Análisis comparativo de las glicoproteínas de membrana de linfocitos B normales y de leucemia linfática crónica, por lectinas

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

Departamento de Hematología
Hospital Clínico Universitario
37008 Salamanca (España)

(Recibido el 10 de septiembre de 1984)

I. DE DIOS, M. MANSO, M. MARTIN and A. LOPEZ-BORRASCA. *A Comparative Analysis of Plasma Membrane Glycoproteins in B Normal and Chronic Lymphocytic Leukemia by Lectins*. Rev. esp. Fisiol., 41, 211-216. 1985.

Eight plant lectins were used to investigate membrane alterations in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). By rosetting with lectins attached to latex particles, the cell percentages with the abundance of each lectin receptor were compared in B normal and leukemic lymphocytes. Comparing these data with the number of lectin molecules bound to each cell and the affinity, which are values calculated with ¹²⁵I-labeled lectins, it was possible to deduce differences in the composition of glycoproteins in B normal and B-CLL lymphocytes membrane. Compared to B normal, B-CLL lymphocytes had fewer receptors for WGA and more for *Lens culinaris*, SBA and *Tetragonolobus purpureus* lectins. Receptors for Concanavalin A, *Pisum sativum*, PHA and *Tetragonolobus purpureus* showed a higher affinity with B normal lymphocytes, while the other lectins assayed showed more affinity with B-CLL lymphocytes. So, it is possible to establish a comparative analysis about the plasma membrane glycoproteins in the B normal and CLL lymphocytes by lectin binding studies.

Key words: Lectin latex, Lymphocyte, Receptor affinity.

Los linfocitos B de pacientes con leucemia linfática crónica (B-LLC), tienen marcadores de superficie característicos de los linfocitos B normales (2, 15, 17). Sin embargo, entre ambos tipos de cé-

lulas se han observado diferencias en el contenido lipídico de la membrana (8) y de microviscosidad (10), así como en la proporción de carbohidratos y en la estructura de las glicoproteínas de la membrana, según se deduce de la variación apreciada en el número de receptores para algunas lectinas (3, 16).

En el presente trabajo se han utilizado ocho lectinas, que se ligan específica-

* Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Biología. 37008 Salamanca.

** Departamento de Medicina Nuclear. Hospital Clínico Universitario. Salamanca.

mente a distintos carbohidratos, con el fin de apreciar posibles diferencias en la estructura glicoproteica de la membrana, entre los linfocitos B normales y los B-LLC. Para ello se plantearon dos tipos de experimentos: a) formación de rosetas con bolas de látex recubiertas de lectina en ambas clases de linfocitos, a fin de contabilizar poblaciones con abundancia de receptores lectínicos y/o mayor afinidad, y b) ligar a los linfocitos lectina marcada con I^{125} para deducir el número absoluto de moléculas de lectina unidas por célula y su afinidad por los receptores específicos.

Material y métodos

Preparación de linfocitos. Los linfocitos utilizados se obtuvieron de sangre de 11 donantes voluntarios y de 11 pacientes con leucemia linfática crónica, por centrifugación en gradiente de FICOLL (5). En primer lugar, se aislaron los linfocitos T mediante rosetas con hemafís de oveja tratados con AET (2-aminoetil isotiouronio bromuro hidrobromuro), Sigma (11). Los linfocitos B se aislaron de los linfocitos «non T» mediante rosetas EAC (eritrocito-anticuerpo-complemento) (4).

Lectinas. Concanavalina A (Con A), *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* (PHA), Aglutinina de soja (SBA), *Dolichos biflorus*, *Tetragonolobus purpureus* y *Triticum vulgaris* (WGA), de Sigma.

Azúcares específicos. D-manosa (D-man) específico de Con A, *Lens culinaris* y *Pisum sativum*; N-acetil D-galactosamina (NAGA), específico de PHA, SBA y *Dolichos biflorus*; N-acetil D-glucosamina (N-ac. glu), específico de WGA; y L-fucosa (L-fuc), específico de *Tetragonolobus purpureus*, de Merck.

Preparación de bolas de látex-lectina. Se mezclaron 50 μ l de una suspensión de látex (0,8 μ) (Difco) al 10 % en agua bidestilada con 0,5 mg de lectina resuspendida previamente en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2 y se incubó a 37°C durante 30 min con agitación constante. El exceso de lectina se eliminó después de tres lavados con solución salina de Hanks (Difco). Justamente antes de la formación de las rosetas se añadió suero fetal de ternera (Flow) al 10 % en tampón fosfato y se incubó a 37°C, durante 5 min, para saturar los puntos hidrofóbicos de las bolas de látex que no se hubieran ocupado con la lectina.

Formación de las rosetas de linfocitos con látex-lectina. Se mezclaron 250 μ l de una suspensión de linfocitos (1×10^7 /ml) con el mismo volumen de una suspensión de látex-lectina, centrifugando después a 200 g durante 5 min y manteniéndolo a 4°C durante 1 h. El recuento de las rosetas se efectuó bajo microscopio óptico, considerando como tales aquéllas en las que el linfocito se rodea al menos de ocho bolas de látex (19).

Para estudiar la afinidad de la lectina con los receptores linfocitarios se mezclaron las rosetas, formadas previamente, con el azúcar específico a concentraciones crecientes (M): 0,025, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 y 0,25. Después de tres horas de incubación a temperatura ambiente, se contabilizó el porcentaje de rosetas.

Incubación de los linfocitos con I^{125} -lectinas. Previamente se marcaron las lectinas con I^{125} mediante lactoperoxidasa (7). Los linfocitos B de sujetos normales y los de pacientes con LLC (2×10^6) se resuspendieron en 200 μ l de Medio 199 (Difco) conteniendo albúmina bovina (Sigma) al 0,5 % y se incubaron a temperatura ambiente, durante 45 min, con siete concentraciones crecientes de cada lectina marcada hasta al-

canzar la saturación de los receptores de la membrana linfocitaria. La concentración de I^{125} -lectina empleada en la incubación osciló según los siguientes valores (μg): Con A, 17-144; *L. culinaris*, 11-88; *P. sativum*, 17-144; PHA, 17-140; SBA, 10-80; *D. biflorus*, 19-159; *T. purpureus*, 18-147 y WGA, 7-56. La lectina no ligada a las células se eliminó por tres lavados con Medio 199 conteniendo albúmina bovina al 0,5 %. La radiactividad incorporada a las células se midió en c.p.m. del precipitado en un contador de radiaciones gamma (LKB 1270 Rack-gamma II).

Cálculo del número de moléculas de lectina ligadas por célula y de la constante de asociación. Al representar en abscisas el número de moles de lectina incubada con los linfocitos y en ordenadas el número de moléculas de lectina ligadas por célula, con los valores obtenidos a partir de las siete concentraciones de lectina empleadas, se obtienen las curvas de saturación de los receptores. Las correspondientes gráficas dobles inversas son rectas, que cortan al eje de ordenadas en un punto que representa el valor inverso del número máximo de moléculas de lectina ligadas por célula y la intersección con el eje de abscisas representa la afinidad, es decir el valor inverso de la constante de asociación. Como la afinidad es un concepto que no se puede expresar con un valor numérico, en su lugar se especifica el valor absoluto de la constante de asociación y a partir de él es posible deducir si la afinidad es alta (constante de asociación baja), o baja.

Análisis estadístico. Se utilizó el test estadístico de la t de Student para calcular diferencias significativas.

Resultados

Las lectinas *P. sativum*, PHA, SBA, *D. biflorus* y *T. purpureus* se unen más

Tabla I. Rosetas de linfocitos (%) con látex-lectina.

Lectina	B normal	B-LLC
Con A	29,22 $\pm$ 4,84	26,22 $\pm$ 4,44
<i>L. culinaris</i>	77,33 $\pm$ 4,33	70,89 $\pm$ 6,60
<i>P. sativum</i>	35,44 $\pm$ 5,22	43,00 $\pm$ 6,02*
PHA	25,11 $\pm$ 3,86	39,11 $\pm$ 4,51*
SBA	40,22 $\pm$ 5,61	58,11 $\pm$ 8,28*
<i>D. biflorus</i>	13,33 $\pm$ 3,35	79,00 $\pm$ 5,72*
<i>T. purpureus</i>	28,44 $\pm$ 4,42	43,33 $\pm$ 5,27*
WGA	92,22 $\pm$ 5,78	84,11 $\pm$ 6,52

* $p < 0,001$ ($n = 11$).

específicamente a mayor número de linfocitos B de LLC; el resto de las lectinas formó mayor número de rosetas con los B normales, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa (tabla I). La concentración de azúcar específico para cada lectina capaz de deshacer el 50 % de las rosetas formadas es un índice de la afinidad. Así, los linfocitos B de LLC mostraron mayor afinidad que los B normales con las lectinas Con A, *L. culinaris*, SBA, *D. biflorus* y WGA (tabla II).

A partir de las gráficas dobles inversas, correspondientes a las curvas de saturación de los receptores lectínicos de linfocitos B normales y de LLC con las ocho lectinas, se calculó, según el mé-

Tabla II. Índice de la afinidad de linfocitos B normales y de pacientes con leucemia linfática crónica.

Concentración de azúcar (M).

Lectina	B normal	B-LLC
Con A	0,105 D-man	0,110 D-man
<i>L. culinaris</i>	0,073 D-man	0,087 D-man
<i>P. sativum</i>	0,080 D-man	0,079 D-man
PHA	0,107 NAGA	0,075 NAGA
SBA	0,097 NAGA	0,112 NAGA
<i>D. biflorus</i>	0,082 NAGA	0,092 NAGA
<i>T. purpureus</i>	0,098 L-fuc	0,092 L-fuc
WGA	0,087 N-Ac. glu	0,088 N-Ac. glu

Tabla III. Número de moléculas de lectina ligadas por célula.

Lectina	Moléculas/célula ($\times 10^{-7}$)	
	B normal	B-LLC
Con A	0,53 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,05
<i>L. culinaris</i>	2,00 $\pm$ 0,13	2,48 $\pm$ 0,20*
<i>P. sativum</i>	0,79 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,07
PHA	0,26 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,07*
SBA	0,84 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,07*
<i>D. biflorus</i>	2,01 $\pm$ 0,15	2,02 $\pm$ 0,18
<i>T. purpureus</i>	0,51 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,09*
WGA	5,32 $\pm$ 0,42	4,55 $\pm$ 0,36*

* $p < 0,001$ ($n = 11$).

todo de STECK y WALLACH (18), el número de moléculas de lectina ligadas por célula (tabla III) y la constante de asociación (tabla IV). Los linfocitos B de LLC ligaron mayor número de moléculas de las lectinas *L. culinaris*, PHA, SBA y *T. purpureus*, y menor de WGA que los B normales. Con el resto de las lectinas no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas a este respecto. Las lectinas Con A, *L. culinaris*, *D. biflorus*, SBA y WGA mostraron mayor afinidad por los linfocitos B de LLC y el resto de las lectinas por los B normales.

Tabla IV. Constante de asociación de las lectinas con los linfocitos.

Lectina	Constante de asociación $\times 10^{-9}$ M	
	B normal	B-LLC
Con A	0,94 $\pm$ 0,99	0,77 $\pm$ 0,07*
<i>L. culinaris</i>	3,86 $\pm$ 0,22	3,27 $\pm$ 0,16*
<i>P. sativum</i>	1,58 $\pm$ 0,16	1,81 $\pm$ 0,07*
PHA	0,65 $\pm$ 0,06	2,97 $\pm$ 0,08*
SBA	1,14 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,07*
<i>D. biflorus</i>	2,66 $\pm$ 0,23	2,00 $\pm$ 0,15*
<i>T. purpureus</i>	1,51 $\pm$ 0,10	1,85 $\pm$ 0,11*
WGA	2,20 $\pm$ 0,36	1,62 $\pm$ 0,30*

* $p < 0,001$ ($n = 11$).

Discusión

Las concentración y distribución de los carbohidratos en las glicoproteínas de la membrana son datos indicativos del estadio de diferenciación celular (14). Los resultados obtenidos por la técnica de rosetas con látex-lectina, inducen a pensar en la existencia de un amplio gradiente de estados de maduración celular, ya que se pueden distinguir en principio dos poblaciones de linfocitos: una con abundancia de un determinado receptor (los que formaron rosetas), y otra con déficit del mismo (los que no formaron rosetas). Dentro de la primera hay una amplia gama de subpoblaciones con distinta composición y estructura en las glicoproteínas de membrana, de tal forma, que aquellos linfocitos que oponen mayor resistencia a liberar el látex-lectina, por la acción competitiva del azúcar específico añadido en estado soluble, tendrán mayor número de receptores lectínicos y/o mayor afinidad. Sin embargo, no se puede considerar que la población de linfocitos que no formó rosetas carezca totalmente de receptores. Los resultados con I^{125} -lectinas se refieren al valor medio de la afinidad y del número de receptores de la totalidad de los linfocitos B normales y de LLC.

En ambos experimentos, se refleja una afinidad mayor de los linfocitos de LLC con las lectinas Con A y *L. culinaris*, específicas de D-manosa, respecto a los B normales, hecho que concuerda con resultados obtenidos anteriormente por estudios electroforéticos (3). Sin embargo, la afinidad media determinada mediante I^{125} -*P. sativum* en la totalidad de linfocitos B de LLC, es menor que en los B normales, a pesar de ser esta lectina específica también por D-manosa. Este resultado puede ser achacable al defecto enzimático de la actividad de las glicosiltransferasas de estas células leucémicas (6).

Las lectinas PHA, SBA y *D. biflorus* son específicas por la unión con NAGA. La lectina PHA muestra, en ambos experimentos, un acusado descenso de la afinidad con linfocitos de LLC, respecto a los B normales, aunque el número de moléculas de esta lectina, contabilizadas por célula, es mayor para LLC y además formó mayor número de rosetas. La molécula de PHA tiene dos sitios de unión con los receptores específicos (13), la baja afinidad expresada con los linfocitos de LLC se podría atribuir a la unión mínima posible, es decir una molécula de lectina con un receptor; por tanto a pesar de ligar cada linfocito de LLC mayor número de moléculas de PHA no implica necesariamente que estas células tengan mayor número de receptores para esta lectina. Las lectinas SBA y *D. biflorus* manifiestan mayor afinidad en ambos experimentos para la unión con los linfocitos de LLC, respecto a los B normales, y a su vez coincide con una mayor formación de rosetas y de moléculas de lectina ligadas. De estos resultados se deduce que los linfocitos de LLC han de tener necesariamente mayor número de receptores para estas lectinas que los B normales, aun cuando la interacción receptor-molécula de lectina fuera la mínima (1:1).

Aparentemente los linfocitos de LLC tienen más L-fucosa en las glicoproteínas de membrana que los B normales, aunque su disposición estructural es menos idónea para la unión con la lectina *T. purpureus*, como muestra el alto número de moléculas de lectina ligada y la baja afinidad obtenida en los dos experimentos realizados.

Respecto a la lectina WGA, específica de N-acetil D-glucosamina y ácido siálico (16), los linfocitos de LLC ligaron menor número de moléculas que los normales, que se podría explicar por el déficit de ácido siálico propio de estas células —ya que tienen una glicosilación

anormal que impide se complete la secuencia de carbohidratos—, sin añadir ácido siálico al extremo reductor de la cadena glicoproteica, lo que conlleva una disminución del 50 % en el contenido de este aminoazúcar respecto a los linfocitos B normales (12). Además, se ha demostrado en estas células una pequeña cantidad de glicolípidos de distinta composición a los presentes en los normales (9). Sin embargo, la viscosidad de la matriz lipídica es menor en el caso de las células leucémicas (10), lo que podría justificar la mayor afinidad encontrada. El déficit de ácido siálico en células leucémicas facilita el acceso de las moléculas de lectina a su receptor específico, explicando asimismo el incremento de afinidad.

Ambos tipos de experimentos son interdependientes, y por sí mismos son perfectamente válidos para el diagnóstico de pacientes con leucemia linfática crónica, de acuerdo con la composición glicoproteica de su membrana. El primero de los planteados, es un método rápido, sencillo y eficaz, que permite identificar poblaciones de células cuya membrana tiene unas características estructurales homogéneas, que se ponen de manifiesto mediante la formación de rosetas de látex. La diferencia en las proporciones de estas poblaciones entre células normales y de LLC, ya es un índice de anormalidad.

El segundo experimento supone un método más complejo, pero da una idea más exacta de la composición de la membrana en la totalidad de las células. Hay una variación progresiva en la composición de la membrana a lo largo del período de maduración celular (1, 14), por consiguiente los resultados de este segundo experimento, referidos al valor medio en la totalidad de las células, suponen un reflejo más claro de la distribución de los receptores glicoproteicos en la membrana de ambos tipos de células.

Resumen

Se utilizan ocho lectinas para estudiar posibles alteraciones en la membrana de linfocitos de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC). Mediante rosetas con bolas de látex recubiertas de lectina, se han comparado los porcentajes de linfocitos B normales y leucémicos con abundancia de receptores lectínicos. Reuniendo estos datos con el número de moléculas de lectina ligadas por célula y la afinidad, valores calculados con I^{23} -lectinas, se han deducido posibles diferencias en la composición de las glicoproteínas de membrana de los linfocitos B normales y de LLC. Los LLC mostraron menor número de receptores de WGA y mayor de *Lens culinaris*, SBA y *Tetragonolobus purpureus*, no apreciándose diferencias significativas con Concanavalina A, *Pisum sativum* y *Dolichos biflorus*. Las lectinas *Pisum sativum*, PHA y *Tetragonolobus purpureus* expresaron mayor afinidad con linfocitos B normales y el resto con los de LLC. Las lectinas, por consiguiente, han resultado útiles para establecer un estudio comparativo de la composición y estructura de las glicoproteínas de la membrana de linfocitos B de sujetos normales y de pacientes con leucemia linfática crónica.

Bibliografía

1. ASTALDI, G., OZGER-TOPUZ, U., NERI, A. e IACOPINO, P.: *Boll. ist. Sieroter. Milanese*, **59**, 256-274, 1980.
2. AUGENER, W., COHEN, G. y BRITTINGER, G.: *Biomedicine*, **21**, 6-8, 1974.
3. BANDERET, E. y DESPONT, J. P.: *Int. Arch. All. Immunol.*, **61**, 1-8, 1980.
4. BIANCO, C., PATRICK, R. y NUSSENZWEIG, V.: *J. Exp. Med.*, **132**, 702-720, 1970.
5. BOYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 77-80, 1968.
6. BRODY, J. I., OSKY, F. A. y SINGER, D. E.: *Blood*, **34**, 421-430, 1969.
7. DE DIOS, I., MANSO, M., MARTÍN, M. y LÓPEZ-BORRASCA, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **40**, 19-24, 1984.
8. HILDEBRAND, J., MARIQUE, D. y VAN-
HOUCHE, J.: *J. Lip. Res.*, **15**, 195-201, 1975.
9. HILDEBRAND, J., STRYCKMANS, P. y STOF-
FYN, P.: *J. Lip. Res.*, **12**, 351-357, 1971.
10. HOLT, P. J. L., PAL, S. G. y CATOVSKY,
D.: *Clin. Exp. Immunol.*, **10**, 555-562,
1972.
11. KAPLAN, M. E. y CLARK, C.: *J. Immunol.
Meth.*, **5**, 131-134, 1974.
12. KORNFELD, S.: *Biochim. Biophys. Acta*,
192, 542-548, 1969.
13. MAJERUS, P. W. y BRODIE, G. N.: *J. Biol.
Chem.*, **247**, 4253-4261, 1972.
14. RICHARD, Y., BOUNSELLE, L., LEMERLE, J.,
VALENSI, F. y BERNARD, A.: *Leuk. Res.*,
6, 307-312, 1982.
15. ROSS, G. D., RABELLINO, E. M. y POLLEY,
M. J.: *J. Clin. Invest.*, **52**, 377-386, 1973.
16. SPECKART, S. F., BOLDT, D. H. y McDER-
MOTT, R. P.: *Blood*, **52**, 681-694, 1978.
17. STATHOPOULOS, A. y ELLIOT, E. V.: *Lan-
cet*, **1**, 600-602, 1974.
18. STECK, T. L. y WALLACH, D. F. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 510-522, 1965.
19. ZALEWSKI, P. D., FORBES, I. J., UHLEN-
BRUCK, G. y VALENTE, L.: *Clin. Exp. Im-
munol.*, **4**, 304-314, 1982.