

## Variaciones diarias en leucocitos y subpoblaciones circulantes: relación con el cortisol y la ACTH plasmáticos

F. Rodríguez, R. E. Méndez, J. A. Castilla, R. García-Luján, F. Samaniego, J. R. Infante, F. Garrido y F. Perán\*

C. S. Virgen de las Nieves  
Servicio de Análisis Clínicos  
18014 Granada (España)

(Recibido el 1 de abril de 1992)

F. RODRÍGUEZ, R. E. MÉNDEZ, J. A. CASTILLA, R. GARCÍA-LUJÁN, F. SAMANIEGO, J. R. INFANTE, F. GARRIDO and F. PERÁN. *Circadian Rhythms in Circulating Leukocytes and Lymphocyte Subpopulations: Relation with Plasmatic Cortisol and ACTH*. Rev. esp. Fisiol, 48 (4), 253-258, 1992.

Surface cellular antigens of leukocytes, lymphocytes and corresponding subpopulations have been analysed by using monoclonal antibodies marked with fluorescein (FITC), parallel to those marked with phycoerythrin (PE). Cortisol and ACTH plasmatics have also been determined through RIA, on two samples at 8am. and 8pm. During this twelve hour evolution, a highly significant dependence of the leukocytes, T, T4 and T8 lymphocytes on the circulating ACTH has also been found. In general during the experiment time leukocytes, lymphocytes and subpopulations, have experimented an increase which is significantly related to the pituitary hormone secretion. The existence of this significant correlation establishes the presence of a possible mechanism that connects the cellular immunity to determined hypothalamus hormones.

Key words: ACTH, Cortisol, Circadian rhythms, Leucocytes.

En varias ocasiones se ha demostrado la existencia de vías reguladoras bidireccionales entre los sistemas endocrino e inmunológico. Son conocidos los trabajos *in vivo* e *in vitro* que muestran relaciones entre los ejes hipotálamo-hipófisis-suprarre-

nal, hipotálamo-hipofisario-gonadal y determinados aspectos de la respuesta inmune (1, 3, 6).

Los ritmos circadianos a que están sometidas las hormonas adrenocorticales y principalmente el cortisol, se han considerado en alguna ocasión mecanismos reguladores de la inmunidad celular. Así, KAWATE *et al.* (7), relacionó modificacio-

\* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

nes en las subpoblaciones linfocitarias T y B de ratón, con la concentración de corticosterona presente en el plasma de los animales estudiados. MIYAWAKI *et al.* (10), encontró cambios circadianos en subpoblaciones linfocitarias humanas circulantes y PEDERSEN *et al.* (12, 13), caracterizó en experimentos *in vitro*, relaciones de los glucocorticoides con las células NK, estableciendo un efecto modulador por el ejercicio.

La existencia de algunas discrepancias en los resultados referentes a las tasas circulantes de los leucocitos y de sus subpoblaciones a lo largo del día, y las relaciones entre las mismas y el eje hipofisario-adreno-gonadal (5, 11, 14), ha hecho plantearnos el presente estudio en el que, apoyados en resultados preliminares previos, que demuestran diferencias a lo largo de 12 h entre leucocitos, linfocitos y polimorfonucleares circulantes, tratamos de confirmar las diferencias citadas entre algunas subpoblaciones linfocitarias y su posible relación con los niveles de cortisol y ACTH.

### Material y Métodos

**Muestras.** — Se han utilizado muestras de sangre periférica de 18 voluntarios (11 hombres y 7 mujeres), de edades comprendidas entre 27 y 46 años y sin patología aguda o crónica demostrable en el momento del estudio. Las muestras (6 ml) han sido programadas a las 8 h y 20 h del mismo día, se han obtenido por punción de la vena de la flexura del codo y se han recogido sobre 0,06 ml de EDTA tripotásico 0,19 M, en tubos Vacutainer (Terumo Europe, Leuven, Bélgica).

**Recuentos celulares.** — El recuento de leucocitos totales previo al análisis de subpoblaciones, ha sido efectuado en un contador de células Coulter S Plus II (Coulter Electronics Ltd. Northwell Drive, Inglaterra).

**Subpoblaciones linfocitarias.** — Los antígenos celulares de superficie (tabla I), se han detectado mediante anticuerpos monoclonales (MoAbs), Beckton-Dickinson, Mountain View, CA). Con el fin de discriminar posible coexistencia de antígenos de superficie diferentes en un mismo tipo de célula, se han utilizado anticuerpos marcados con fenilisotiocianato de fluoresceína (FITC) y, de forma paralela, anticuerpos marcados con ficoeritrina (PE).

El análisis se ha efectuado sobre células mononucleares, aisladas previamente por centrifugación en Hypaque-Ficoll y ajustadas a 8000 cel/ml en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY). Posteriormente, se han incubado durante 30 minutos a 4 °C, 50 µl de suspensión de células, con 5 µL de MoAb. Concluido el período de incubación las células se han lavado 2 veces en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2, se han fijado en formaldehído al 1 % en tampón fosfato de la misma molaridad y pH, y se han analizado en un citómetro de flujo FACscan IV (Beckton Dickinson, Mountain View CA).

**Detérmnaciones hormonales.** — El cortisol y la ACTH plasmáticos se han medido por radioinmunoensayos comerciales (ICN Biochemicals, Inc. y Nichols Inst.), con dosis mínima detectable de 15 ng/ml para cortisol y de 1 pg/mL para la ACTH. Los coeficientes de variación intra- e interensayo medios descritos para dichos métodos han sido de 5,9 % y 6,8 % para cortisol, y de 3,1 % y 7,3 % para ACTH.

**Análisis estadístico.** — La normalidad y aleatoriedad de los datos estudiados han sido comprobadas mediante los test de D'AGOSTINO y de HART (citados en 9), habiendo sido aceptadas las correspondientes hipótesis nulas para  $\alpha = 0,05$ . La significación de las diferencias entre los valores medios de los recuentos de las poblaciones analizadas a las 8 h y 20 h se ha estudiado mediante el test «t» de Student

para muestras apareadas. El análisis de la dependencia entre las variables estudiadas, se ha efectuado mediante el cálculo del coeficiente de correlación simple de Pearson.

### Resultados

En la tabla II, recogemos los recuentos y errores estándar de la media correspondientes a los leucocitos, linfocitos y subpoblaciones estudiadas, que han sido

identificados mediante los anticuerpos monoclonales que se recogen en la tabla I. Los datos correspondientes a recuentos celulares están expresados en todos los casos en número de células por  $\text{mm}^3$ .

Analizadas apareadamente, las diferencias entre las mediciones a las 8 h y 20 h, aparecen como estadísticamente significativas las correspondientes a los recuentos de leucocitos, linfocitos totales, linfocitos T totales, T Helper (T4), T supresores (T8) y T expresores de C4 (CD45 R-). No se han encontrado diferencias entre la subpoblación linfocitaria B. No son significativas las diferencias entre células citotóxicas espontáneas (NK), ni entre las que expresan antígenos de diferenciación de clase II (HLA DR), ni se dan modificaciones en la expresión del receptor de IL-2.

Analizadas las correlaciones entre las tasas a las 8 y 20 h de cortisol y ACTH y el número de células circulantes, se ha encontrado dependencia lineal significativa ( $p < 0,01$ ) entre los linfocitos T totales, linfocitos T4, linfocitos T8 y ACTH medida a los mismos tiempos; asimismo, existe correlación lineal ( $p < 0,05$ ) entre los niveles plasmáticos de la citada hormona y los leucocitos y linfocitos de sangre periférica. No son significativas las correlaciones con el cortisol.

Tabla I. Anticuerpos monoclonales, utilizados en la detección de antígenos de superficie linfocitarios y consiguiente diferenciación de subpoblaciones en estudio.

Antígeno dif. (CD)	Anticuerpo	Célula definida
CD19	Leu12	Linfocito B
CD3	Leu4	Linfocito T
CD4	Leu3	Linf. T Helper
CD8	Leu2a	Linf. T Supres.
C4 CD45 R-	PD7	Linf. T4 Inducer-helper
HLA DR	anti HLA DR	Linf. B, Monocito Linf. T activado
CD56	NKH-1	Células NK
CD25	IL-2R	Linfocito

Tabla II. Recuento de leucocitos, linfocitos y restantes subpoblaciones analizadas, a las 8 h y 20 h del día. Valores medios  $\pm$  SEM por  $\text{mm}^3$ , y significación estadística de las diferencias entre los valores medios. NS = no significativo.

Célula	8 h	20 h	p
Leucocitos	7 206.2 $\pm$ 413.9	8 600.0 $\pm$ 473.0	< 0.005
Linfocitos tot.	2 887.0 $\pm$ 305.1	3 398.3 $\pm$ 267.8	< 0.005
Linfocitos B	313.8 $\pm$ 64.3	399.3 $\pm$ 104.0	NS
Linfocitos T	1 849.5 $\pm$ 234.4	2 272.5 $\pm$ 201.3	< 0.05
Linfocitos T4	778.2 $\pm$ 118.5	1 009.4 $\pm$ 118.0	< 0.05
Linfocitos T8	501.9 $\pm$ 63.9	661.9 $\pm$ 65.0	< 0.005
Linfocitos HLA-DR <sup>+</sup>	282.8 $\pm$ 61.3	513.2 $\pm$ 129.2	NS
Linf. receptor IL-2 <sup>+</sup>	543.2 $\pm$ 98.3	724.4 $\pm$ 145.9	NS
NK	360.5 $\pm$ 45.2	327.0 $\pm$ 98.6	< 0.05

### Discusión

En el presente estudio se demuestran diferencias significativas entre los recuentos a las 8 h y las 20 h de leucocitos-linfocitos y sus subpoblaciones T4 totales, T4 inductores de cooperación y T8, definidas respectivamente mediante los antígenos de diferenciación CD4, C4 CD45 R-, y CD8 (15). Asimismo se establece la existencia de correlación lineal entre las tasas plasmáticas a las 8 h y 20 h de la ACTH y las de las citadas subpoblaciones. No aparece ningún tipo de dependencia respecto del nivel de cortisol circulante.

Los resultados son comparables con los de otros autores (2, 8), coincidentes en la falta de relación entre número de células linfocitarias circulantes y glucocorticoides, los anticuerpos empleados en la diferenciación de poblaciones, y en el establecimiento de la dependencia entre sus tasas circulantes y las de la ACTH.

La ausencia de correlación significativa entre las poblaciones linfocitarias y la evolución diaria de la tasa de cortisol plasmático, podría indicar una escasa intervención de la concentración fisiológica de glucocorticoides en la regulación de la tasa circulante de leucocitos. Este planteamiento puede apoyarse en observaciones de correlación positiva cuando las concentraciones de glucocorticoides son elevadas y no están sometidas a ritmo circadiano, ya sea debido a administración terapéutica (11) o a elevaciones inducidas por estrés (13).

La existencia de correlación lineal significativa en los niveles de la ACTH plasmática y las poblaciones linfocitarias estudiadas, apoyan la presencia de un posible mecanismo que relacionaría la respuesta inmunitaria celular con determinadas hormonas hipotalámicas. La inexistencia de diferencias significativas de linfocitos B, a las 8 y 20 h, podría inducir a localizar esta regulación en las vías tímicas de activación del linfocito T, que podría estar mediada por receptores a pép-

tidos opioides encontrados en poblaciones linfocitarias (4), y confirmaría los resultados de WESTLEY *et al* (16), que relacionan niveles de MSH y número de leucocitos circulantes.

### Resumen

Se analizan, en muestras procedentes de voluntarios sanos, antígenos celulares de superficie de leucocitos, linfocitos y subpoblaciones, mediante recuento diferencial por citometría de flujo de células marcadas con anticuerpos monoclonales unidos a fenil isotiocianato de fluoresceína y ficoeritrina. De forma paralela, se determina, por RIA, cortisol y ACTH, a las 8 h y 20 h. Se muestran diferencias significativas entre los niveles de leucocitos, linfocitos totales y sus subpoblaciones T, T8 y T expresores de C4 CD45 R-, así como una correlación significativa entre leucocitos, linfocitos T totales, linfocitos T8 y ACTH circulante. Los resultados obtenidos apoyarían la existencia de un hipotético mecanismo que relacionaría la respuesta inmunitaria celular con hormonas del eje hipotálamo-hipofisario.

**Palabras clave:** ACTH, Cortisol, Leucocitos, Ritmos circadianos.

### Bibliografía

1. Blalock, J. E.: *J. Immunol.*, 132, 1067-1070, 1984.
2. Bertouch, J. V., Roberts-Thomson, P. J. R. y Bradley, J.: *Brit. Med. J.*, 286, 1171-1172, 1983.
3. Comsa, J., Leonaardt, H. y Ozminski, K.: *Thymus*, 1, 81-93, 1979.
4. Deschaux, P. y Rouabhia, M.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 496, 49-55, 1987.
5. Grossman, C. J.: *Science*, 227, 257-261, 1985.
6. Hall, N. R. y Goldstein, A. L.: *Lymphokine Res.*, 2, 1-2, 1983.
7. Kawate, T., Abo, T., Hinnma, S. y Kumagai, K.: *J. Immunol.*, 126, 1364-1367, 1981.
8. Levi, F. A., Canon, CH., Touitou, Y., Sulon, J., Mechkouri, M., Ponsart, E. D., Touboul, J. P., Vannetzel, J. M., Mowzowicz, I. y

- Reinberg, A.: *Clin. Exp. Immunol.*, 71, 329-335, 1988.
9. Martín-Andrés, A. y Luna del Castillo, J.: *Bioestadística para las ciencias de la salud*, Norma, Madrid, 1990.
  10. Miyawaki, T., Taga, K., Nagaoki, T., Seki, H., Suzuki, Y. y Taniguchi, N.: *Clin. Exp. Immunol.*, 55, 618-622, 1984.
  11. Paavonen, T.: *Med., Biol.*, 65, 229-240, 1987.
  12. Pedersen, B. K. y Beyer, J. M.: *Allergy*, 41, 220-224, 1986.
  13. Pedersen, B. K., Tvede, N., Hansen, F. R., Andersen, V., Bendix, T., Bendixen, K., Galbo, H., Haahr, P. M., Klarlund, K., Sylvest, J., Thomsen, B. S. y Halkjaer-Kristensen, J.: *Scand. J. Immunol.*, 27, 673-678, 1988.
  14. Ritchie, W. S., Osnald, I., Micklem, H. S., Boyd, J. D., Elton, R. A., Jazwinska, E. y James, K.: *Brit. Med. J.*, 286, 1773-1775, 1983.
  15. Sánchez-Madrid, F., Cebrián, M., Ortiz de Landazuri, M. O., Serra, C., Engel, P., Vives, J., Cabrera, T., Sampalo, A. y Garrido, F.: *Immunología*, 8, 35-46, 1989.
  16. Westly, H. J., Kleiss, A. J., Kelley, K. W., Wong, P. K. Y. y Pick-Hoong Yuen: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 496, 98-103, 1987.

