

Separación de linfocitos B, T, T γ y T μ mediante rosetas con distintos tipos de hematíes y con poliacrilamida. Estudio comparativo

I. de Dios*, M. Manso y A. López-Borrasca

Servicio de Hematología
Hospital Clínico. Salamanca

(Recibido el 21 de febrero de 1983)

I. DE DIOS, M. MANSO and A. LOPEZ-BORRASCA. *Separation of B, T, T γ and T μ Lymphocytes by Rosetting with Either Different Classes of Erythrocytes or Polyacrylamide. A Comparative Study.* Rev. esp. Fisiol., 39, 417-422, 1983.

The present work compares the effectiveness of, both, red blood cells from different species (sheep, ox and chicken) and polyacrylamide beads to form rosettes to separate B, T, T γ and T μ lymphocytes.

Ox red cells showed a scanty agglutination, so that they appeared to be optimal to isolate B, T γ and T μ lymphocytes by EA rosettes. Sheep red cells were the best to separate both T and B lymphocytes by spontaneous and EAC rosettes respectively; on the other hand, chicken red blood cells, which showed a high capacity to form rosettes, were not useful to separate lymphocytes, as it was difficult to separate them from the lymphocytes.

Polyacrylamide beads, with bound specific antibody against surface immunoglobulins, proved to be a good method for B lymphocyte identification, but not for lymphocyte isolation, since it was difficult to eliminate the polyacrylamide.

El estudio de los receptores de la membrana linfocitaria ha sido motivo de investigación durante los últimos años, ya que se supone están implicados en actividades funcionales específicas de las distintas poblaciones y subpoblaciones de linfocitos. Los linfocitos B poseen inmunoglobulinas de superficie (9, 21), receptores para el fragmento Fc de las inmuno-

globulinas (11, 16), y del 3^{er} elemento del complemento (2). Los linfocitos T se caracterizan por la presencia de receptores para hematíes de oveja (10). Distintas subpoblaciones de linfocitos T son portadoras de receptores para el fragmento Fc de la IgG (T γ) o IgM (T μ). Se utilizan distintos métodos para su aislamiento, tales como rosetas espontáneas (10), EAC (eritrocito-anticuerpo-complemento) (2), EA (eritrocito-anticuerpo) (8, 15), marcaje con anticuerpos antiinmunoglobulinas fluoresceinados (1) y otros.

* Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Biología. Salamanca.

En este trabajo se compara el rendimiento en la separación de linfocitos B, T, T_γ y T_μ , con distintos tipos de rosetas al utilizar hematíes de distintas especies animales (oveja, buey y pollo) y bolas de poliacrilamida antiinmunoglobulinas humanas.

Material y métodos

SEPARACIÓN DE LINFOCITOS T

A partir de sangre venosa de donantes voluntarios se separaron los linfocitos según la técnica descrita por BOYUM (3). Los linfocitos T se aislaron mediante rosetas espontáneas con hematíes de oveja tratados con AET (2-amino etil isotiouronio bromuro hidrobromuro—Sigma) (12), según el método descrito por JONDAL *et al.* (10). A continuación se centrifugó sobre un gradiente de linfoprep (d: 1,007 g/ml) a 400 g, 20 min a 4.°C, recogiendo la interfase de células «non T» para el aislamiento posterior de linfocitos B. El precipitado se sometió a tratamiento con CINH_4 al 0,85 % a 4.°C, 15 min para lisar los hematíes.

SEPARACIÓN DE LINFOCITOS B

Obtención de hemolisinas IgG e IgM contra hematíes de pollo. Para la obtención de cada tipo de hemolisina se utilizaron dos conejos a los que se inyectaron por vía endovenosa en las venas marginales de la oreja, 1 ml de suspensión de membranas de hematíes de pollo en tampón PBS (fosfato salino), pH 7,3, a una concentración de proteína de 4 mg/ml. Las inyecciones se practicaron diariamente, la primera de las cuales contenía la suspensión de membranas de hematíes de pollo y adyuvante de Freund completo (Behring-Werke) y las restantes adyuvante de Freund incompleto. Los animales se sacrificaron al cabo de 10 y 20 días,

recogiendo la sangre en tubos de vidrio.

A partir del suero de estos animales inmunizados, se purificó la IgG e IgM mediante precipitación fraccionada con SO_4Na_2 y posterior elución cromatográfica en DEAE-Sephadex (13). La actividad de las mismas se midió por el método de MAYER (14), utilizando hematíes de pollo a dilución 1:20 que se incubaron con distintas diluciones de hemolisinas IgG e IgM (1:20, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700 y 1:800) a 37°C, 30 min. A continuación se incubaron con suero de cobaya a dilución 1:50, 1:100 y 1:150, durante 1 h a temperatura ambiente. Se paró la reacción al añadir suero fisiológico frío, centrifugando después a 500 g, 10 min y del sobrenadante se midió la hemólisis espectrofotométricamente a 415 nm. Paralelamente se hicieron los respectivos tubos controles, sin suero de cobaya como fuente de complemento, para medir la hemólisis espontánea a tener en cuenta como factor de corrección.

Las hemolisinas IgG e IgM contra hematíes de oveja y buey fueron comerciales (Cordis).

Formación de rosetas EA. Los hematíes de oveja, buey y pollo se incubaron con el mismo volumen de la IgG correspondiente a cada tipo de hematíes, a distintas diluciones, desde 1:50 a 1:600, durante 30 min a 37°C. Después de lavar los hematíes y resuspenderlos en Medio 199 (Difco), se mezclaron con igual volumen de una suspensión de linfocitos «non T» (2×10^6 cel/ml), se centrifugaron a 200 g, 5 min e incubaron a 37°C, 15 min. Las rosetas se contabilizaron bajo microscopio óptico, considerando como tales cuando el linfocito está rodeado por tres o más hematíes.

Formación de rosetas EAC. Se siguió el método descrito por BIANCO *et al.* (2), utilizando hemolisina IgM a distintas diluciones, desde 1:20 a 1:640.

Formación de rosetas con bolas de poli(acrilamida-antiinmunoglobulina. Se realizaron según el método descrito por CHAO y YOKOYAMA (4).

SEPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T: T_γ T_μ

A partir de linfocitos T, separados mediante rosetas espontáneas, se aislaron en primer lugar linfocitos T_γ , mediante rosetas EA con hematíes de oveja, buey y pollo, sensibilizados con hemolisina IgG a distintas diluciones, desde 1:50 a 1:800, según el método descrito por MORETTA *et al.* (15). Las rosetas se separaron por centrifugación en un gradiente de linfoprep a 400 g, 20 min, a 4°C. La interfase, de células «non T_γ », se recogió para el aislamiento de linfocitos T_μ , mediante rosetas EA con los tres tipos de hematíes, sensibilizados con hemolisina IgM a distintas diluciones, desde 1:20 a 1:640 (15).

Resultados

Por elución cromatográfica se obtuvo la IgG en un primer pico y la IgM en último lugar, con un gradiente de ClNa entre 0,12 y 0,22 M (figura 1).

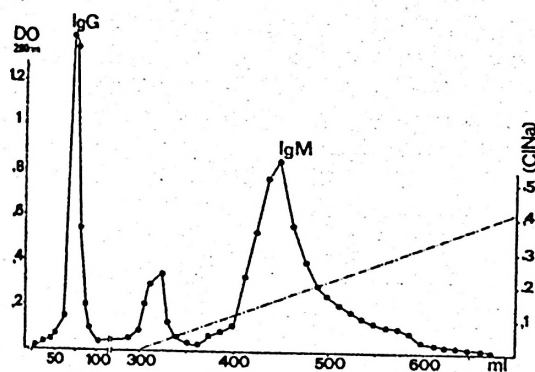


Fig. 1. Elución cromatográfica de IgG e IgM en DEAE-Sephadex.

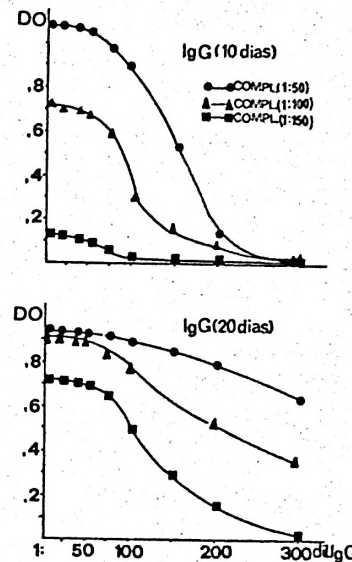


Fig. 2. Actividad hemolítica de IgG de conejos inmunizados 10 y 20 días. (D. O. 415 nm.)

La actividad hemolítica demostró mayor efectividad de la hemolisina IgG del conejo inmunizado durante 20 días y la IgM del inmunizado durante 10 días (figuras 2, 3).

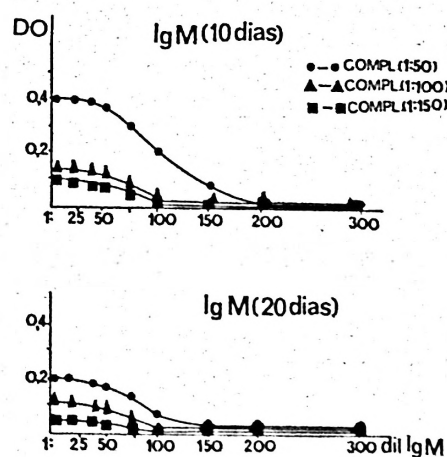


Fig. 3. Actividad hemolítica de IgM de conejos inmunizados 10 y 20 días. (D. O. 415 nm.)

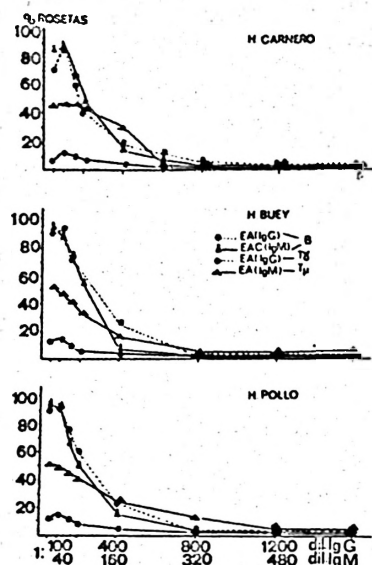


Fig. 4. Rosetas (%) EA y EAC de linfocitos, T_γ y T_μ con distintas diluciones de hemolisina IgG e IgM.

Los porcentajes de rosetas EA y EAC para la separación de linfocitos B, a partir de linfocitos «non T», así como los de rosetas EA, para la separación de linfocitos T_γ y T_μ , realizadas con hematíes de oveja, buey y pollo se detallan en la fig. 4.

Considerando óptima la dilución 1:100 de la hemolisina IgG propia de hematíes de oveja, buey y pollo, y dilución 1:40 de la hemolisina IgM de oveja y 1:20 para la de buey y pollo, se obtuvieron los porcentajes de linfocitos B, T, T_γ y T_μ detallados en la Tabla I.

Discusión

Además de la caracterización y reconocimiento de las distintas poblaciones de linfocitos, es indispensable la selección del método de aislamiento más eficaz. En este aspecto, la técnica de las rosetas ofrece grandes ventajas, ya que es fácil aislar una población determinada del resto por una simple centrifugación en gradiente de densidad.

Los linfocitos B se aislaron mediante rosetas EA, por la presencia en su membrana de receptores para el fragmento Fc de la IgG (6, 7), también presente en linfocitos T_γ (20), razón por la cual se aisló en primer término la población de linfocitos T mediante rosetas espontáneas. Los linfocitos B también se aislaron mediante rosetas EAC por la presencia de receptores para el complemento en su membrana (2), existentes asimismo en otros tipos de células, tales como granulocitos y una pequeña proporción de células T (2), que fueron eliminados en pasos precedentes.

Con los tres tipos de hematíes, se apreciaron menores porcentajes de rosetas EA con hemolisina IgG a dilución 1:50 que a 1:100, siendo esta diferencia más acusada con hematíes de oveja, hecho que puede estar relacionado con el elevado grado de aglutinación presentado. Los hematíes de buey apenas aglutinaron y con ellos se obtuvo el máximo rendimiento. Se eligieron hematíes de oveja para la formación de rosetas EAC, ya que

Tabla I. Porcentaje de linfocitos B, T, T_γ y T_μ en sangre periférica de sujetos normales.

	B			T		
	EA	EAC	Acilamida-anti-IgG	E (AET)	T_γ	T_μ
Carnero	15,41 ± 2,89	17,55 ± 2,54		63,28 ± 6,27	12,71 ± 2,98	50,64 ± 4,05
Buey	16,68 ± 1,91	17,32 ± 2,95	12,28 ± 2,21		13,27 ± 2,33	51,59 ± 4,59
Pollo	16,09 ± 1,85	17,64 ± 2,74			12,95 ± 3,40	51,91 ± 5,54

con menores cantidades de IgM (1:40) se consiguieron porcentajes de rosetas similares a los obtenidos con hematíes de buey sensibilizados con su IgM a mayor concentración (1:20). El rendimiento fue semejante con hematíes de oveja y pollo con IgM a dilución 1:40, sin embargo, se descartaron los últimos, pues a pesar de que la visualización de las rosetas es más clara dadas sus características morfológicas, resultó más difícil el aislamiento posterior del linfocito B, por el hecho de que la lisis de los hematíes de pollo requiere un proceso más largo, cuestión que repercute en la duración y viabilidad del linfocito. Las rosetas con bolas de poliacrilamida-antiinmunoglobulinas humanas son eficaces para el reconocimiento y contabilización de linfocitos B e incluso de sus subpoblaciones, de acuerdo con el tipo de Inmunoglobulinas de su superficie, pero no para el aislamiento, por las dificultades presentadas en la eliminación total de la acrilamida. En el aislamiento de linfocitos T γ se consiguieron mayores porcentajes con hematíes de buey, que por su escasa aglutinación son susceptibles de recubrirse de mayor densidad de IgG, hecho que influye en la formación de rosetas (5). Trabajos realizados por otros autores, demuestran la existencia de dos tipos de receptores para el fragmento Fc de la IgG en linfocitos T (18, 19); uno de ellos sería el detectado en nuestro caso, denominado FcR-F (receptor para el fragmento Fc libre) y otro inducido por tratamiento previo de linfocitos T con medio hipotónico controlado (FcR-I). Asimismo, por la escasa aglutinación se eligieron hematíes de buey para el aislamiento de linfocitos T μ mediante rosetas EA. Esta variabilidad de resultados está de acuerdo con los trabajos de REVILLARD *et al.* (17), quien acusó la influencia de varios factores, entre los que cita el tipo de hematíe utilizado, viabilidad celular, condiciones de incubación, densidad de anticuerpos fijados a la superficie del hematíe y otros.

Resumen

Se compara la efectividad de distintos hematíes y bolas de poliacrilamida en la formación de varios tipos de rosetas para el aislamiento de linfocitos B, T, T γ y T μ .

Para la separación de linfocitos B, T γ y T μ mediante rosetas EA, se consideran óptimos los hematíes de buey por su escasa aglutinación y los hematíes de oveja para el aislamiento de linfocitos T y B mediante rosetas espontáneas y EAC respectivamente. Los hematíes de pollo resultan eficaces, en lo que respecta a la gran capacidad para formar rosetas, fácil identificación y contabilización celular, pero presentan inconvenientes para su separación en el aislamiento posterior de los linfocitos. Las rosetas con bolas de poliacrilamida sensibilizadas con el anticuerpo específico contra las inmunoglobulinas humanas, tienen un fundamento inmunológico y se considera un buen método de identificación de linfocitos B, pero no resulta práctico para el aislamiento, ya que es difícil eliminar por completo la acrilamida.

Bibliografía

1. AISENBERG, A. C.: *New. Eng. J. Med.*, 287, 272-276, 1972.
2. BIANCO, C., PATRICK, R., NUSSENZWEIG, V.: *J. Exp. Med.*, 132, 702-720, 1970.
3. BOYUM, A.: *Scand. J. Clin. Invest.*, 21 (suppl. 97), 77, 1968.
4. CHAO, W. y YOKOYAMA, M. M.: *Clin. Chim. Acta*, 78, 79-83, 1977.
5. CLEMENTS, F. J. y LEVY, J.: *Clin. Exp. Immunol.*, 34, 281-287, 1978.
6. DICKLER, H. B. y KUNKEL, H. G.: *J. Exp. Med.*, 136, 191-196, 1972.
7. DICKLER, H. B.: En «Advances in Immunology» (Dixon, F. J. y Kunkel, H. G., eds.) Academic Press. Nueva York, 1976. p. 87.
8. FERRARINI, M., MORETTA, L., ABRILE, R. y DURANTE, M. L.: *Eur. J. Immunol.*, 5, 70-72, 1975.
9. GUPTA, S. y GOOD, R. A.: *Seminars Hematol.*, 17, 1-29, 1980.
10. JONDAL, M., HOLM, G. y WIGZELL, H.: *J. Exp. Med.*, 136, 207-215, 1972.
11. KAMOUN, M., MARTIN, P. J., HANSEN, J. A., BROWN, M. A., SIADAK, A. W. y NOWISKI, R. C.: *J. Exp. Med.*, 153, 207-212, 1981.

12. KAPLAN, M. E. y CLARK, C.: *J. Immunol. Meth.*, **5**, 131-136, 1974.
13. KEKWICK, R. A.: *Biochem. J.*, **34**, 1248-1257, 1940.
14. MAYER, M. M.: En «Experimental Immunochimistry», (Kabat, E. A. y Mayer, M. M. eds.), 2.^a edn., Charles, C. T., Springfield, Ill., 1961, p. 234.
15. MORETTA, L., WEBB, S. R., GROSSI, C. E., LYDYARD, P. M. y COOPER, M. D.: *J. Exp. Med.*, **146**, 184-199, 1977.
16. PICHLER, W. J. y BRODER, S.: *J. Immunol.*, **121**, 887-895, 1978.
17. REVILLARD, J. R., SAMARUT, C., CORDIER, G., LETHIBICHTHUY, J. C. y BROCHIER, J.: *C. R. Sc. Soc. Biol.*, **174**, 686-697, 1980.
18. SAAL, J. G., HADAM, M. R., FEUCHT, H. E. y RAUTENSTRAUCH, H.: *Immunobiol.*, **157**, 272-280, 1980.
19. SAAL, J. G., HADAM, M. R., FEUCHT, H. E. y RAUTENSTRAUCH, H.: *Scand. J. Immunol.*, **16**, 17-23, 1982.
20. STOUT, R. D. y HERZENBERG, L. A.: *J. Exp. Med.*, **142**, 611-617, 1975.
21. VITETTA, E. S., y UTIR, J. W.: *Science*, **189**, 964-972, 1975.