

Estudio comparativo sobre seis procedimientos de aislamiento de linfocitos de mamíferos y determinación de su composición glucídica *

P. Hueso y M. Rocha

Departamento Interfacultativo de Bioquímica
Facultades de Ciencias y Farmacia
Universidad de Salamanca y C.S.I.C.
Salamanca (España)

(Recibido el 21 de diciembre de 1977)

P. HUESO and M. ROCHA. *Comparative Study of Six Methods for Lymphocyte Isolation From Several Mammalian Sources and Determination of Their Carbohydrate Composition*. Rev. esp. Fisiol., 34, 339-344. 1978.

The present paper deals with a comparative study on six methods for isolation of peripheral blood lymphocytes from various mammalian sources: *Bos taurus* L. (adult cow), *Equus caballus* L. (adult horse), *Equus asinus* L. (adult and young donkeys) and *Sus scropha* L. (adult pig). The following systems were used: a) Filtration through sand columns (a modification of BLASZCZYŹYŹN's method); b) Sodium metrizoate and «Ficoll 400»; c) «Lymphoprep»; d) «Urovicon» and dextran T150 (a modification of GILI *et al.*'s method); e) «Urografin» and dextran T150; f) «Ficoll-Paque». The final preparation of lymphocytes obtained by «Urovicon» and dextran T150 ($d = 1.081$) procedure was free from platelets and erythrocytes; lymphocytes degree of purity was found to be 98 %. The sialic acids, hexoses and hexosamines contents were determined.

Las técnicas de aislamiento de linfocitos de sangre periférica se pueden clasifi-

* Una nota preliminar sobre este trabajo ha sido presentada en forma de comunicación a las XII Jornadas Bioquímicas Latinas celebradas en Bordeaux (Francia) del 31 de mayo al 3 de junio de 1976 y publicada con el número A44 en el volumen de resúmenes.

Trabajo realizado mediante Ayuda para el «Fomento de la Investigación en la Universidad» concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia a este Departamento.

car en dos grupos: *a*) Las basadas en la adherencia de granulocitos y monocitos a lana de vidrio (6, 8); lana de nylon (8, 9, 15, 17); o arena (3). *b*) Las basadas en la acción de un sistema separador constituido por mezclas de ciertos tipos de moléculas orgánicas (solución acuosa de sales del ácido metrizoico y similares) y polímeros glucídicos (dextrano, «Ficoll»), que incrementan la capacidad de agregación de los eritrocitos así como la de sedimentación de granulocitos y monocitos de la sangre. En estos métodos la sangre se diluye en la

proporción de 1:1 (v/v) con una solución salina isotónica, generalmente ClNa al 0,9 %, y se deposita cuidadosamente sobre el sistema separador evitando que se mezclen las dos fases (2, 5, 10, 11, 14, 19).

A excepción de las numerosas publicaciones relativas al aislamiento de linfocitos humanos, de ganado porcino y, en menor proporción, de los ganados bovino (4) y caballar (13), es escasa la bibliografía referente al aislamiento de linfocitos de sangre periférica de mamíferos. En este trabajo se presentan los resultados acerca del aislamiento de linfocitos de una pro-

cedencia no ensayada anteriormente, *Equus asinus* L. (asno, adulto y joven), y los referentes a otras especies ya estudiadas por algunos autores, pero aplicando técnicas distintas a las seguidas por nosotros. Por otra parte, son escasos los trabajos sobre la composición química de los linfocitos, excepto en el caso del hombre y del ganado porcino. Debido a ello, se han determinado los principales constituyentes de la fracción glucídica de linfocitos de cerdo, vaca, caballo y asno (adulto y joven) y se ha efectuado un estudio comparativo de los mismos.

Tabla I. *Aislamiento de linfocitos de mamíferos: Métodos usados.*

Sistema	Referencia	Modalidad	Proceso
a) Arena	(3)	A	Eliminación de eritrocitos con reactivo particular para cada especie (16).
		B	Se pasan a través de la columna 5 g de leucocitos (obtenidos según ROCHA, <i>et al.</i> (16) resuspendidos en ClNa al 0,9 %).
b) Metrizoato sódico y «Ficoll 400»		A	Se coloca cuidadosamente la sangre diluida sobre esta mezcla.
		B	Los leucocitos (obtenidos como se indica antes) resuspendidos en ClNa al 0,9 % se colocan cuidadosamente sobre este gradiente.
c) «Lymphoprep»		A	Ambas modalidades se realizaron como se describe en el método anterior.
d) «Urovison» y dextrano T150	(10)	B	Como anticoagulante se usó ACD (fórmula A) en lugar de defibrinación mecánica. Se ensayaron tres densidades diferentes de sistema separador: 1,074, 1,081, 1,085 g/ml. Los linfocitos se lavan con ClNa al 0,9 %.
e) «Urografin» y dextrano T150			Se operó como se describe para el método anterior.
f) «Ficoll-Paque»		A	La sangre se diluyó con una solución compuesta por 1 volumen de (D-glucosa anhidra 0,1 %; $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $5,0 \times 10^{-5}$ M; $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $9,8 \times 10^{-4}$ M; ClK , $5,4 \times 10^{-3}$ M; Tris, 0,145 M, tamponado con ClH 1N hasta pH 7,6) y 9 volúmenes de ClNa 0,14 M; (v/v) sangre/solución de equilibrio.
		B	Se operó como se describió para el método b).
	(14)	C	Los leucocitos se obtuvieron como se describe anteriormente.

Material y métodos

Animales. Se utilizó sangre periférica de las siguientes especies: *Bos taurus* L. (vacuno adulto), *Equus caballus* L. (caballo adulto), *Equus asinus* L. (asno, adulto y joven) y *Sus scropha* L. (cerdo adulto). Las muestras fueron recolectadas inmediatamente después de ser sacrificado el animal, sobre diversos anticoagulantes: a) ACD (ácido cítrico dihidrato, 0,8 g; citrato sódico dihidrato, 2,2 g; glucosa anhidra, 2,26 g; agua destilada c.s.p. 100 ml; b) heparina (10 UI/ml); c) citrato sódico (1 g/l).

Productos. Dextranos T150, T250, T500; «Ficoll 400», «Ficoll-Paque», suministrados por la casa Pharmacia (Uppsala). Metrizoato sódico [sal sódica del ácido 3-acetamido-2,4,6-trioyo-5-(N-metilacetamido)-benzoico] y «Lymphoprep», proporcionados por Nyegaard & Co., A/S (Oslo). «Urovicon» y «Urografin», de Schering AG (Berlín). Reactivos de uso corriente en laboratorio. Todos los reactivos están catalogados como productos de garantía analítica.

Aislamiento de linfocitos. Los métodos ensayados para el aislamiento de los linfocitos quedan resumidos en la tabla I.

Determinaciones bioquímicas. Los linfocitos obtenidos utilizando como sistema separador «Urovicon» y dextrano T150, de densidad = 1,081 g/ml, fueron congelados a -20°C , durante un período de 4-6 días.

Para valorar el contenido en ácidos siálicos, osas y osaminas, los linfocitos fueron descongelados, resuspendidos en 0,5 ml de C1Na al 0,9 % y homogeneizados con 30 golpes de Potter; de estos homogenizados se tomaron las muestras para los diferentes ensayos. Se realizaron hidrólisis y valoraciones, de un modo paralelo, en los materiales de las cuatro procedencias, con objeto de obtener resulta-

dos que pudieran ser comparados posteriormente. Las hidrólisis y valoraciones para ácidos siálicos, osas y osaminas fueron llevadas a cabo según han descrito CABEZAS *et al.* (7).

Las proteínas se determinaron por el método de LOWRY *et al.* (12) usando se-roalbúmina bovina como patrón.

Resultados y discusión

Los mejores resultados para el aislamiento de linfocitos se obtuvieron empleando como anticoagulante ACD en la proporción: 165 ml ACD/835 ml sangre (tabla II).

Cuando se utilizó el método de filtración a través de columnas de arena, los resultados no fueron satisfactorios. Con la modalidad A sólo se logró enriquecer ligeramente la suspensión en linfocitos; con la B, se logró un 81 % de pureza.

En la aplicación de las restantes técnicas se consiguieron mejores resultados cuando se sometió la sangre total al efecto del sistema separador empleado en cada una de ellas (modalidad A), que cuando el material de partida fue una suspensión de leucocitos (modalidad B).

En general, los mejores rendimientos se han conseguido utilizando como sistemas separadores «Lymphoprep» y «Urovicon» + dextrano T150. La mezcla «Urovicon» + dextrano T150 se ha ensayado a tres densidades diferentes: 1,074, 1,081 y 1,085 g/ml, obteniéndose el mayor grado de pureza de los linfocitos cuando la densidad empleada fue 1,081 g/ml.

En el caso de los linfocitos de caballo, obtenidos por los diferentes métodos, el grado de pureza nunca llegó a superar el 86 %. El elevado número de polimorfonucleares contaminantes encontrados parece estar relacionado con el tipo de caballos (sacrificados por accidentes) que fueron usados en estos experimentos.

En el estudio comparativo de la fracción glucídica se han utilizado los linfocitos obtenidos mediante el empleo de

Tabla II. *Diferentes métodos de aislamiento*
Valor medio de cinco
 Los resultados vienen expresados en % de células sobre el total

		Cerdo adulto			adulto		
		L	M	G	L	M	G
A Arena	A	49,5±0,1	1,0±0,01	49,5±0,02	50,6±0,2	1,6±0,01	47,8±0,03
	B	81,5±0,4	3,5±0,01	15 ±0,01	80,2±0,2	7,2±0,01	12,6±0,02
a Metrizoato sódico + «Ficoll 400»	A	95,5±0,5	3,7±0,02	0,8±0,02	91,0±0,3	4,5±0,02	4,5±0,01
	B	87,3±0,4	4,0±0,01	8,7±0,01	91,2±0,3	3,6±0,01	5,2±0,02
b «Lymphoprep»	A	98,2±0,6	1,3±0,01	0,5±0,01	92,6±0,1	2,2±0,01	5,2±0,02
	B	96,0±0,2	2,5±0,01	1,5±0,01	92,9±0,3	4,6±0,01	2,5±0,01
c «Urovison» + dextrano T150	d=1,074	97,0±0,3	1,0±0,00	2,0±0,00	90,3±0,1	2,7±0,03	7,0±0,03
	d=1,081	98,0±0,2	0,5±0,01	1,5±0,01	94,5±0,3	3,8±0,01	1,7±0,01
	d=1,085	95,6±0,3	2,1±0,02	2,3±0,01	90,8±0,1	2,6±0,02	6,6±0,02
d «Urografin» + dextrano T150	d=1,081	95,0±0,3	4,0±0,01	1,0±0,00	92,8±0,2	2,0±0,00	5,2±0,02
e «Ficoll-Paque»	A	96,0±0,2	1,0±0,01	3,0±0,02	95,4±0,4	2,6±0,02	2,0±0,01
	B	90,9±0,3	4,0±0,00	5,1±0,03	91,6±0,1	3,1±0,02	5,3±0,01
	C	82,4±0,2	5,6±0,02	12,0±0,04	84,6±0,4	6,3±0,02	9,9±0,03

-- = No determinado (los valores no determinados son debidos a que en trabajos anteriores realizados previo para el aislamiento de

Tabla III. *Estudio comparativo de la fracción glucídica en linfocitos de las diferentes especies.*

Valor medio de seis determinaciones ± desviación estándar.

Procedencia	Ácidos siálicos		Osas		Osaminas		Total fracción glucídica
	µg/mg prot.	nmoles/mg prot.	µg/mg prot.	nmoles/mg prot.	µg/mg prot.	nmoles/mg prot.	µg/mg proteína
Asnal adulto	11,9±1,6	40,6	34,5±3,0	191,4	10,2±0,8	47,3	56,6±5,6
Asnal joven	19,1±1,5	65,2	67,2±3,2	372,9	19,1±0,6	88,6	105,4±5,5
Porcina	14,0±1,1	47,8	54,9±2,8	304,6	7,8±0,7	36,2	76,7±6,2
Caballar	17,3±1,8	59,0	50,3±3,6	279,1	12,6±0,7	58,4	80,2±6,2
Vacuno	20,4±0,9	69,6	42,9±3,1	238,6	7,1±0,9	32,9	70,4±5,7

Prot. = proteína.

de linfocitos y rendimientos obtenidos.

de terminaciones $\pm$ desviación estándar.

de leucocitos. L = linfocitos; M = monocitos; G = granulocitos.

Asno			Caballo adulto			Vacuno adulto		
joven								
L	M	G	L	M	G	L	M	G
49,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,00	49,5 $\pm$ 0,03	42,4 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,01	56,2 $\pm$ 0,02	—	—	—
78,9 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,01	18,3 $\pm$ 0,02	67,6 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,01	24,6 $\pm$ 0,02	—	—	—
94,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,01	3,5 $\pm$ 0,02	86,4 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,02	7,1 $\pm$ 0,01	96,0 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,02
90,8 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,01	5,8 $\pm$ 0,01	85,3 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,01	11,5 $\pm$ 0,02	—	—	—
95,0 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,01	85,5 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,01	10,0 $\pm$ 0,01	95,6 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,02	2,6 $\pm$ 0,02
92,1 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,01	6,7 $\pm$ 0,02	84,4 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,01	9,5 $\pm$ 0,01	—	—	—
92,9 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,02	85,5 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,01	11,9 $\pm$ 0,03	94,5 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,01	3,0 $\pm$ 0,00
94,5 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,02	1,4 $\pm$ 0,01	86,2 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,02	10,2 $\pm$ 0,02	95,6 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,02	1,9 $\pm$ 0,01
93,5 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,01	5,1 $\pm$ 0,01	85,5 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,01	10,4 $\pm$ 0,02	97,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,00	1,5 $\pm$ 0,01
88,6 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,02	4,2 $\pm$ 0,01	84,6 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,01	10,4 $\pm$ 0,01	96,0 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,02
93,3 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,02	4,6 $\pm$ 0,03	86,6 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,03	11,4 $\pm$ 0,03	93,7 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,02	3,6 $\pm$ 0,03
92,6 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,01	5,1 $\pm$ 0,03	76,5 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,01	15,5 $\pm$ 0,02	—	—	—
93,6 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,02	8,3 $\pm$ 0,01	81,3 $\pm$ 0,5	9,3 $\pm$ 0,01	9,4 $\pm$ 0,02	—	—	—

1 este Departamento no se ha logrado aislar leucocitos de esta especie con suficiente grado de pureza, paso a linfocitos según estas modalidades).

«Urovison» y dextrano T150 (de densidad = 1,081 g/ml) como sistema separador, debido no sólo al elevado grado de pureza de los linfocitos obtenidos con este método sino también a su mayor economía (tabla III). El menor contenido en ácidos siálicos corresponde a la especie *E. asinus* (asno), siendo el más elevado el de la especie *B. taurus* (vacuno adulto). En *E. asinus* se aprecian también diferencias con la edad, siendo los valores más altos los hallados en ejemplares jóvenes respecto a los adultos, diferencia ya acusada por ROCHA *et al.* (16) en leucocitos de la misma especie. Los valores hallados son semejantes a los determinados por otros autores (1) en membranas plasmáticas de linfocitos de cerdo.

La menor concentración en osas corres-

ponde a la especie *E. asinus* (asnal, adulto) y la mayor a la misma especie, en animales jóvenes. Los valores hallados de osaminas indican también diferencias dependientes de la especie y la edad.

La fracción glucídica total, obtenida al sumar las concentraciones de ácidos siálicos, osas y osaminas oscila entre 56,6 (asno adulto) y 105,4 (asno joven) μ g glúcido/mg proteína. Se han encontrado pocos valores que permitan una comparación con los anteriormente señalados, a causa de la escasez de datos que hay sobre estas especies. ROCHA *et al.* (16) obtienen valores algo inferiores, comprendidos entre 40 y 57 μ g/mg proteína, para la fracción glucídica de leucocitos de estas mismas especies. SMITH *et al.* (18) encuentran cifras similares a las aquí indicadas

en un material diferente (membranas plasmáticas de linfocitos de timo y bazo de ratas).

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al profesor José A. Cabezas por sus valiosas indicaciones y asesoramiento durante el desarrollo del presente trabajo. También queremos dar las gracias a los empleados del Matadero Municipal de Salamanca que nos proporcionaron desinteresadamente las muestras de sangre, así como a doña Rosario Reglero por su trabajo de secretariado.

Resumen

Se han aislado linfocitos de sangre periférica de *Bos taurus* L. (vacuno adulto), *Equus caballus* L. (caballo adulto), *Equus asinus* L. (asno, adulto y joven) y *Sus scropha* L. (cerdo adulto) utilizando: a) Filtración a través de columnas de arena (modificación del método de BLASZCZYSZYN); b) Metrizoato sódico y «Ficoll 400»; c) «Lymphoprep»; d) «Urovison» y dextrano T150 (modificación del método de GILI *et al.*); e) «Urografin» y dextrano T150; f) «Ficoll-Paque». Los linfocitos obtenidos utilizando «Urovison» y dextrano T150 se obtuvieron libres de plaquetas y con una pureza del 98 %. Se ha valorado el contenido en ácidos siálicos, osas y osaminas de los linfocitos de las citadas especies.

Bibliografía

1. ALLAN, D. y CRUMPTON, M. J.: *Biochem. J.*, **120**, 967-975, 1971.
2. ANDERSON, L. C., SMITH, Q. T. y SHAPIRO, B. L.: *Clin. Chim. Acta*, **73**, 63-65, 1976.
3. BLASZCZYSZYN, M.: Organisation des Laboratoires, Biologic Prospective, 5.º Colloque de Pont-A-Mousson; l'Expansion Scientifique Française, editeur. 1972.
4. BLÜTTMAN, H.: *Eur. J. Biochem.*, **70**, 233-240, 1976.
5. BÖYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 51-76, 1968.
6. BRANDT, L., BÖRJESSON, J., NORDEN, A. y OLSSON, I.: *Acta Med. Scand.*, **172**, 459-462, 1962.
7. CABEZAS, J. A., VÁZQUEZ, J., FROIS, M. D., MARINO, C. y ARZÚ, A. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 318-325, 1964.
8. CZERSKI, P., SZMIGIELSKI, S. y LITWIN, J.: *Vox sang.*, **11**, 734-737, 1966.
9. GATES, R. E., PHILLIPS, D. R. y MORRISON, M.: *Biochem. J.*, **147**, 373-376, 1975.
10. GILI, C., SALA, P. y AMISANO, G.: *Laboratorio*, **60**, 545-549, 1975.
11. HALLAK, G. J. y WILKINSON, H.: *Clin. Chim. Acta*, **66**, 251-261, 1976.
12. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
13. MEYER, J. y BARTLET, G. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **230**, 487-494, 1971.
14. PARKES, A. B. y BRADLEY, D. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 527-533, 1974.
15. RICHARD, G., BETUEL, H. y COLOBERT, L.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**, 1085-1094, 1969.
16. ROCHA, M., CABEZAS, M. y CABEZAS, J. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **60 B**, 239-244, 1978.
17. ROOS, D. y LOOS, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 565-582, 1970.
18. SMITH, W. J., LADOULIS, CH. T., MISRA, D. N., GILL, T. J. y BAZIN, H.: *Biochim. biophys. Acta*, **382**, 506-525, 1975.
19. THORSBY, E. y BRATLIE, A.: En «Histocompatibility Testing» (Terasaki, P. I., ed.). Munksgaard. Copenhagen, 1970, págs. 655-656.