de antígenos de superficie (Tabla 1) (3), propiedades biológicas (Tabla 2) (4) y frecuencia de distribución en el organismo (Tabla 3) (5).

El desarrollo de técnicas aplicables al estudio de los linfocitos, ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de numerosas enfermedades de los humanos; tales como los neoplasmas

Dra. Genarina Escovar V.: Licenciada, M.Sc., Profesora Asociada Histología. Dr. Nicolás Pulido P.: M.D., M.Sc., Profesor Anatomía. Dr. Roque E. Ortega R.: Licenciado Biología, Profesor Asistente Anatomía. Dra. Mariela Atehortúa V.: Licenciada Bacteriología y Laboratorio Clínico. Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Solicitud de Separatas a la Dra. G. Escovar.

Tabla 1. Presencia de antígenos de superficie en linfocitos T y B en los humanos

Antígenos de superficie	Linfocitos T	Linfocitos B
Cadenas <i>Kappa</i> y <i>Lambda</i>	-	+(10-15%)
Cadenas μ y δ	-	+(5- 8%)
Cadenas γ	-	+(0.02- 1%)
Cadenas α	-	+(0.2- 1%)
Receptores Fc	- (< 5%)	+(10-15%)
Receptores C ₃	- (< 5%)	+(6-12%)
Receptores nativos para eritrocitos de oveja	+(> 80%)	- (< - 1%)
Antígenos T	+(< 90%)	- (< - 1%)
Receptores de Antígenos	Receptores Inciertos	Abundantes Receptores Igs*
* Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM).		

Tabla 2. Propiedades biológicas de los linfocitos T y B en los humanos

Propiedades biológicas	Linfocitos T	Linfocitos B
Funciones:		
Secreción de anticuerpos	No	Sí*
Ayudadora o transportadora	Sí	No
Célula efectora para inmunidad celular	Sí	No
Respuesta mitogénica:		
Concanavalina A (Con A)	Sí	No
Fitohemaglutinina (PHA)	Sí	No
Susceptibilidad a la inactivación por:		
Rayos X	++++	+
Corticosteroides	++	+
Suero anti-linfocítico	+	++++
* En linfocitos grandes y células plasmáticas.		

Tabla 3 Distribución y frecuencia de linfocitos T y B en los humanos

Distribución	Linfocitos T	Linfocitos B
Ganglios Linfáticos	Áreas interfoliculares para-corticales	Áreas foliculares y cordones medulares
Bazo	Región periarteriolar	Nódulos linfoides de la pulpa blanca y cordones de la pulpa roja
Frecuencia aproximada		
Sangre	85 %	15 %
Linfa	90 %	10 %
Linfo-Nódulos	85 %	15 %
Bazo	65 %	35 %
Medula Osea	Pocos	Abundantes
Timo	Abundantes	Raros

del sistema linfoide (6), enfermedades mediadas inmunológicamente (7), enfermedades infecciosas (8) y granulomatosas (9).

El propósito del presente estudio es la identificación de linfocitos B en sangre periférica a partir de la detección de inmunoglobulinas localizadas en la membrana citoplasmática, mediante la aplicación de los métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirectas y además discutir la importancia de los hallazgos inmunocitoquímicos en el diagnóstico diferencial de enfermedades relacionadas con este tipo de células.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de Linfocitos: Se aislaron linfocitos a partir de sangre periférica, utilizando el método de Middleditch et al. (10). A 10 ml. de sangre venosa heparinizada se agregaron 14 ml. de solución tamponada de fosfatos (PBS) pH 7.4. Ocho ml. de la anterior solución se añadieron sobre 3 ml. de Ficoll tipo F-P (No. F 8628, Sigma Co., St. Louis Mo., EUA) y se centrifugaron durante 30 minutos a 400 r.p.m. La interfase opaca resultante, que contiene los linfocitos se separó con pipeta Pasteur y se trató con 10 ml. de cloruro de amonio 0.87%, durante 5 minutos, con el objeto de lisar los glóbulos rojos contaminantes. Posteriormente la solución se centrifugó a 250 r.p.m. durante

10 minutos. El precipitado obtenido se lavó y centrifugó por 3 veces con 5 ml. de PBS. Finalmente el precipitado se suspendió en 0,2 ml. de PBS y se colocó en gota gruesa sobre láminas portaobjetos, dejándolas secar a temperatura ambiente. Previa realización de la reacción inmunológica, las láminas se fijaron en metanol absoluto durante 30 minutos.

Identificación Inmunoquímica de Linfocitos B: En la reacción de inmunofluorescencia indirecta (11) se utilizaron los siguientes antisueros consecutivamente: suero de conejo anti-inmunoglobulinas humanas A, G y M, fracciones Fab (Miles Yeda Ltd., Israel) y suero de cabra anti-IgG de conejo, conjugado a fluoresceína (Calbiochem-Behring Corp. La Jolla Ca. EUA). Las láminas se montaron en glicerol y se estudiaron por microscopía de fluorescencia.

La reacción de inmunoperoxidasa indirecta (12) se realizó según procedimiento descrito por Escovar et al. (13) utilizando los siguientes antisueros: suero de conejo anti-inmunoglobulinas humanas A, G y M, fracciones Fab (Miles Yeda Ltd.) y suero de cabra anti-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (Cappel Lab, Pa. EUA). La reacción cromógena se desarrolló con 3,3'-diaminobenzidina y H₂O₂ al 0.1%. Las láminas fueron contrastadas con hematoxilina de Harris, montadas en Entellan y leídas por microscopía de luz.

Los extendidos de linfocitos se incubaron con los antisueros primarios durante 24 horas a 4°C y con los secundarios, 30 minutos a 37°C. Se utilizaron controles negativos de la inmunorreacción mediante sustitución del antisuero primario por PBS. Tanto en la técnica de inmunofluorescencia como en la de inmunoperoxidasa se verificó un recuento de 50 campos para el hallazgo de linfocitos inmunorreactivos. Las fotografías fueron tomadas con película Kodak-color II, c135-36, ASA 400.

RESULTADOS

Los linfocitos B inmunorreactivos exhibieron un halo periférico fluorescente a nivel de la membrana citoplasmática, en el sitio de detección de las inmunoglobulinas G, A y M.

La reacción positiva contrastaba con el núcleo oscuro y no reactivo. En algunas células se notó un engrosamiento de la parte inmunoreactiva localizado hacia uno de los polos, a manera de un casquete. En la Figura 1, se aprecian linfocitos B positivos en el método de inmunofluorescencia indirecta.

En la prueba de inmunoperoxidasa indirecta, los linfocitos inmunoreactivos presentaron un precipitado color café oscuro a nivel de la membrana citoplasmática. El núcleo no reactivo aparecía contrastado de color azul pálido con el uso de la hematoxilina de Harris. La Figura 2, ilustra estos hallazgos.

El recuento de 50 campos en ambas pruebas reveló una población promedio de linfocitos B del 10 al 15% sobre la población total de células por campos analizados. Los resultados negativos obtenidos en los controles comprobaron la monoespecificidad de los antisueros utilizados.

Algunas células con morfología similar a la de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) fueron también observadas en la prueba de inmunofluorescencia.

DISCUSION

Desde cuando Coons en 1950 (14) y Ortega y Mellors en 1957 (15) aplicaron los métodos de inmunofluorescencia en la demostración de linfocitos, la presencia de inmunoglobulinas en los linfocitos B ha sido un hallazgo promisorio para clarificar procesos concernientes a la inmunidad humoral y celular. Desafortunadamente las técnicas utilizables en la separación de los linfocitos y los métodos empleados en la detección de receptores de membrana han presentado muchas limitaciones.

En nuestra experiencia, la separación de linfocitos de sangre periférica por el método de Ficoll tipo F-P, proporcionó un número adecuado de los mismos para el estudio de receptores de membrana. Los métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirectas demostraron un alto grado de sensibilidad y especificidad en la detección de IgG, IgA e IgM en la membrana citoplasmática de los linfocitos B. El porcentaje de los linfocitos inmunoreactivos en ambas pruebas fue comparable a lo informado por otros autores (10,



Figura 1. Reacción de inmunofluorescencia positiva en la detección de IgG, IgA, IgM presentes en la membrana citoplasmática de linfocitos B. Nótese el núcleo oscuro y no reactivo. Aumento 1000 X.

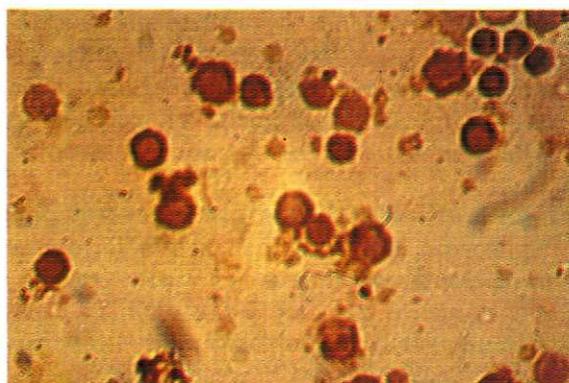


Figura 2. Linfocitos B inmunoreactivos en la prueba de peroxidasa indirecta aplicada en la detección de IgG, IgA, IgM. La reacción se caracteriza por un precipitado café localizado en la membrana citoplasmática. El núcleo aparece azul contrastado con hematoxilina. Aumento de 1000 X.

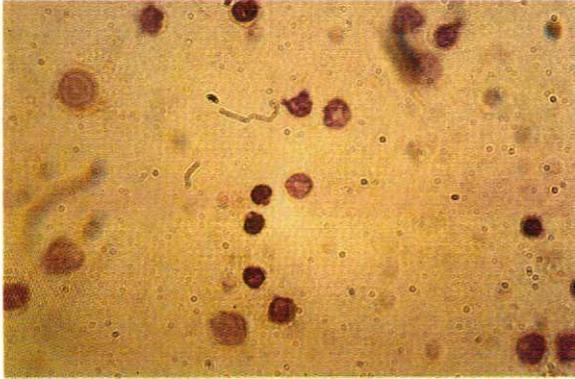


Figura 3. Reacción negativa de inmunoperoxidasa mediante sustitución del antisuero primario por TBS. Aumento 1000 X.

16). El uso de antisueros conformados por fracciones Fab aseguró la detección específica de linfocitos B, pues es conocido que los monocitos y las células T activadas pueden reaccionar con las inmunoglobulinas totales vía receptores Fc.

La aplicación de la reacción de inmunoperoxidasa facilitó el análisis minucioso de la morfología celular por microscopía de luz. Las células cuya morfología semejaba la de los PMN fueron interpretadas como linfocitos en los cuales las inmunoglobulinas superficiales se agrupaban formando "casquetes". Esta interpretación se hizo con base en: 1. Los resultados del método de inmunoperoxidasa en donde no se observaron leucocitos PMN, positivos y 2. Los estudios de Unanue et al. (17) y Nicolson (18) quienes reportaron que las células linfoides presentan inmunoglobulinas superficiales que pueden estar distribuidas en forma "dispersa", "agrupadas en parches" o en "casquetes" en la membrana citoplasmática.

Aplicación clínica del hallazgo de linfocitos B en diferentes patologías:

A- Neoplasias del Tejido Linfoide: La clasificación de varias subpoblaciones de linfocitos con base en el hallazgo de receptores superficiales de la membrana celular y sus propiedades biológicas, ha permitido relacionarlos con diferentes patologías. Las neoplasias del tejido linfoide han sido objeto de numerosas investi-

gaciones inmunológicas (19-25). Algunas de ellas han usado técnicas de formación de rosetas, receptores para determinados componentes del complemento, receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas y más recientemente, anticuerpos anti-inmunoglobulinas superficiales.

En el caso de los linfomas y leucemias linfocíticas se ha demostrado que la gran mayoría de los pacientes tienen una proliferación monoclonal de linfocitos B (26). Por esta razón su identificación en sangre periférica o en tejidos neoplásicos, mediante métodos inmunocitoquímicos, ayuda en su diagnóstico.

Varios grupos de investigadores han demostrado que la leucemia linfocítica aguda de células B es de mayor incidencia (75%) pero de mejor pronóstico que la de las células T. Resultados como estos, han permitido desarrollar varios esquemas de clasificación de estas neoplasias (27) lo cual es un aporte importante para definir el diagnóstico y establecer la terapia adecuada en cada caso.

También se ha demostrado que los linfocitos B proliferan en otros tipos de enfermedades (25) como el linfoma de Burkitt, la macroglobulinemia de Waldenström, los linfosarcomas infantiles y los linfomas nodulares. El mieloma múltiple es otra neoplasia de tipo B, pero curiosamente se caracteriza por la ausencia de receptores superficiales.

B- Inmunodeficiencias: Obviamente casos como el Síndrome de Di George (ausencia congénita del timo) y la agamaglobulinemia congénita, pueden ser detectados fácilmente por la ausencia completa de células T y B, respectivamente.

C- Enfermedad autoinmune: El mecanismo de acción de los linfocitos B y T en la enfermedad autoinmune aún no ha sido dilucidado completamente. Se ha demostrado que la hiperactividad humoral, en el caso del Lupus Eritematoso Sistémico, es debida a una disminución en el número de linfocitos T y a una hipofunción de las células T supresoras. Sin embargo, algunas publicaciones sustentan que el mecanismo fisiopatológico de las enfermedades autoinmunes es mucho más complejo que una simple disfunción de las células T supresoras (28).

Finalmente es necesario afirmar que el estudio de los linfocitos T y B ha abierto amplias perspectivas para la comprensión de algunas enfermedades. Actualmente el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores de membranas en ambos tipos de linfocitos, permite la detección específica de los mismos en neoplasias del tejido linfoide (29). Sin embargo, antes de introducir las técnicas inmunocitoquímicas, como exámenes de rutina en los laboratorios clínicos, es conveniente hallar una mayor evidencia de tipo experimental que reafirme los resultados anotados.

SUMMARY

The percentage of peripheral blood B-Lymphocytes was enumerated by the presence on their surface of readily detectable immunoglobulin, an established marker for such cells. In this study, surface immunoglobulin was detected by 2 technics: Indirect immunofluorescence and Immunoperoxidase.

A lymphocyte suspension, obtained on a type F-P Ficoll gradient, was incubated with polyvalent antihuman immunoglobulin serum for 24 hours and with antirabbit IgG serum for 30 minutes. A smear of this preparation was examined for surface immunofluorescence, when the antirabbit IgG was fluoresceinated, and for the typical color reaction, when the antirabbit IgG was conjugated to peroxidase.

By these 2 technics the mean population of B-Lymphocytes was 10 to 15% in peripheral human blood.

The multiple clinical applications of the enumeration of B-Lymphocytes is discussed.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- EISEN HN. Immunology. An introduction to molecular and cellular principles of the immune response. HARPER AND ROW, Pub, New York. 1974; 45 0-5 09.
- 2.- FUDENBERG HH, STITES DP, CALDWELL JL, WELLS JV. Basic and clinical immunology. Lange Medical Publications. California. 1976; 15-31.
- 3.- HOOD LE, WEISSMAN IL, WOOD WB. Immunology. The Benjamin-Cummings Publishing Co., Inc. California. 1978; 120.
- 4.- AISENBERG AC. Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. Human Pathology. 1978; 4 (3): 301.
- 5.- WEISSMAN IL, HOOD LE, WOOD WB. Essential concepts in immunology. The Benjamin-Cummings Publishing Co., Inc. California. 1978; 22-64.
- 6.- AISENBERG AC, BLOCH KJ. Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. N Eng J Med 1972; 287: 272.
- 7.- ROWLANDS DT, DANIELE RP. Lymphocyte subpopulations in human disease. Human Pathology. 1977; 8 (2): 117-120.
- 8.- GERSHON RK, KONDO K. Infectious immunological tolerance. Immunology. 1971; 21: 903.
- 9.- DANIELE RP, ROWLANDS DT JT. Lymphocyte subpopulations in sarcoidosis: correlation with disease activity and duration. Ann Intern Med 1976; 85: 593-600.
- 10.- MIDDLEDITCH PR, MINARD BJ, CAWLEY LP, BASTIAN FO. Horseradish peroxidase labeled antisera - a diagnostic method for evaluating the percentages of B lymphocytes in peripheral blood. J Histochem Cytochem. 1979; 27 (2): 689-690.
- 11.- STENBERGER LA. Immunofluorescence. In: Immunocytochemistry. JOHN WILEY and SONS. N.Y. Second Ed. 1977; 24-58.
- 12.- NAKANE PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens utilizing the peroxidase-labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat. J Histochem Cytochem. 1968; 16: 557-560.
- 13.- ESCOVAR G, HANSSEN H, URIBE G. Estudio inmunocitoquímico de las hormonas de la adenohipofisis humana. I. Hormona del crecimiento. Acta Med Col 1981; 6: 257-270.
- 14.- COONS AH, KAPLAN MH. Localization of antigens in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med 1950; 91: 1.
- 15.- ORTEGA LG, MELLORS RC. Cellular sites of formation of gamma globulin. J Exp Med 1957; 106: 627-640.
- 16.- AIUTI F, et al. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Clin Immunol Immunopath 1975; 3: 584-597.
- 17.- UNANUE ER, KARNOVSKY MJ, ENGERS HD. Ligand induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. H Exp Med 1973; 137: 675-689.
- 18.- NICOLSON GL. Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. Biochimica et Biophysica Acta. 1976; 457: 57-108.
- 19.- GAJL PECZALSKA KJ, BLOOMFIELD CD, COCCIA PF, SOSIN H, BRUNNING RD, KERSEY JH. B and T cell lymphomas: Analysis of blood and Lymph nodes in 87 patients. Am J Med 1975; 59: 674-685.
- 20.- AISENBERG AC, LONG JC. Lymphocytic surface characteristics in malignant lymphoma. Am J Med 1975; 58: 300-306.
- 21.- LEECH JH, GLICK AD, WALDROM JA, FLEXNER JM, HOM RG, COLLINS RD. Malignant lymphomas of follicular center cell origin in man. I. Immunologic Studies. J Natl Cancer Inst 1975; 54: 11-21.
- 22.- DAVEY FR, GOLDBERG J, STOCHMAN J, GOTTlieb AJ. Immunologic and cytochemical cell markers in non-Hodgkin's lymphomas. Lab Invest 1976; 35: 430-438.
- 23.- LUKES RJ, TAYLOR CR, PARKER JW, LINCOLN TL, PATLENGALE PK, TINDLE BH. A morphologic and immunologic surface marker study of 299 cases of non-Hodgkin's lymphomas and related leukemias. Am J Pathol 1978; 90: 461-486.
- 24.- FILIPPA DA, LIEBERMAN PH, ERLANDSON RA, et al. A study of malignant lymphomas using light and ultramicroscopic, cytochemical and immunologic technics: correlation with clinical features. Am J Med 1978; 64: 259-268.
- 25.- TAYLOR CR, CHANDOR SB. The immunohistochemical evaluation of malignant lymphomas and related conditions. In: Diagnostic Immunohistochemistry. Ed. DELELLIS RA. Masson Publishing, Inc New York. I. Edition. 1981; 179-202.

- 26.- ROSS GD. Identification of human lymphocytes subpopulations by surface marker analysis. *Blood* 1979; 53: 799-811.
- 27.- TSUKIMOTO I, WONG K, LAMKIN BC. Surface markers and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Engl J Med* 1976; 294: 245-248.
- 28.- FAUCI AS, STEINBERG AD, HAYNES BF, WHALEN G. Immunoregulatory aberrations in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 1978; 121: 1473-1479.
- 29.- KENNETT RH, MCKEARN TJ, BECHTOL KB. Monoclonal antibodies. *Hybridomas: A new dimension in biological analysis*. Plenum Press. New York. I. Ed., 1980; 1-419.