



ISSN: 1561-3194

Rev. Ciencias Médicas. ener-jun. 1997; 1(1):10-19

ARTÍCULO ORIGINAL

Subpoblaciones de linfocitos T en jóvenes supuestamente sanos

Subpopulations of T lymphocytes in young people supposedly healthy

Maritza Linares Guerra¹, Nohary Fonte Medina², Julio E. Conchado Martínez³, Orlando Barrera Romero⁴.

¹Licenciada en Bioquímica. Profesor auxiliar. Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río.

²Licenciada en Bioquímica. Asistente. Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río.

³Doctor en Ciencias Médicas. Profesor titular. Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río.

⁴Técnico de laboratorio. Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de las subpoblaciones de células T (CD3+CD4+y CD8+) y del índice CD4/CD8, en sangre periférica de jóvenes supuestamente sanos, haciendo utilización de un método simple que empleó anticuerpos monoclonales y la microscopía óptica. Se evaluaron 19 jóvenes (9 del sexo masculino y 10 del femenino). Los resultados arrojaron que los porcentajes de las subpoblaciones de células T y del índice CD4/CD8 para la muestra estudiada se acercan más a los reportes de otros estudios por citometría de flujo que a los obtenidos por microscopía de fluorescencia. Por otra parte no se encontró significación estadística al comparar los resultados de todos los parámetros estudiados para ambos sexos, por lo que se concluye que en la muestra evaluada, las subpoblaciones de células T y el índice CD4/CD8 tuvieron una evolución independiente del sexo.

DeCS: LINFOCITOS; ANTICUERPOS MONOCLONALES; INMUNOHISTOQUIMICA; ADOLESCENCIA.

ABSTRACT

The behaviour of subpopulation of T cells (CD3+, CD4+ and CD8+) and the CD4 /CD8 index was studied in the peripheral blood of supposedly health youngsters using a simple method by means of monoclonal antibodies and optic microscopy. Nineteen youngsters were evaluated (9 male and 10 female). Results showed that percentages of subpopulations of T cells and CD4 /CD8 index for the studied sample are closer to the reports of other studies by flow cytometry than to the results obtained by fluorescence microscopy. On the other hand, no statistical significance was found when comparing the results of the parameters studied for both sexes, concluding that in the sample under evaluation the subpopulation of T cells and CD4 /CD8 index had an evolution independent to sex .

DeCS: LYMPHOCYTES; MONOCLONAL ANTIBODIES; IMMUNOCITOCHEMISTRY; ADOLESCENCE.

INTRODUCCIÓN

Desde el año 1975, en el que G. Kohler y C. Milstein publicaron el método para la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (AcM),¹ esta tecnología se ha extendido a diferentes áreas, provocando un considerable avance de la bibliografía y la biomedicina. Uno de los aspectos más estudiados con AcM ha

sido el de los antígenos de diferenciación celular de la membrana linfocitaria, lo cual ha permitido la caracterización de subpoblaciones funcionalmente diferentes de linfocitos T.

La determinación de las subpoblaciones CD3+, CD4+ y CD8+ de los linfocitos T le ha permitido a muchos investigadores estudiar inmunológicamente a pacientes con trastornos relacionados con el sistema inmune, por ejemplo, en el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA),² en los cuales el descenso del número de células T CD4+ está considerado como el más potente marcador predictivo de evolución del enfermo tal como indican estudios recientes.³ En pacientes con linfomas no Hodgking y Hodgking se ha encontrado disminución del porcentaje de células T CD3+ y alteraciones en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ aunque no de manera significativa con respecto a los controles,⁴ además se ha reportado, escasa población de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con carcinomas basocelulares y epidermoides de piel⁵ así como un bajo índice CD4/CD8 en niños con anemia ligera por deficiencia de hierro.⁶

El comportamiento de estas subpoblaciones de células T también se ha estudiado en enfermedades como la artritis reumatoidea⁷ y la cirrosis biliar primaria,⁸ por otra parte los anticuerpos monoclonales anti-CD3 se han empleado para estudiar las variaciones intercelulares de calcio de acuerdo a la edad, el sexo y la restricción de la dieta.⁹

Las técnicas más empleadas en la cuantificación de las subpoblaciones linfoides, utilizando AcM, son la inmunofluorescencia indirecta y la citometría de flujo, sin embargo en los últimos años en nuestro país se ha establecido un método simple de realizar, que no requiere equipamiento especial y que constituye una alternativa atractiva para la determinación de subpoblaciones linfoides en pacientes con desordenes en el sistema inmune humano, este método inmunocitoquímico se basa en el uso de la microscopía óptica.

Con el presente trabajo se pretende describir a través de un estudio preliminar, el comportamiento de las subpoblaciones CD3+, CD4+, CD8 de los linfocitos T y del índice CD4/CD8 en un grupo de jóvenes supuestamente sanos, así como analizar la influencia del sexo sobre estos parámetros en la muestra estudiada.

MATERIAL Y MÉTODO

De una población de 56 alumnos internos del 1er año de la especialidad de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, durante el curso 95 - 96, se seleccionó al azar una muestra de 19 alumnos supuestamente sanos con una proporción de edad entre 17 y 21 años; de ellos 10 pertenecían al sexo femenino y 9 al masculino. A todos se le realizó un recuento total y diferencial de leucocitos de sangre periférica, previo consentimiento de los mismos a participar en el estudio.

Aislamiento de las células mononucleares periféricas.

Se recolectaron 6 ml de sangre periférica en tubos de cristal que contenían 340 micro-litros de EDTA como anticoagulantes, esta sangre fue disuelta 1:2 con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se adicionaron 6 ml de sangre diluida a otro tubo de centrifuga que contenía 3 ml de Visotranst, con una densidad de 1,077 g/ml, esta es una solución de contraste, que garantiza el aislamiento de las células mononucleares por gradiente de densidad después de centrifugar a 2500 rpm durante 25 minutos, a temperatura ambiente.

El anillo de células mononucleares fue extraído y resuspendido en 10 ml de PBS, después se centrifugo a 2000 rpm durante 5 minutos a 4 grados celcius, la píldora celular se lavo 2 veces con PBS -azida sódica (0,02%) -albumina sérica bovina (BSA) (1%). Posterior al último lavado la píldora se suspendió en 1 ml de PBS -azida-BSA. A partir de esta suspensión se determino la concentración celular y viabilidad por el método de exclusión por -tripan azul al 0,3%. Se ajusto la concentración celular a 1×10^6 a la 6 células por ml.

Se añadió 10 micro litro de la suspensión celular a cada pocillo de las laminas portaobjetos previamente preparadas con cromalum -gelatina. Se dejaron secar de 2-4 hrs a temperatura del laboratorio (20-30 grados celcius) y con deshumidificador. Las laminas se conservaron a 20 grados Celsius hasta el montaje de la microtécnica.

Estudio de las subpoblaciones de células T.

El porcentaje de células T CD3+, CD4+ y CD8+ en periferia fue estimado por medio de la microtécnica de inmunocitoquímica para la determinación de subpoblaciones linfoides con el uso de microscopia óptica (MICROptic) de acuerdo a lo sugerido por el Centro de Inmunológica Molecular (CIM) (10). En esta técnica se utilizaron los anticuerpos monoclonales de la serie ior-T3, ior-T4 e ior-T8 y antisueros policlonales conjugados a fosfatasa alcalina, todos suministrados por la casa de comercialización CIMAB S.A.

Microtécnica para la determinación de subpoblaciones linfoides usando microscopia óptica (MICROptic).

Una vez que las laminas conservadas a -20 (grados Celcius) alcanzaron la temperatura ambiente, se hidrataron con solución tampon Tris (TBS), durante 10 minutos y en los pocillos correspondientes se añadieron 10 microlitros de los anticuerpos monoclonales previamente diluidos: ior T3 (1:10), ior T4 (1:20) e ior T8 (1:20); esta reacción fue incubada 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente las laminas se lavaron con TBS frío durante 10 minutos y se añadieron 10 microlitros de antiratón diluido 1:20 a cada pocillo, después se incubaron las láminas en las mismas condiciones y se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno con TBS frío, posteriormente se añadieron a cada pozo 10 microlitros del conjugado de fosfatasa alcalina -antifosfatasa alcalina (APPAP) diluido 1:20, posterior a la incubación se repitieron de nuevo los pasos de lavado, adición del anti-ratón y del APPAP. Después de lavar 10 minutos con TBS, se adicionaron a cada pozo 10 microlitros de la solución sustrato -cromógeno (NAFTOL-NNDFM-Levamisol) mas fast-red y se esperaron entre 3 y 5 minutos para el ior T4 e ior T8 y 10 minutos para el ior T3.

La reacción se detuvo enjuagando las láminas con agua corriente, posteriormente las células se fijaron con formaldehido al 37% durante 10 minutos y los nucleos fueron tenidos con 10 microlitros de verde metilo, se realizo una incubación a 60 (grados celcius) durante 10 minutos y se enjuagaron dos veces con agua corriente, se dejo secar al aire y posteriormente se monto el cubreobjeto con glicerina -gelatina.

La lectura se realizo en microscopio óptico, utilizando una lente de 40X o uno de inmersión 100X, se contaron como mínimo 200 células y se estimó el porcentaje de células positivas según la siguiente formula:

de células positivas

% Células = -----

total de células

Se calcularon las medidas aritméticas y las desviaciones standards del porcentaje de células CD3+, CD4+ CD8+ y del índice CD4/CD8, además para determinar si existían diferencias significativas desde el punto de vista estadístico según el sexo, en los parámetros anteriores, se aplicó la prueba no paramétrica de comparación de medias de Kolmogorv-Smirnov.

RESULTADOS

En la tabla 1 aparecen reflejados los valores individuales de las subpoblaciones de células T y del índice CD4/CD8 de todos los integrantes de la muestra.

Tabla 1. Subpoblaciones de células T en los individuos estudiados.

No.	Sexo	Edad	Leucoc.	Linfoc. x 10/L	CD3+ %	CD4+ %	CD8+ %	Índice CD4/CD8
1	F	17	6.7	0.42	67.50	38.00	21.80	1.74
2	F	18	8.2	0.35	61.00	31.50	32.00	0.98
3	F	17	7.5	0.32	66.15	37.30	20.00	1.86
4	F	18	6.4	0.36	59.80	37.00	21.50	1.72
5	F	17	4.8	0.49	59.0	44.50	22.20	2.00
6	M	19	6.2	0.38	65.80	42.75	27.80	1.53
7	M	17	6.8	1.34	72.20	41.25	31.00	1.33
8	F	18	7.5	0.29	74.00	46.00	35.47	1.29
9	F	17	6.6	1.38	75.60	50.00	37.00	1.35
10	M	19	5.5	0.38	68.60	39.00	28.50	1.36
11	M	19	10.4	0.39	65.20	48.30	19.70	2.45
12	F	21	6.0	0.44	69.50	40.50	34.33	1.18
13	F	18	10.8	0.33	76.00	49.50	22.00	2.25
14	F	17	5.0	0.46	75.50	46.50	32.60	1.45
15	M	19	6.0	0.37	69.50	44.50	28.50	1.56
16	M	19	5.1	0.50	75.00	57.00	31.50	1.80
17	M	19	5.1	0.43	65.00	49.00	22.00	2.22
18	M	21	4.9	1.42	68.50	52.00	24.00	2.16
19	M	20	6.3	1.40	70.00	46.30	27.50	1.68

En la tabla 2 se representan las proporciones de normalidad expresadas en porcentajes para las diferentes subpoblaciones de células T (CD3+, CD4+, CD8+) y del índice CD4/CD8, encontrados en la muestra estudiada por medio de la MICROptic, utilizando los anticuerpos monoclonales cubanos de la serie ior t3 ior t4 e ior t8, y los resultados de estas mismas determinaciones obtenidos por otros investigadores utilizando la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo así como AcM comerciales (OKT3, OKT4 y OKT8).

Tabla 2. Comparación entre los valores normales para células T (CD3+, CD4+, CD8+) y el índice CD4/CD8 obtenidos por el presente estudio, empleando diferentes técnicas.

Autor	Técnica empleada	% CD3+	%CD4+	%CD8+	Índice CD4/CD8
Smolen et al. 1982	Microscopia de Fluorescencia	64.9+-8.0	40.8+-3.6	26.8+-4.8	1.62+-0.29
Ritchad et al. 1983	Microscopia de Fluorescencia	63.5+-13.0	43.0+-13.32	25.0+-11.2	1.92+-0.87
Fiche et al. 1984	Microscopia de Fluorescencia	63.0+-6.0	46.0+-6.0	21.0+-4.0	2.2
Lorigados LC et al. 1985	Microscopia de Fluorescencia	63.93+-15.54	47.43+-9.32	28.62+-6.04	1.74+-0.59
Jacoby et al. 1983	Citometría de Flujo	69+-9.4	43.1+-7.6	29+- 8.9	1.49+-0.4
Ledeman et al. 1987	Citometría de Flujo	69+-8.7	29.0+-8.9	27+- 8.7	1.8+-0.69
Linares M. et al. 1997	MICROptic	68.6+-10.5	44.2+-12.4	27.3+-11.2	1.7+-0.9

*Lorigados LC et al. (12).

El porcentaje de reconocimiento específico para los AcM de la serie IOR (T3, T4, T8) encontrado por el método de MICROptic en el CIM y en el presente estudio, aparecen representados en la tabla 3, este parámetro se expresa teniendo en cuenta la amplitud de la proporción de normalidad encontrado en ambos estudios.

Tabla 3. Comparación entre los porcentajes de reconocimiento específico para los AcM IOR T3, IOR T4 e IOR T8, encontrados por el Centro de Inmunológica Molecular (CIM) y los obtenidos en el presente estudio.

Anticuerpo monoclonal	Subpoblación de células T	% de reconocimiento	
		Que reconoce CIM	Específico FCM-PR
IOR T3	CD3+	63-76	58-79
IOR T4	CD4+	30-51	32-57
IOR T8	CD8+	19-33	16-39

En la tabla 4 aparece representado la evolución de la subpoblación de células T y del índice CD4/CD8 según el sexo.

Tabla 4. Comportamiento de las subpoblaciones de células T (CD3+, CD4+ y CD8+) y del índice CD4/CD8 según sexo.

Subpoblación de células T	Sexo		Test Kolmogorov Smirnov
	Masculino n=10 X+-DS	Femenino n=9 X+-DS	
CD3+	68.86+-3.32	68.40+-6.79	ns
CD4+	46.67+-5.60	42.08+-6.13	ns
CD8+	26.72+-4.0	27.88+-6.89	ns
CD4/CD8	1.78+-0.40	1.58+-0.32	ns

DISCUSIÓN

Los valores obtenidos para los leucocitos totales y el diferencial de los linfocitos concuerdan con los aceptados internacionalmente como cifras normales en las proporciones de edades de los sujetos evaluados.¹¹

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con la MICROptic son bastante similares a los encontrados por otros autores (Tabla 2), pero se acercan mucho más a los obtenidos con la citometría de flujo según lo reportado por Lorigados LC et al¹² quienes por su parte, al utilizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias encontraron valores para todas sus poblaciones de linfocitos T, inferiores a los reportados por citometría de flujo. Por otra parte, el CIMAB. SA en una información sobre reporte de producto destaca los resultados de unos estudios coordinados entre el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" y el Centro de Inmunología Molecular en el cual comparan el porcentaje de células T (CD4+) en 60 muestras de pacientes infectados con el VIH obtenido por el MICROptic y la citometría de flujo, los resultados de este estudio arrojaron un coeficiente de correlación de 0.95, lo que demuestra gran similitud entre los resultados que se obtienen por ambas técnicas.¹⁰

Observe que los valores encontrados por nosotros para las subpoblaciones de células T (CD3+, CD4+ y CD8+) según aparece en la tabla 3, tienen una mayor amplitud que los que reporta el CIM, sin embargo fue imposible comparar estos resultados desde el punto de vista estadístico ya que el CIM no reporta las características de la muestra en la que se realizó el estudio, ni el tipo de método enzimático empleado en el desarrollo de la microtécnica.

Es de destacar que aunque se observa una tendencia de las células T (CD4+) y del índice CD4/CD8 a ser superiores en el sexo masculino y las de CD8+ en el femenino (Tabla 4), para ninguno de estos parámetros, estas diferencias resultan significativas desde el punto de vista estadístico, por lo que en la muestra evaluada, las subpoblaciones de células T (CD3+, CD4+ y CD8+) y el índice CD4/CD8 tuvieron una evolución independiente del sexo. Estos resultados no coinciden con los reportes realizados por otros investigadores^{13,14} quienes comprobaron que el índice CD4/CD8 de las células T en humanos está genéticamente controlado y que varía significativamente con la edad y entre el sexo masculino y femenino. Los resultados encontrados en el presente estudio pudieran deberse a que el tamaño de la muestra estudiada fue muy pequeño, ya que si

tenemos en cuenta la tendencia en el comportamiento de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ así como el índice CD4/CD8, nos atreveríamos a asegurar que con una muestra superior para ambos sexos, las diferencias encontradas serian mucho mas evidentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Klover G, Milstein C. Continued cultures of fused cells secreting of predefined specificity 1975; 256: 195-198.
- 2- Rivero RA, Valle L, Lorigados LC,s AC, Rivero J, Hernández P. Ev olución de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ en adultos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Rev Cubana Hematol Inmunol 1990; 6(1) :107 -13
- 3- Caruso A, Canaris AD, Licenziati S, Centalamessa A, Folghera S, Yonati NA et al. CD4+ and CD8+ lymphocytes of patients with AIDS synthesize increased amounts of interferon-gamma. J Requir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1995; 10(4): 462-70.
- 4- Rodríguez G, García C, Barroso MC. Disminución de linfocitos CD3+ de sangre periférica en pacientes con linfoma. Rev. Cubana Oncol. 1994; 10(1 -2): 40-46.
- 5- Abreu JE, Rodríguez T, León V, Renginfu E. Estudio comparativo de las subpoblaciones linfocitos T en carcinomas de la piel. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 1995; 14(1): 30-35.
- 6- Vidal H, Gautier H, Gómez I, Valle L, Martínez SM, Hernández P. Subpoblaciones linfocitarias en lactantes con anemia ligera por deficiencia de hierro. Rev. Cubana de Hepatología Inmunología 1994; 10(1) : 32 -37.
- 7- Allen ME, Young SP, Michell RH, Bacon PA. Altered T lymphocyte signaling in rheumatoid arthritis. Eur J Immunol 1995; 25(6) :1547 -54.
- 8- Niehves T, Akolkar B, Goldman IS, McKinley MJ, Silver J. Marked gamma delta T - cell decrease in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis (PBC). Autoimmunity 1994; 18(4): 267 -73.
- 9- Grossmann A, Rabinovitch PS, Lame MA, Jinnema JC, Ingram DK, Wolf et al. Influence of age, sex, and dietary restriction on intracellular free calcium responses of CD4+ lymphocytes in rhesus monkeys (Macaca mulatta). Journal Cell Physiology 1995, 162(2): 298-303.
- 10- CIMAH S.A. MICROptic para la determinación de subpoblaciones linfoides con el uso de la microscopia óptica. Reporte de producto. 1996.
- 11- Lynch MJ. Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology. La Habana: Instituto Cubano del Libro 1972: 648.

12-Lorigados LC, Aranda RE, Rivero RA, Plama LE. Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias con anticuerpos monoclonales. Revista Cubana Hepatología Inmunología Hemoterapia 1985; 1:185-192.

13-Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Gavetton G, Daniela GA et al. Genetic control of de CD4/CD8 T-cell ratio in humans. Nat. Medical 1995; 1(12): 1279-1283.

14-Lenxe R, Andersson B. Determination of the antibody binding capacity of lymphocyte membrane antigens by flow cytometry in 58 blood donors. Journal Immunology Methods 1995; 183(2): 267 -77.

Recibido: 9 de enero de 1997.

Aprobado: 23 de enero de 1997.

Lic. Maritza Linares Guerra. Facultad de Ciencias Medicas km 89 Carretera Central, Pinar del Río, CP. 20200 Cuba.