

ANALISIS INMUNOCITOQUIMICO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN INDIVIDUOS SANOS DE VENEZUELA

M. Correnti¹, M. Peña², W. Mosca², J. Azócar¹, F. J. Tapia².

¹Centro de Quimioterapia y Hematología, M.S.A.S. (UCV);

²Instituto de Biomedicina, Apartado 4043, Caracas 1010A

Se ha demostrado que un número de enfermedades están asociadas a cambios en la proporción de las subpoblaciones de linfocitos T-cooperador/T-supresor-citotóxico en sangre periférica o en tejido (Reinhertz & Schlossmann, 1980; Bach & Bach, 1981); por lo tanto, el análisis cuantitativo de los diferentes subgrupos linfocitarios es importante para poder establecer un instrumento de seguimiento clínico. La determinación de los valores normales de estas subpoblaciones celulares en individuos sanos permitirá obtener patrones de comparación en estudios de enfermedades parasitarias e infecciosas particulares de cada región geográfica. Por otra parte nuestra población está expuesta desde muy temprana edad y durante toda la vida a agentes infecciosos que pudieran modificar la condición inmunológica en una forma diferente a los individuos de otras latitudes. Igualmente, en nuestro medio en donde el acceso a metodologías y equipos complejos, como la citofluorometría de flujo, es limitado, se hace necesario utilizar procedimientos más simples y económicos. La inmunoperoxidasa es un método inmunocitoquímico de alta eficiencia y utilizado ampliamente en la caracterización celular y tisular (Van Noorden & Polak, 1983).

El objetivo principal de este estudio fue establecer las variaciones inter e intra-individuos de los diferentes subgrupos linfocitarios en una muestra representativa de individuos sanos, utilizando la técnica de la inmunoperoxidasa y anticuerpos monoclonales que reconocen los siguientes marcadores de subpoblaciones linfocitarias, algunos designados utilizando la reciente convención internacional (Bernard et al., 1984): linfocitos T auxiliares (CD5), linfocitos B totales (B1), T-cooperadores (CD4) y T-supresores-citotóxicos (CD8).

Materiales y Métodos.

La caracterización celular se realizó en muestras de sangre periférica obtenidas de individuos voluntarios de ambos sexos, (hombres n=37, mujeres n=35) diferentes grupos etarios y clínicamente sanos.

Las células mononucleares fueron aisladas siguiendo la técnica de Böyum (1968): se obtuvieron 10 ml de sangre y se centrifugaron a 400 g por 30 min. en un gradiente de Ficoll-Hypaque. Se resuspendieron las células mononucleares en solución de Hanks, se lavaron sucesivamente tres veces; luego del último lavado se ajustaron a una concentración de 5×10^6 cel/ml en RPMI 1640. Un mililitro de esta suspensión se centrifugó a 500 g por 5 min., se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 μ l de albumina bovina al 1% en buffer fosfato salino, pH 7,2 (PBS), luego se colocan 20 μ l de la suspensión celular en láminas de vidrio. Las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

El procesamiento inmunocitoquímico utilizado fue el de la inmunoperoxidasa usando el sistema avidina-biotina (ABC) realizado de acuerdo a Hsu y col.

(1981) modificado de la siguiente manera: 1) Fijación en acetona, 10 min. 2) PBS, 5 min. 3) anticuerpo monoclonal en su dilución óptima, CD5 (B36.1, dil. 1:10000), Pan B (B1, dil. 1:5000), CD4 (OKT4, dil. 1:50), CD8 (B116.1, dil. 1:10000). 4) PBS, 5 min. 5) anti-IgG de ratón biotinilado de

caballo (Vector Labs Inc. EEUU) dil. 1:30, 15 min. 6) PBS, 5 min. 7) ABC (Vectastain kit, Vectors Labs Inc.) 1:100, 15 min. 8) PBS, 5 min. 9) Revelado por 10 min. con 90 μ M H₂O₂ y el cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol (disuelto a una concentración final de 0,88 mM en 50 mM N,N-dimetilformamida y buffer acetato 0,1 M, pH 5,2), 10) lavado en H₂O y 11) Contraste con metil-green y montaje con gelatina-glicerina. Las células inmunoteñidas en rojo fueron cuantificadas bajo el microscopio de luz; contando un mínimo de 200 células seleccionadas aleatoriamente por lamina.

Resultados y Discusión.

En los 72 individuos estudiados se obtuvieron los siguientes valores expresados en porcentaje medio \pm desviación estándar: relación CD4/CD8 = 1,69 \pm 0,25; CD4 = 61,48 \pm 10,43; CD8 = 37,61 \pm 8,11; CD5 = 72,64 \pm 9,61 y B1 = 10,24 \pm 4,10. Al analizar por separado ambos sexos, se observaron valores significativamente mayores (p < 0,005), en mujeres

CUADRO 1

VALORES EN PORCENTAJE (MEDIA \pm DESVIACION ESTANDAR) PARA LOS FENOTIPOS CD4, CD8, CD5, B1 Y LA RELACION CD4/CD8 EN 72 INDIVIDUOS SANOS DE VENEZUELA

	HOMBRES - MUJERES			HOMBRES		MUJERES		Prueba-t de Student
	n = 72	n = 37	n = 35	n = 37	n = 35			
	\bar{X}	DS	Rango	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	
CD5	72,64	9,61	49,01 - 89,62	71,82	10,06	74,35	9,36	NS
CD4	61,48	10,43	23,30 - 76,70	59,93	11,13	63,13	9,51	NS
CD8	37,61	8,11	17,97 - 52,64	36,66	8,23	36,40	7,85	NS
B1	10,24	4,10	3,19 - 20,30	11,23	4,29	9,30	3,72	p < 0,05
CD4/CD8	1,69	0,25	1,04 - 2,33	1,60	0,25	1,76	0,22	p < 0,005
EDADES	33,57	(17 - 55)		33,35 (18 - 55)		33,75 (17 - 55)		

NS = no significativa estadísticamente

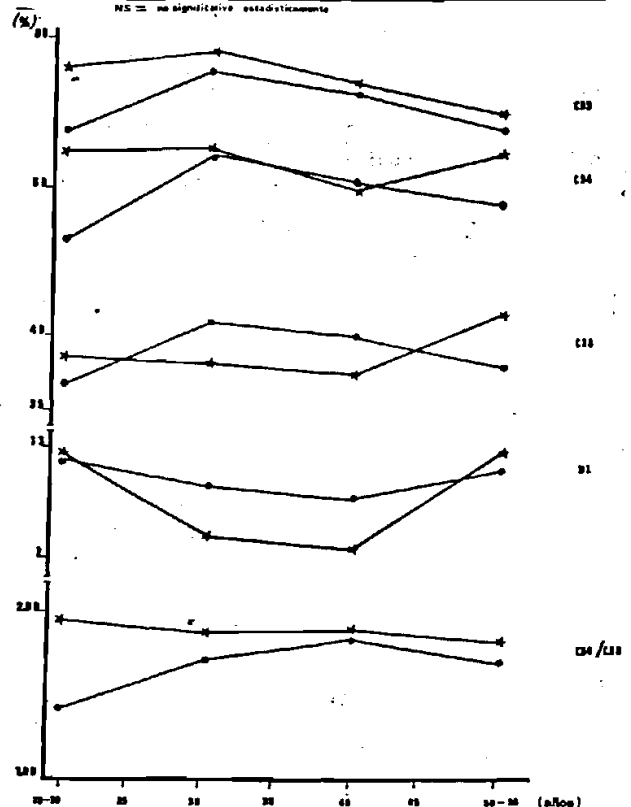


Fig. 1 Comparación del porcentaje promedio de las subpoblaciones linfocitarias entre hombres (♂) y mujeres (♀) para los diferentes grupos etarios estudiados

que en hombres en la relación CD4/CD8, mientras que para los subgrupos CD4, CD8 y CD5 los resultados no muestran diferencias significativas; sin embargo, para la subpoblación B1 positivo se obtuvieron valores mayores en hombres que en mujeres ($p < 0,05$), (Cuadro 1).

También se observó una diferencia similar cuando se compararon los valores para la relación CD4/CD8 de un mismo grupo etario en ambos sexos. En el grupo etario comprendido entre los 45 y 55 años se se obtuvieron valores de CD5, CD4, CD8 y B1 mayores en mujeres que en hombres (Fig. 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros grupos de investigadores (Nagel et al., 1983; Bongers & Bertrams, 1984; Yamakido et al., 1985), que demuestran una variación en el porcentaje de subpoblaciones linfocitarias de acuerdo con la edad de los individuos.

El rango de valores encontrados en individuos normales dentro de la población control fué bastante amplio para los diferentes subgrupos linfocitarios estudiados, mostrando variaciones inter-individuos similares a las observadas por Bongers & Bertrams (1984). El valor de la relación CD4/CD8 obtenido en este estudio y los hallazgos recientemente reportados (Garraud & Moreau, 1984) para otra región tropical, confirman que los valores para dicha relación en países tropicales son mas bajos que los encontrados en poblaciones norteamericanas. El aumento en el porcentaje observado en comparación con el obtenido en otros trabajos podría atribuirse a la técnica de inmunotinción utilizada, la cual es mas sensible que la de inmunofluorescencia indirecta (Bongers & Bertrams, 1984). La inmunoperoxidasa, es ademas un método que permite obtener muestras estables por largos periodos de tiempo, que pueden ser analizadas por varios observadores utilizando equipos básicos de laboratorio.

Agradecimientos.

Parte de este estudio fué financiado por el proyecto S1-1550 del CONICIT. Dr Giorgio Trinchieri (The Wistar Institute for Anatomy and Biology, Philadelphia, Pennsylvania, EEUU), por su donación de los anticuerpos monoclonales B-116.1 y B-36.1. Lic. María Eugenia Cavazza y Lic. Rosa Marciano del Instituto de Biomedicina, por su colaboración en este estudio.

Bibliografía.

- Bach, M.A., Bach, J.F. The use of monoclonal anti-cell antibodies to study T cell imbalances in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 45:449, 1981.
- Bernard, A., Bernstein, I., Bowsell, L., Dausset, J., Evans, R., Hansen, J., Haynes, B., Kersey, J., Knapp, W., McMichael, A., Milstein, C., Reinherz, L., Ritts, R.E. y Schlossman, S.F. Committee on human leukocyte differentiation antigens: IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee. *Bull. WHO* 4: 809-811, 1984.
- Bongers, V. y Bertrams, J. The influence of common variables on T cell subset analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meths.* 67: 243-253, 1984.
- Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, suppl.97: 77, 1968
- Garraud, O. y Moreau, Th. Effect of blood storage on lymphocyte subpopulations. *J. Immunol. Meths.* 75: 95-98, 1984.
- Hsu, S-M, Raine, L. y Fanger, H. Use of Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.
- Nagel, J.E., Chrest, F.J. y Adler, W.H. Monoclonal antibody analysis of T lymphocyte subsets in young and aged adults. *Immunol. Commun.* 12: 233-237, 1983.
- Reinherz, E.L. y Schlossman, S.F. Regulation of the immune response. Inducer and suppressor T lymphocyte subsets in man. *New Engl. J. Med.* 303: 370-373, 1980.
- Van Noorden, S. y Polak, J.M. Immunocytochemistry today, techniques and practice. En: *Immunocytochemistry. Practical applications in Pathology and Biology* (Polak, J.M. & Van Noorden, S.), Wright, PSG, Londres, 1983, pp.11-42.
- Yamakido, M., Yanagida, J., Ishioka, S., Matsuzaka, S., Hozawa, S., Akiyama, M., Kobuke, K., Inamizu, T., Nishimoto, Y. Detection of lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in aged and young humans. *Hiroshima J. Med. Sci.* 34: 87-94, 1985.