



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
UNIDAD DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“VALORES DE REFERENCIA DE LAS
SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T (CD3, CD4
Y CD8) EN DONADORES SANOS DEL BANCO DE
SANGRE DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGIA”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A :
ROSSANA DELFIN HIERRO

TUTOR: DR. JUAN R. LABARDINI MENDEZ

MEXICO, D. F.

1999

DELFIN_HIERRO_ROSANA



QUIMICA
D.E.PG.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico esta especialidad, esta tesis y mi crecimiento de
cada día en estos dos años y cuatro meses a mi Abuelita,
que estuvo presente e mi corazón
a cada momento a pesar de
su ausencia física.

Te quiero mucho Bilu.

Rossana.

AGRADEZCO...

A mi mamá, por la confianza que depositó en mí para la realización de la Especialidad y por el cariño incondicional que me muestra siempre. Te quiero mucho.

A mi papá, por el apoyo y confianza que tuvo en mí para poder culminar esta realización académica. Te quiero mucho.

A mi hermana, Verónica por el cariño y apoyo que me ha mostrado en este tiempo que estuve fuera de la casa y a mi hermano Nacho por la amistad y cariño que me ha dado en este tiempo que hemos estado compartiendo aquí en México y por las gráficas para la realización de esta tesis. Los quiero mucho.

A mi tía Rosy, por el apoyo para la realización de esta especialidad y el interés para que todo estuviera bien. Te quiero mucho.

Al Dr. Juan R. Labardini Méndez, por sus clases y asesoramiento para realizar esta especialidad y por compartir sus enseñanzas y experiencias conmigo.

Al Dr. Raúl Izaguirre Avila, por la confianza que depositó en mí para la realización del estudio en el Instituto Nacional de Cardiología en el área de coagulación con pacientes de la clínica de anticoagulantes y su asesoramiento para la realización de esta tesis. Y al personal a su cargo en este instituto por las enseñanzas brindadas.

A la Dra. Patricia Baz Gutiérrez, por el apoyo brindado para la realización de esta especialidad en mi estancia por el Instituto Nacional de Cancerología.

A la Química Eva Hilda González López y a la Dra. Victoria Valles, por sus enseñanzas y conocimientos compartidos para una realización académica, profesional y personal.

Al Dr. Rogelio Paredes Aguilera y a la Química Lina Romero, por su asesoramiento para la realización de esta tesis.

A las maestras Dolores Lastra y Magdalena Oliva (q.e.p.d.), por la confianza depositada y el apoyo brindado para la realización de esta especialidad.

A la Dra. Isabel Zeichner Gancz, por la asesoría estadística para la realización de la base de datos y la obtención de los valores de referencia.

A la Química Ma. Aurora Acosta Barreda, por compartir conmigo sus conocimientos, brindarme su amistad y apoyo incondicional para la realización de esta tesis y la especialidad.

A la Bióloga Guadalupe Cervantes Vázquez, por sus enseñanzas, amistad, apoyo y consejos para la realización de esta tesis y la especialidad.

A la Química Patricia Montoya Pérez, por su amistad, consejos, apoyo y confianza para una realización personal.

A las Biólogas Mayté y Mary, del área de citogenética, por su amistad, confianza y sus enseñanzas acerca del área.

A la Química Celia del laboratorio del Instituto Nacional de Nutrición, por su confianza y apoyo brindado en mi estancia por ese laboratorio.

Al Dr. Ernesto Miranda, por el apoyo, amistad y conocimientos brindados en mi estancia por el Instituto Nacional de Cancerología, para una realización académica.

Al Q.C. Gustavo Vázquez Salas, por su amistad y compañerismo en la realización de esta especialidad,

A mi prima y amigos, Maye, Alejandra y Toño, que estuvieron conmigo brindándome su apoyo y amistad en nuestras reuniones en la casa donde siempre serán bienvenidos. Gracias por todo. Suerte. Los quiero mucho.

A la Dra. Rita Jefe del Banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología, químicos, técnicos y enfermeras, por el apoyo brindado para la realización del muestreo de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Cervera Ceballos, jefe del laboratorio clínico del Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

Al Químico Alejandro, a Juan Carlos y Andrés, por la amistad y conocimientos brindados e mi rotación por el área de hematología.

A los chicos del área de cómputo del Instituto Nacional de Cancerología, Alejandro, Mirna, Lety y Rubén, por el apoyo y amistad brindados para la realización de esta tesis.

A Tere, Elizabeth, Ricardo y Alfredo, por su amistad en mi estancia en el laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología.

A la Química Chelo, a Delfina, Adriana, Bety y Jose, del área de bacteriología y parasitología, por su amistad.

A la Química Blanca, a Saúl y David, por las enseñanzas brindadas en mi rotación por el área de marcadores tumorales.

A todos ustedes, les agradezco lo que me han brindado de todo corazón.

INDICE

	Pag.
Introducción.....	1
Capítulo I. Marco teórico.	
- I.1. Hematopoyesis. Estructura y función de los órganos hematopoyéticos.....	2
- I.2. Desarrollo y diferenciación de los linfocitos T.....	20
- I.3. Función y estructura de los linfocitos T.....	26
- I.4. Métodos de medición de linfocitos por sus marcadores de superficie.....	35
Capítulo II. Parte experimental.	
- II.1. Selección del donador.....	39
- II.2. Material y reactivos empleados.....	41
- II.3. Metodología.....	44
- II.4. Manejo del equipo.....	46
Capítulo III. Resultados.....	57
Discusión.....	61
Conclusiones.....	63
Bibliografía.....	64

INTRODUCCIÓN.

Uno de los avances recientes en el diagnóstico inmunológico ha sido el uso de la instrumentación de citometría de flujo por fluorescencia, la cual combina muchos nuevos desarrollos en láser, óptica, fluidos y tecnología electrónica con el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra antígenos celulares. Mientras la ganancia de esta innovación no ha sido completamente realizada, el impacto es mayor.

La citometría de flujo con anticuerpos monoclonales ha permitido la identificación y cuantificación de subgrupos de las mayores poblaciones de linfocitos y de subdivisiones que difieren en función biológica, estado de maduración y activación, siendo posible la caracterización adicional posible. Esta tecnología provee una capacidad analítica y una reproducibilidad que no estaban previamente disponibles.

La citometría de flujo por fluorescencia activada está empezando a establecerse en la evaluación de rutina del sistema inmune en cualquier enfermedad, donde los desórdenes inmunes podrían estar involucrados. Estos incluyen enfermedades de deficiencia inmune de todos los tipos y particularmente el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades autoinmunes y situaciones tales como trasplantes, en los cuales existe inmunosupresión. Esto también es importante en la evaluación de enfermedades neoplásicas del sistema linfóide y muy semejante, podría ser de rutina en otras enfermedades neoplásicas, para evaluar cambios reactivos en el sistema inmune o efectos colaterales por agentes quimioterapéuticos. Cambios numéricos y en maduración, podrían reflejar alteraciones significativas en el sistema inmune.

Una de las consecuencias del rápido desarrollo en este terreno, ha dado lugar a la existencia de una gran variedad de nombres y términos. En un esfuerzo de establecer una nomenclatura estandarizada para la población linfóide, un comité internacional ha recomendado una terminología basada en grupos de diferenciación (cluster of differentiation, CD).

En el Instituto Nacional de Cancerología, se atiende a pacientes que son portadores del virus de inmunodeficiencia adquirida, pacientes transplantados y pacientes que presentan sintomatología de probable enfermedad neoplásica. A los primeros se les realizan análisis de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3, CD4 y C8) por citometría de flujo, por lo cual existe la necesidad de unos valores de referencia para poder determinar el grado de inmunosupresión en el que se encuentran los pacientes.

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO.

I.1. HEMATOPOYESIS. Estructura y función de los órganos hematopoyéticos.

Hematopoyesis (poiesis = formación) es el termino usado para describir la formación y desarrollo de las células sanguíneas. Proliferación, diferenciación y maduración celulares tienen lugar en el tejido hematopoyético, que es en su mayor parte la médula ósea. Sólo células maduras pasan a la sangre periférica. El enlace entre la médula ósea y la producción de las células sanguíneas no se había establecido hasta que se reconoció a la formación de la sangre como un proceso continuo. Antes de 1850 se creía que las células sanguíneas formadas en el feto eran viables hasta la muerte del individuo y que no era necesaria una fuente continua de elementos nuevos. (1)

I.1.1. Tejido hematopoyético.

El sistema hematopoyético incluye a los tejidos y órganos que intervienen en la proliferación, maduración y destrucción de las células sanguíneas. Estos órganos y tejidos comprenden al sistema fagocítico mononuclear, bazo, ganglios linfáticos, timo, hígado y médula ósea. (1)

I.1.2. Localización y desarrollo de la hematopoyesis.

El óvulo fecundado o cigoto es una célula totipotencial, lo que significa que es capaz de diferenciarse hacia cualquier célula del organismo aunque ella misma no manifieste ninguna de las características morfológicas, bioquímicas o funcionales de las células maduras o diferenciadas a las que dará origen; el cigoto, por lo tanto es una célula indiferenciada y a la vez totipotencial.

Durante las primeras divisiones celulares, posiblemente hasta la etapa de 6 u 8 células, cada célula conserva aún toda su potencialidad; de hecho, si por algún fenómeno anormal se separan en esta etapa, cada una es capaz de dar origen a un individuo completo, siendo éste el origen de los gemelos idénticos.

A medida que se desarrolla el embrión las células empiezan a mostrar características morfológicas diferentes (se empiezan a diferenciar), disponiéndose primero en dos capas, una externa, el ectodermo y una interna, en endodermo, y agregándose posteriormente una tercera situada entre ambas, el mesodermo.

Las células ectodérmicas pueden dar origen diferenciándose gradualmente a varios tipos de células cutáneas y del sistema nervioso central y periférico, pero ya no pueden diferenciarse hacia otros tejidos; aunque todavía son células pluripotenciales o multipotenciales, ya no son totipotenciales. De la misma manera las células endodérmicas son capaces de diferenciarse hacia el hígado, páncreas y diversos tejidos del tubo digestivo y del aparato respiratorio, sin embargo no pueden dar origen a células nerviosas o cutáneas; también estas células son pluripotenciales pero no totipotenciales. Por último, las células mesodérmicas pueden diferenciarse gradualmente hacia

células del tejido conectivo, como fibroblastos, osteoclastos y condroblastos, hacia células musculares, endoteliales o mesoteliales, y hacia células hematopoyéticas. (2)

La célula hematopoyética más primitiva –llamada célula tronco hematopoyética o célula progenitora hematopoyética (CTH, CPH)-, aunque con menor potencialidad que una célula mesodérmica pues ya no puede diferenciarse hacia células del tejido conectivo o hacia células musculares, sigue siendo una célula pluripotencial o multipotencial en el sentido que puede dar origen a varias estirpes celulares: los eritrocitos, las plaquetas y los diferentes tipos de leucocitos.

La hematopoyesis comienza desde el decimonoveno día después de la fertilización a partir de las células tronco hematopoyéticas derivadas del mesodermo del saco vitelino. En este primer momento la hematopoyesis se lleva a cabo en la luz de los vasos sanguíneos, formándose exclusivamente elementos de serie roja. (2) En ese periodo, la producción celular se llama eritropoyesis primitiva debido a que los eritroblastos y la hemoglobina no son típicos como los que se observan más adelante. Los eritrocitos embrionarios tienen aspecto megaloblástico con una cromatina conglomerada en forma masiva. La hemoglobina de estas células pertenece a las variedades embrionarias, Gower 1, Gower 2 y Portland. La formación de leucocitos y plaquetas (mielopoyesis y megacariopoyesis) comienza en el hígado; pero no se considera significativa hasta la aparición de la hematopoyesis en la médula ósea. (1)

Las células tronco del saco vitelino pueden diferenciarse hacia otros elementos hematopoyéticos distintos de los eritroides cuando se exponen a los factores de crecimiento apropiados; en el saco vitelino, sin embargo, no se encuentran granulocitos, posiblemente por la acción moduladora local de sustancias tales como el Factor Transformante de Crecimiento beta (Transforming Growth Factor-beta, TGF- β) que inhibe la maduración granulocítica.

Las células del saco vitelino no son sensibles a la eritropoyetina, aunque requieren de Factor de Crecimiento de Células Tronco (Stem Cell Factor, SCF), que se encuentra presente localmente, para su proliferación. (2)

A partir de la semana 6 se encuentran también megacariocitos en el saco vitelino, además de células eritroides. Alrededor de la semana 11 termina la hematopoyesis en el saco vitelino, aunque previamente ya se ha iniciado en otros órganos.

La eritropoyesis se inicia en el hígado durante la sexta semana de gestación, a partir de células tronco derivadas del saco vitelino que lo colonizan. Este órgano es el principal productor de eritrocitos entre las semanas 9 a 24. A diferencia de la eritropoyesis del saco vitelino, la del hígado es extravascular y las células maduras deben atravesar la pared de los sinusoides hepáticos para entrar a la circulación.

Alrededor de la semana 7 ya son detectables en el hígado las células formadoras de colonias eritrocíticas (CFC-E) y las células formadoras de brotes eritrocíticos (CFB-E), que son precursores eritrocíticos sensibles a eritropoyetina; tres semanas después, en la semana 10, el hígado mismo empieza a formar eritropoyetina en respuesta a la hipoxia.

La eritropoyesis se observa también en la médula ósea desde la semana 11 y a partir de la semana 24 este órgano es el sitio principal de hematopoyesis. La hematopoyesis medular se origina también de células tronco que provienen originalmente del saco vitelino.

La granulopoyesis se inicia en el hígado alrededor de la semana 7 y en la médula ósea alrededor de la semana 11, siendo más intensa en la médula. En el segundo trimestre de la gestación ya se pueden identificar en el hígado y en la médula ósea las células formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (CFC-GEMM) y las células formadoras de colonias de granulocitos y monocitos (CFC-GM).

A las 6 semanas de gestación aproximadamente al mismo tiempo que en el saco vitelino aparecen megacariocitos en el hígado; estas células se empiezan a observar en la médula ósea en la

semana 13. Adicionalmente en el feto existe hematopoyesis, aunque en menor grado, en los tejidos conectivos, los riñones, el timo, los ganglios linfáticos y el bazo.

A partir de la semana 24 la médula ósea toma el papel primordial en la eritropoyesis, en la granulopoyesis y en la megacariopoyesis, y permanece así durante el resto de la vida fetal. La hematopoyesis hepática va disminuyendo paulatinamente de tal forma que en el recién nacido a término prácticamente ya no existe más que hematopoyesis medular.

Normalmente esta situación persiste por toda la vida, sin embargo en casos en los que existe sustitución de la médula ósea por tejidos anormales (mieloptisis), el hígado, el bazo y otros tejidos pueden reasumir su papel hematopoyético. (2)

La hematopoyesis de la médula ósea se designa hematopoyesis medular, en tanto que la hematopoyesis extramedular es la producción de células sanguíneas en otros tejidos hematopoyéticos, en la vida posnatal refleja la propiedad de las células hematopoyéticas inertes de volverse activas si se requiere. (1)

La aparición de cavidades dentro del hueso ocurre en el humano en aproximadamente el quinto mes fetal, y estas cavidades rápidamente empiezan a ser sitio exclusivo de proliferación granulocítica y megacariocítica. La actividad eritropoyética en este momento es confinada al hígado y bazo, y no es hasta el final del último trimestre que el microambiente en la médula ósea empieza a producir eritroblastos. Al nacimiento, las cavidades del hueso son el único lugar de actividad hematopoyética y están completamente llenos con células hematopoyéticas. Consecuentemente, cualquier incremento en la producción celular llevaría a verter elementos de la médula ósea a la sangre, y la presencia de células inmaduras en la sangre de infantes no tiene la misma implicación como en un adulto. Tampoco existe la presencia de muchas células mononucleares pequeñas en la médula ósea de infantes y niños. En el recién nacido, el número relativo de estas células como linfocitos son muy bajos, pero dentro del primer mes surgen aproximadamente el 40%. Tal porcentaje es mantenido hasta la última infancia, cuando lentamente decrece a los valores del adulto de aproximadamente entre el 20 y 40%.

Por el cuarto año, una cantidad significativa de células grasas ha aparecido en la diáfisis de huesos largos. Este espacio ocupado por las células, lentamente reemplaza elementos hematopoyéticos y se expande hasta aproximadamente la edad de 10 años, cuando la médula ósea hematopoyética es encontrada únicamente en las vértebras, costillas, cráneo, pelvis y epifisis proximal de fémur, húmero y cresta iliaca. (3)

- Sistema fagocítico mononuclear.

Este sistema es un conjunto de monocitos y macrófagos, distribuidos en el espacio intravascular y extravascular, cuyas principales funciones son fagocíticas e inmunológicas. En el pasado, el término sistema reticuloendotelial (SRE) abarcaba a monocitos y macrófagos junto con células del endotelio vascular, reticulares, dendríticas y de los centros germinales linfáticos. El nuevo término, sistema fagocítico mononuclear, es más específico y comprende: 1) monocitos circulantes; 2) macrófagos fijos de médula ósea, hígado (células de Kupffer), bazo y ganglios linfáticos; y 3) macrófagos libres del bazo, ganglios linfáticos, pulmones, cavidades serosas y otros tejidos. Las células de este sistema se ocupan de fagocitar material particulado, proteínas desnaturalizadas y remover células decadentes o dañadas. Sus funciones en la inmunidad incluyen el procesamiento del antígeno para presentarlo a los linfocitos y la secreción de mitógenos para acelerar la activación y transformación linfocitaria. (1)

- Bazo.

Este órgano se ubica en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, bajo el diafragma y a la izquierda del estómago. Las funciones de este órgano fueron consideradas como un misterio en los primeros días de la medicina. Los intentos para descubrir su actividad condujeron a ideas como que su función era controlar las emociones, coadyuvar a la conservación de un hígado sano o mantener la simetría corporal. Después de haber practicado varias esplenectomías de urgencia sin causar lesión permanente a los enfermos, se reconoció que el bazo no era esencial para la vida. Extirpar el bazo también ha permitido aclarar su función como filtro discriminatorio. (1)

+ Arquitectura esplénica.

El bazo, circundado por una cápsula de tejido conjuntivo, contiene la colección mayor de linfocitos y fagocitos mononucleares del cuerpo. Estas células, dispuestas en un retículo, están concentradas en diferentes áreas del bazo y contribuyen a la formación de los tres tipos de pulpa (tejido dentro de la cápsula): pulpa blanca, pulpa roja y zona marginal. La porción media, dentada, del órgano (hilio) es donde vasos sanguíneos y nervios penetran a la pulpa. El tejido conjuntivo, que se prolonga al interior del órgano desde la cápsula (trabéculas), divide a la pulpa en compartimentos comunicantes.

La pulpa blanca (en su mayor parte linfocitos), es una zona blanca grisácea visible, compuesta de nódulos linfáticos y la vaina linfática periarterial. Dentro de los nódulos, hay centros germinales constituidos por una mezcla de linfocitos B, células reticulares y macrófagos. La vaina periarterial rodea a las arterias cuando entran al bazo y está llena de linfocitos T y macrófagos. En la pulpa blanca es en donde comienza la respuesta inmunitaria. En algunos casos en que la actividad inmunitaria está amplificada, la pulpa blanca puede aumentar hasta ocupar la mitad del volumen del órgano (en forma normal constituye 20% o menos). La pulpa blanca está circundada por una zona marginal reticular que contiene vasos sanguíneos, células libres e intersticios estrechos. Esta zona se observa en los puntos de unión de la pulpa roja y la blanca. La pulpa roja contiene espacios vasculares, senos y cordones. El color rojo es causado por la presencia de sangre. Los cordones están compuestos de masas de tejido reticular y macrófagos, que descansan entre los senos. (1)

+ Circulación sanguínea esplénica.

El bazo contiene un suministro rico de sangre, recibe 5% del gasto cardiaco total, esto es, un volumen de 300 ml/min. La sangre entra al bazo a través de la arteria esplénica, que se ramifica en forma profusa en las trabéculas. Los vasos pueden terminar en la pulpa blanca, pulpa roja o zona marginal. La sangre que entra al bazo puede tener un tránsito rápido (circulación cerrada) o lento (circulación abierta). El tránsito rápido sigue una vía relativamente sin obstrucción, donde la sangre entra a los senos de la pulpa roja desde las arterias y pasa en forma directa al sistema recolector venoso. Por el contrario, la sangre que entra a la vía de tránsito lento se mueve arrastrándose por un circuito tortuoso de cordones revestidos de macrófagos antes de ganar el acceso a los senos. El plasma en los cordones entra con libertad a los senos; pero los eritrocitos encuentran resistencia en la pared sinusal, de modo que son comprimidos para obligarlos a pasar a través de aberturas diminutas. Esta destilación del plasma de los cordones a los senos eleva en forma aguda el hematócrito en los cordones. El flujo sanguíneo lento y la actividad metabólica continua de los eritrocitos en los cordones hacen que el medio ambiente esplénico sea hipóxico, ácido e hipoglucémico. Los eritrocitos normales pueden tolerar este entorno nocivo breve y emerger sin daño. (1)

+ Funciones esplénicas.

La sangre que se vacía en la pulpa blanca y la zona marginal toma la vía de tránsito lento. Esta vía es muy importante para la función del bazo que incluye eliminación selectiva, "tamizaje" de eritrocitos seniles o dañados (propiedad del bazo de "quitar" partículas de los eritrocitos intactos sin destruirlos), defensa inmunitaria y almacenaje. Las células que entran al bazo por la vía de tránsito lento se concentran en los cordones hipoglucémicos, hipóxicos, un ambiente nocivo para los eritrocitos decadentes o lesionados. La actividad de la bomba de cationes de los eritrocitos, cuya energía es el ATP, está incrementada en las células con membranas dañadas, las cuales requieren energía adicional para mantener el equilibrio osmótico. Debido a la concentración baja de glucosa y la circulación lenta en los cordones esplénicos, la reserva de glucosa en los eritrocitos seniles o lesionados disminuye con rapidez. Esta disminución en la disponibilidad de ATP contribuye a la muerte de estos eritrocitos. El paso lento por esta vía rica en macrófagos permite que los eritrocitos viejos o deteriorados sean removidos antes o durante su estrujamiento al pasar por poros de $3\mu\text{m}$ a los cordones y senos. Los eritrocitos normales soportan este ambiente adverso y retornan por último a la circulación. La membrana celular pellizcada puede sellarse por sí misma; pero la célula no puede sintetizar lípidos y proteínas para formar membrana nueva debido a que carece de organelos. Por ejemplo, un tamizaje extenso reduce la proporción superficie/volumen causando la formación de esferocitos.

El bazo es una línea de defensa importante en las infecciones transportadas por la sangre debido a su riqueza en linfocitos y células fagocíticas y también por su circulación única. Los antígenos que circulan en la sangre son forzados a un contacto estrecho con fagocitos y linfocitos, lo que permite que sean reconocidos como extraños, para desencadenar la fagocitosis y la producción de anticuerpos. (1)

- Ganglios linfáticos.

El sistema linfático esta constituido por ganglios y vasos linfáticos, que drenan en los conductos linfáticos derecho e izquierdo, los vasos se originan en los espacios del tejido conjuntivo y transportan la linfa en una dirección hacia los conductos próximos al cuello donde entra a la sangre. La linfa tiene su origen en el líquido de la sangre que escapa hacia el tejido conjuntivo. Los ganglios linfáticos, cuya forma semeja un frijol, se presentan en grupos o cadenas a lo largo de los capilares linfáticos más grandes. Se componen de linfocitos, macrófagos y una malla reticular rodeada por una cápsula. Los ganglios linfáticos actúan como filtros removiendo partículas extrañas de la linfa por medio de sus células fagocíticas; por lo tanto, su importancia en la defensa inmunitaria es extrema. Conforme los antígenos circulan a través de los ganglios, se ponen en contacto con ellos y estimulan a los linfocitos inmunocompetentes a proliferar y diferenciarse en células efectoras.

Los ganglios linfáticos contienen una área interior, que es la médula, y otra exterior, la corteza. Las trabéculas fibrosas se extienden hacia el interior desde la cápsula para formar compartimentos irregulares comunicantes dentro del parénquima. La médula, que rodea a los linfáticos eferentes, está constituida por cordones de células plasmáticas que yacen entre los sinusoides. La corteza tiene conglomerados de células llamados folículos rodeados por linfocitos T y macrófagos. Las porciones centrales de los folículos, conocidas como centros germinales, contienen linfocitos B y varían en estructura en relación con su estado de actividad. Un ganglio estimulado puede tener centros germinales con abundantes linfocitos en proliferación, en tanto que un ganglio en reposo contiene folículos con linfocitos y macrófagos pequeños de aspecto normal. (1)

- Timo.

El timo es un órgano linfopoyético localizado en la parte superior del mediastino anterior. Está desarrollado al nacimiento y continúa creciendo hasta la pubertad. Sin embargo, más adelante comienza a atrofiarse hasta que en la vejez apenas se reconoce. Es un órgano bilobulado separado en corteza y médula. La corteza se encuentra muy llena con linfocitos pequeños y algunos macrófagos y la médula contiene menos células epiteliales medulares y macrófagos.

El propósito primario del timo es servir como un compartimento para la maduración de linfocitos T. La hormona tímica, timosina, es importante para la maduración de los linfocitos no diferenciados en células T inmunocompetentes. Se ha demostrado que los extractos de timosina y los injertos tímicos restablecen la función inmunológica en los animales timectomizados. El timo se ocupa de suministrar linfocitos T inmunocompetentes (timocitos) a las áreas correspondientes de los ganglios linfáticos, el bazo y otros tejidos linfoides periféricos. (1)

- Médula ósea.

+ Estructura y función.

La médula ósea es uno de los más grandes órganos en el cuerpo, siendo en el humano el principal sitio de formación de células sanguíneas. En un adulto sano la producción y salida de células es de aproximadamente 2.5 billones de células rojas, 2.5 billones de plaquetas y 1.0 billones de granulocitos por kilogramo de peso. Esta proporción de producción es ajustada a las necesidades actuales y puede ser variada de cercana a cero a muchas veces lo normal. La médula ósea es también responsable de la producción de monocitos y de linfocitos no comprometidos, y como parte del sistema monocito-macrófago incluido en la síntesis de anticuerpos, reconocimiento y separación de células seniles y anormales. A pesar de la relativa facilidad con la cual a estos se les puede hacer un muestreo y examinar, la médula ósea ha sido un órgano difícil de estudiar por su compleja composición celular. Sin embargo, mejoras técnicas en la separación celular y cultivos in vivo e in vitro han llevado al mejor entendimiento de ésta en la homeostasis celular y humoral.

Hasta el final del siglo XIX, la formación de células sanguíneas fue sin embargo la prerrogativa de los nódulos linfáticos o del hígado y bazo. En 1868, Neuman y Bizzozero independientemente observaron células sanguíneas nucleadas en material extraído de costillas de cadáveres humanos y propusieron que la médula ósea es la mayor fuente de células sanguíneas. Este concepto fue vigorosamente opuesto por muchos hematólogos contemporáneos, y esto fue inicialmente aceptado después que el prestigiado fisiólogo Claude Bernard había presentado y respaldado los hallazgos de Neuman en la Academia de Ciencia en París. Durante la siguiente década, exámenes postmortem de la médula ósea dieron considerable información acerca de la morfología de las células sanguíneas inmaduras, pero un entendimiento dinámico de su maduración, proliferación y relación a enfermedad tuvo que esperar a muestras de médula ósea de pacientes vivos y mejores métodos de tinción.

Las primeras biopsias de médula ósea fueron hechas probablemente en 1876 por Mosler, quien usó una aguja de raqueta para obtener partículas de médula ósea de un paciente con leucemia. A pesar del diagnóstico obvio de este planteamiento, pasaron 50 años antes de que los estudios de Arinkin en 1929 establecieran al aspirado de médula ósea como técnica segura, fácil y útil. Con la ayuda de Romanowsky, técnicas supravitales de tinción, la inclusión de métodos para seccionar, la morfología e interrelaciones de sangre y médula ósea fueron esclarecidas y se estableció la existencia de claras líneas celulares.

Durante los últimos 30 años, estudios cinéticos de las células de la médula ósea han confirmado la existencia de una jerarquía celular. Estos estudios han mostrado que las líneas

celulares consisten en el final de la diferenciación con una vida finita funcional, capaz de proliferación cuando son jóvenes pero sin la capacidad propia de renovación. (3)

El tejido productor de sangre localizado entre las trabéculas del hueso esponjoso se conoce como médula ósea. Este tejido hematopoyético principal tiene un volumen de 30 a 50 ml/kg. del peso corporal, más o menos la mitad realiza hematopoyesis activa, la médula roja. La otra mitad no tiene actividad hematopoyética y es la médula grasa o amarilla, por lo tanto, la celularidad normal es de 50%. La médula roja contiene los precursores eritroide y mieloide, con una proporción normal mieloide-eritroide (M: E de 1.5:1 a 4:1). Hasta cierto grado, las médulas roja y amarilla aparecen como interconvertibles. En los cuatro primeros años de vida, casi todas las cavidades medulares están compuestas de médula roja hematopoyética. Después de esta edad, la médula roja de la diáfisis de los huesos largos es reemplazada por tejido grasa amarillo. A los 25 años, la hematopoyesis está limitada a la médula de cráneo, costillas, esternón, omóplatos, clavículas, vértebras, pelvis, mitad superior del sacro y extremos proximales de los huesos largos. La celularidad en estas áreas decrece a alrededor de 30% después de los 70 años.

La celularidad normal de la médula ósea puede ser alterada por ciertos estados patológicos. La médula roja normal es capaz de responder a estímulos al incrementar su actividad varias veces su tasa normal. Como resultado, se vuelve hiperplásica y reemplaza a porciones de la médula grasa, la hiperplasia acompaña a todos los trastornos en que hay incremento de hematopoyesis o ésta es ineficaz. El grado de hiperplasia se relaciona con la gravedad y duración del estado patológico. La pérdida aguda de sangre puede hacer que tejido eritropoyético reemplace en forma temporal al tejido grasa, en tanto que la anemia crónica grave puede causar que la eritropoyesis sea tan intensa que erosione la superficie interior del hueso. En las enfermedades malignas que invaden o se originan en la médula ósea, células anormales en proliferación pueden sustituir a los tejido hematopoyético y grasa normales. En la leucemia, los leucocitos anormales proliferantes desalojan a los tejidos hematopoyético y no hematopoyético normales. Por el contrario, el tejido hematopoyético puede volverse inactivo o hipoplásico. Factores ambientales, como sustancias químicas o toxinas, pueden suprimir la hematopoyesis, además de otros tipos de hipoplasia determinados genéticamente.

El riego vascular de la médula ósea se realiza por una arteria nutriente y una vena central, que entran al hueso por los agujeros óseos y una vena central. La arteria nutriente se ramifica y enrolla alrededor de la vena central longitudinal que se extiende en la cavidad medular. Las arteriolas irradian al exterior del endostio dando origen a lechos endostiales de senos interconectados. Los senos están revestidos de células endoteliales, las cuales están interrumpidas por numerosos espacios celulares a través de los cuales la luz sinusal está en contacto directo con el parénquima medular. Los senos drenan a vénulas recolectoras. Estas vénulas se abren a conductos venosos más anchos que terminan en la vena central. La médula hematopoyética se encuentra adyacente al endostio. La médula grasa ocupa la cavidad central y rodea a los vasos sanguíneos. La reticulina sirve como malla de sostén del tejido hematopoyético y la vasculatura medular. Este estroma medular normal es esencial para la maduración y liberación ordenadas de las células hematopoyéticas.

Las células hematopoyéticas logran el acceso a los sinusoides en ciertos puntos críticos de la maduración y entran a la circulación. Las células sanguíneas maduras deben tener la propiedad de deformarse de modo que puedan pasar a través de los estrechos espacios del revestimiento sinusoidal.

Existe un patrón para el ordenamiento de las células hematopoyéticas dentro de la cavidad medular, constituyen entre 25 y 30% de las células medulares, los eritroblastos son producidos cerca de los senos. Un hallazgo común en estas células en desarrollo es la isla eritroblástica, la cual está compuesta de un solo macrófago circundado por eritroblastos en grados variables de madurez. El

citoplasma del macrófago se extiende fuera de los eritroblastos circundantes. Se sospecha que durante esta asociación estrecha, el eritrocito en formación adquiere hierro del macrófago. Las islas eritroblásticas aumentan en las anemias hemolíticas. Los granulocitos se producen en nichos que están lejos de los senos vasculares y próximos a las trabéculas y las arteriolas. En la etapa de metamielocitos, comienzan a moverse hacia el seno. Los linfocitos yacen en racimos que rodean a las arterias radiales pequeñas.

Los megacariocitos se localizan sobre aberturas endoteliales en las paredes sinusoidales y liberan plaquetas directamente a la luz del seno, a causa de su gran tamaño, no se deslizan a la circulación y, de hecho, pueden evitar el escape de elementos celulares menores a los senos. (1)

La hematopoyesis en mamíferos toma lugar en los espacios extravasculares entre los senos de la médula ósea. La pared de los senos es compuesta de una capa luminal de células endoteliales y una cubierta de células reticulares adventicias las cuales forman una cubierta externa incompleta y una delgada lámina interrumpida está presente entre esas capas celulares. (3)

Las células endoteliales forman una cobertura completa de la superficie interior de los senos. Las células endoteliales son anchas y planas con uniones sobrepuestas o interdigitales permitiendo la extensiva expansión de volumen.

+ Matriz celular.

La superficie adventicia del seno vascular está compuesta de células reticulares, los cuerpos de éstas están continuos con el seno, formando una parte de esta cubierta adventicia. Su proceso citoplásmico es afuente sobre la pared externa del seno y forma una vaina adventicia.

Las células reticulares sintetizan fibras reticulares, que a lo largo de su proceso citoplásmico, se extienden dentro del compartimento hematopoyético y forman una malla en la cual las células hematopoyéticas descansan. Los cuerpos celulares, sus procesos y fibras constituyen el retículo de la médula ósea. (3)

- Hígado.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo; pesa en el adulto alrededor de 1.5 Kg. y se localiza bajo el diafragma en la parte superior del abdomen. Su sistema circulatorio es único, ya que tiene un suministro doble de sangre a través de la arteria hepática y la vena porta. La sangre de esta última proviene de las vías digestivas, el páncreas y el bazo, este rico suministro de sangre es la causa principal del color rojo o pardo rojizo del órgano.

El hígado está constituido por un gran número de unidades funcionales llamadas lóbulos hepáticos. Cada lóbulo consiste de una vena central circundada por placas irregulares interconectadas de células hepáticas (hepatocitos), que se distribuyen hacia el exterior. Los sinusoides separan estas placas de hepatocitos, espacios canaliculares entre hepatocitos adyacentes forman los canaliculos biliares. Estos conductos recogen la bilis y la transportan a los conductos hepáticos. En la periferia de los lóbulos, se encuentran las áreas portales. Cada área consiste de tres conductos diminutos: una vénula (rama de la vena porta), una arteriola (rama de la arteria hepática) y un conducto biliar, también puede haber vasos linfáticos.

Las ramas de la vena porta y la arteria hepática drenan en los sinusoides. Estos conductos, a su vez, vacían en la vena central. Los sinusoides están separados de los hepatocitos por un espacio, el espacio de Disse. El interior de los sinusoides está revestido por dos tipos de células: epiteliales y de Kupffer. Pequeños espacios entre las células epiteliales y las de Kupffer hacen al revestimiento discontinuo y permiten al plasma un acceso directo a los hepatocitos. Sin embargo, el revestimiento rechaza a los eritrocitos. El segundo tipo de células en el revestimiento sinusoidal, la célula de

Kupffer, por lo general tiene forma de estrella debido a la existencia de proyecciones citoplásmicas y está adherida a las células epiteliales y éstas pueden extenderse a la luz del sinusoides o cruzarla. Aunque el hígado no es un filtro como el bazo, las células de Kupffer fagocitan grandes cantidades de material presente en la sangre, incluyendo derivados del fibrinógeno, productos de degradación de la fibrina, proteínas activadas de la coagulación, plaquetas, leucocitos dañados y eritrocitos decedentes o lesionados; no obstante, el bazo es algo más eficiente para remover eritrocitos ligeramente dañados y extraer inclusiones de los mismos debido al ambiente relativamente estático de las células de la sangre en sus cordones revestidos de macrófagos. Puede existir un tercer tipo de células en el revestimiento sinusoidal haciendo frente al espacio perisinusoidal, el lipocito, una célula que acumula lípidos.

Además de su función de filtro para las células sanguíneas, el hígado depura diversos fármacos y sustancias por oxidación, metilación y conjugación. La bilirrubina, uno de los productos metabólicos del catabolismo de la hemoglobina, es conjugada por la enzima hepática, glucuroniltransferasa, y excretada en la bilis. Esta última ayuda a la emulsificación y absorción de los lípidos en las vías digestivas. Otras funciones del hígado incluyen el metabolismo de proteínas, grasas, carbohidratos y el almacenaje de hierro y vitaminas A, B y D.

En el feto, el hígado es el sitio principal de la hematopoyesis desde el tercer mes de gestación hasta poco antes del nacimiento. Esta función hematopoyética es retenida después de nacer. Por lo tanto, si la médula ósea pierde su capacidad para formar células sanguíneas debido a invasión por células extrañas o tejido fibroso, el hígado puede reasumir su producción. (1)

1.1.3. Producción celular.

La principal función de la médula ósea es la de suplir a la sangre circulante con células maduras durante condiciones de períodos continuos o durante períodos de incremento de la demanda. El control y ajuste de formación celular es forzado en el nivel de las células progenitoras de la médula ósea. Estas células, pertenecientes a líneas celulares sencillas, están comprometidas a continua proliferación, y un cambio inducido en su proporción de proliferación, eventualmente podría resultar en un cambio en la salida de células rojas maduras. Las CTH tempranas son pluripotenciales y capaces de diferenciación a cualquier CTH multipotencial linfoide o mieloides. Las CTH linfoides dejan la médula ósea para su subsecuente diferenciación en células B o T en los nodos linfáticos o timo, respectivamente. Las CTH mieloides proliferan bajo el estímulo de una variedad de factores estimulantes de colonias y se diferencian al azar en células de propia renovación con múltiples opciones de nuevos desarrollos. Eventualmente ellas empiezan a sensibilizar a nuevos factores de crecimiento y diferenciación, perdiendo más de sus opciones de diferenciación y cambiando en células progenitoras bi o unipotenciales aun cuando éstas células maduran continuamente, es probable que retengan alguna capacidad limitada para su autoperpetuación; morfológicamente, probablemente las CTH y progenitoras se parezcan. Experimentalmente, las CTH y progenitoras son identificadas por su capacidad de repoblar la médula ósea después de daño hematopoyético y por su habilidad de crecimiento y diferenciación en cultivos in vitro. (3)

1.1.4. Liberación celular.

La migración celular ocurre entre las células adventicias, pero a través de los canales que desarrollan las células endoteliales al tiempo del tránsito celular. Por otra parte, las células maduras están a un lado de los senos y cuando están listas para salir son presionadas contra el endotelio intacto. Los pseudópodos de las células estarían entrando al citoplasma de las células endoteliales sin romper, a través de la porción luminal de la membrana plasmática de las células endoteliales. De este modo, ha concluido la migración celular haciendo el agujero que se desarrolló en el citoplasma de las células endoteliales. El diámetro de los canales de migración es casi siempre más estrecho que el diámetro esférico de la célula, requiriendo una deformación celular durante su tránsito. Las células maduras, pero no las inmaduras, son encontradas en el proceso de salida y la propulsión es presumiblemente requerida por las células para cruzar a través de la pared del seno.

Un número de factores liberados ha sido implicado en la iniciación de la salida de la médula ósea. Los mejor caracterizados son para los granulocitos, los cuales incluyen el componente C3 del complemento, hormonas glucocorticoides, esteroides androgénicos y endotoxinas, los factores liberados por reticulocitos y plaquetas han sido más difíciles de identificar y podrían tener menor importancia biológica.

El citoplasma celular reticular es una barrera para los reticulocitos en la superficie luminal del endotelio. La flebotomía, la anemia hemolítica inducida por fenilhidrazina y eritropoyetina resultan en una marcada reducción de la cubierta de células adventicias que cubren el seno, un proceso para facilitar la salida celular a través del endotelio.

Para dejar la médula ósea, los reticulocitos se presumen inhábiles para usar la fuerza móvil intrínseca análoga al movimiento ameboide, que puede ser generado por los leucocitos y por el citoplasma megacariocítico, lo cual aparentemente depende de un gradiente de presión que cruza la membrana a través de los poros y la hace emerger como una esfera.

El patrón de granulocitos, monocitos y linfocitos que salen a través de la pared del seno es similar a la de los reticulocitos. Pequeñas porciones del citoplasma del leucocito pueden penetrar en el endotelio sinusoidal y pequeñas partes del leucocito parcialmente traslocado que cruzan el endotelio, indican una marcada deformación de las células que ocurre cuando ellos penetran el citoplasma de la célula endotelial para entrar al lumen del seno. El núcleo de los granulocitos, usualmente segmentados, no requiere una marcada deformación en su travesía de migración por los poros como los monocitos y linfocitos. (3)

1.1.5. Derivación de las células sanguíneas.

Las células sanguíneas maduras tienen una vida limitada y, con excepción de los linfocitos, no pueden autorrenovarse. Reemplazar las células hematopoyéticas periféricas decadentes es función de elementos más primitivos en la médula ósea llamados CTH. Estas últimas, se caracterizan por su propiedad de diferenciarse en distintas líneas celulares con funciones especializadas y por su capacidad para regenerarse de modo que se conserve el compartimento de las mismas. Se pensaba que los mieloblastos y los eritroblastos, debido a su alto índice mitótico, eran los encargados de conservar la cantidad normal de células sanguíneas maduras, lo cual no pudo comprobarse. Cuando las células de la médula ósea se marcan con isótopos radiactivos para determinar sus índices de proliferación, se observa que la proliferación potencial de mieloblastos y eritroblastos se limita a unas cuantas divisiones celulares, por lo tanto, estas células no podrían reemplazar a los miles de millones de células que se requieren diariamente.

La investigación subsecuente verificó la existencia de CTH claramente distintas de los mieloblastos y los eritroblastos; no obstante, persistió la duda acerca de cuantos tipos diferentes de CTH existen. Se han propuesto dos teorías divergentes acerca de estas células: la teoría monofilética y la polifilética. La primera propone una célula precursora común, la CTH pluripotencial que, bajo la influencia de factores humorales desconocidos, puede dar origen a cada una de las líneas celulares de la sangre. La célula pluripotencial sería capaz de autorrenovación, proliferación y diferenciación en todas las líneas celulares hematopoyéticas. Por el contrario, la teoría polifilética propone que existen CTH monopotenciales capaces de diferenciarse en uno y sólo un tipo de célula sanguínea. Una mediación entre estos dos extremos fue la proposición de que existen varias CTH, pero algunas tienen el potencial para diferenciarse en más de un tipo de célula sanguínea.

Los datos clínicos y experimentales que ahora existen, se inclinan con firmeza hacia la teoría monofilética. Basándose en estos resultados, las células hematopoyéticas pueden clasificarse en tres compartimentos celulares dependiendo de su grado de madurez. En orden creciente de maduración estos compartimentos son: 1) células multipotenciales primitivas capaces de autorrenovación y diferenciación en todas las líneas celulares sanguíneas, 2) células progenitoras restringidas destinadas a desarrollar líneas celulares definidas, 3) células maduras con funciones especializadas y que han perdido su capacidad para proliferar.

Till y McCulloch, en 1961, demostraron el potencial de CTH únicas para repoblar el bazo de ratones radiados en forma masiva, con todas las líneas celulares sanguíneas. Los ratones fueron radiados hasta la destrucción completa de todas las células hematopoyéticas, de inmediato se les transfundieron por vía intravenosa células de médula ósea normal de ratones donadores. En las etapas iniciales de la recuperación, el bazo y la médula ósea de los animales transfundidos mostraron nódulos macroscópicos de células hematopoyéticas en proliferación, aunque los primeros siete a ocho días, los nódulos contenían sólo una línea celular (eritrocítica, mielocítica o megacariocítica), a los 14 días los nódulos existentes mostraron poblaciones celulares mixtas. La célula que formó la colonia se denominó unidad formadora de colonia-bazo (UFC-B). Se ha sugerido que los nódulos que aparecen a los siete días derivados de CTH restringidas unipotenciales son más maduras, en tanto que los nódulos de 14 días derivaban de una CTH pluripotencial más primitiva. También es interesante notar que los nódulos aparecieron en áreas específicas del bazo de acuerdo a su línea celular predominante. Las colonias eritrocíticas se asentaron en la superficie esplénica, las megacariocíticas crecieron bajo la cápsula y las mielocíticas se desarrollan dentro del bazo. Esta preferencia por ciertas áreas del bazo puede ser causada por la influencia del ambiente local, llamado microambiente hematopoyético inductivo (MHI), sobre la CTH. Los estudios de la influencia del estroma de la médula ósea sobre la hematopoyesis, en ratones y cricetos (hámsters), han sugerido que es esencial la presencia de un estroma normal para que la hematopoyesis tenga lugar en forma adecuada.

Experimentos subsecuentes han proporcionado pruebas directas de la existencia de CTH pluripotenciales. Células medulares de donadores fueron radiadas en forma suficientemente intensa para causar aberraciones cromosómicas y luego se inyectaron en receptores radiados de manera letal. En los nódulos esplénicos de células hematopoyéticas, se encontraron tipos celulares diferentes con el mismo cariotipo único. Además, suspensiones celulares de estos nódulos fueron inyectadas en otros ratones radiados y se formaron nódulos esplénicos nuevos con anomalías cromosómicas similares. Estos estudios indican que existe una sola célula medular capaz no sólo de diferenciarse en tipos celulares hematopoyéticos diferentes; si no también puede autorrenovarse en el mismo tipo original de célula.

La mayor parte de los estudios indican que aunque UFC-B da origen a monocitos, neutrófilos, megacariocitos y eritrocitos, no forma linfocitos. La investigación reciente con

marcadores cromosómicos sugiere que es probable que el linfocito y la UFC-B tengan una CTH más primitiva, que forma a las células progenitoras de UFC-B y linfoide.

Los métodos *in vitro* para el cultivo de CTH humanas en agar semisólido han suministrado pruebas de la existencia de CTH unipotenciales o bipotenciales (restringidas) que derivan de UFC-B. Antes se pensaba que un factor estimulante de colonia (FEC) al actuar sólo en el ámbito de la CTH restringida granulocítica-monocítica, puede ser capaz de inducir al UFC-B a proliferar y diferenciarse en estas CTH restringidas. Los linfocitos T, monocitos y macrófagos pueden inducir la producción de FEC. En el sistema de cultivo eritroide, las células progenitoras dan origen a dos tipos distintos de colonias eritroides en presencia de eritropoyetina. Un tipo de colonia crece a un tamaño máximo en siete a ocho días, madura y degenera, la progenitora unipotencial sensible a la eritropoyetina de esta colonia se denomina UFC-E. Una célula progenitora unipotencial más primitiva, derivada de las UFC-B con insensibilidad relativa a la eritropoyetina, forma colonias más grandes después de 14 días en forma de brotes bruscos. La célula progenitora de esta colonia se conoce como unidad formadora de brotes-eritroide (UFB-E). Se considera que UFC-E es un descendiente de UFB-E y da origen al primer precursor de eritrocitos reconocible, el pronormoblasto.

Estos estudios que utilizan cultivos en agar han indicado también la existencia de colonias monocíticas-neutrófilas derivadas de colonias madre únicas. Estas colonias requieren factor estimulante de colonias para su desarrollo. La CTH bipotencial que da origen a estas colonias se denomina unidad formadora de colonias en cultivo (UFC-C) pero es más común referirse a ella como unidad formadora de colonia-neutrófilos y monocitos (UFC-NM). Los eosinófilos rara vez aparecen en las mismas colonias que los neutrófilos y monocitos, lo cual indica la probabilidad de que aquellos deriven de una célula formadora de colonia diferente. Por lo general, los basófilos no crecen en este sistema.

Es probable que los nódulos megacariocíticos deriven de CTH restringidas a la megacariopoyesis (UFC-Meg). Sin embargo, se han encontrado megacariocitos en colonias mixtas con neutrófilos y monocitos, lo cual indica que bajo ciertas circunstancias la UFC-NM también puede diferenciarse en megacariocitos.

Las CTH restringidas bipotenciales y unipotenciales son estimuladas a proliferar y diferenciarse por un estímulo humoral específico. Como ya se describió, la eritropoyetina es el estímulo específico para las células unipotenciales restringidas a la eritropoyesis. También existen pruebas de la presencia de las sustancias humorales, leucopoyetina y trombopoyetina, como el estímulo para la leucopoyesis y la trombopoyesis, respectivamente. (1)

1.1.6. Eritrocito.

El eritrocito fue uno de los primeros elementos microscópicos reconocidos y descritos después del descubrimiento del microscopio, por siglos, estos corpúsculos fueron considerados partículas inertes sin funciones. En 1817, Francois Magendie, diluyó la sangre con agua, no encontró corpúsculos microscópicos y en forma errónea dedujo que los eritrocitos, observados por otros, eran probablemente partículas de aire. Ahora se sabe que los eritrocitos suspendidos en agua estallan, lo que explica los hallazgos negativos de Magendie. Fue hasta 1865, cuando Hoppe y Seyler descubrieron la capacidad para transportar oxígeno del pigmento rojo (hemoglobina) de los corpúsculos, y la función de estos “glóbulos” comenzó a comprenderse, en la actualidad se reconoce que el eritrocito es una de las células más especializadas del cuerpo.

La eritropoyesis es en condiciones normales un proceso ordenado, por lo que la concentración periférica de eritrocitos se mantiene en equilibrio. La estimulación hormonal de la célula madre eritroide restringida (UFC-E) conduce a proliferación, diferenciación y maduración de las células precursoras en la médula ósea. Los precursores eritroides nucleados de la médula ósea son llamados de manera colectiva eritroblastos o normoblastos. Los eritrocitos que han madurado hasta la etapa de anucleados pasan a la circulación periférica, una vez que los eritroblastos han perdido sus núcleos se llaman eritrocitos. Los eritrocitos jóvenes con RNA residual se nombran de manera más precisa como reticulocitos.

La maduración de los eritroblastos en la médula ósea ocurre en una secuencia ordenada y definida, en el proceso, la célula disminuye en forma gradual de tamaño. Esta reducción ocurre al mismo tiempo que la condensación y expulsión final del núcleo, también incluye un incremento en la producción de hemoglobina. Aunque las etapas de maduración por lo general se describen escalonadas, en realidad es un proceso gradual. En un frotis de médula ósea, algunas células no cumplen con todos los criterios particulares de cierta fase. Las etapas que se reconocen desde las células más inmaduras al eritrocito son: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático, reticulocito y eritrocito.

Por lo común, los eritroblastos emplean de cinco a siete días para proliferar y madurar en el compartimento de la médula ósea, después de la maduración, el reticulocito pasa a los senos de la médula y sale a la sangre periférica. El reticulocito liberado continúa su maduración en la sangre periférica por un día más. El eritrocito maduro circulante tiene una vida de 100 a 120 días, la duración de vida relativamente larga, explica por qué una cantidad pequeña de médula eritroide puede cubrir el requerimiento de la gran masa de eritrocitos circulantes. (1)

1.1.7. Leucocito.

Los leucocitos proceden de CTH pluripotenciales primitivas de la médula ósea. Mediante estimulación hormonal específica, la célula precursora prolifera y se diferencia en los diversos tipos de leucocitos: granulocitos (que incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos y linfocitos, al madurar estas células pueden pasar a la sangre periférica o permanecer almacenadas en la médula ósea hasta que se necesiten.

La cuenta total de leucocitos se eleva al nacimiento de $9 \text{ a } 30 \times 10^9/l$. En los primeros días de vida pueden verse algunas células inmaduras (mielocitos, metamielocitos); pero, después de esa edad los leucocitos inmaduros no circulan en la sangre periférica, excepto en enfermedad. En una semana, la cuenta de leucocitos disminuye entre $5 \text{ y } 21 \times 10^9/l$ hasta los cuatro años hay una declinación gradual a un promedio de $8 \times 10^9/l$. Los valores en el adulto oscilan de $4.0 \text{ a } 10.5 \times 10^9/l$, los individuos de raza negra poseen promedios menores, suceso también común en individuos de mayor edad.

El neutrófilo es el leucocito más numeroso en la sangre periférica del adulto, $54 \text{ a } 62\%$ ($2 \text{ a } 7 \times 10^9/l$). Al nacer la concentración de neutrófilos es casi de 60% ; este valor baja a 30% entre cuatro y seis meses. Después de los cuatro años, la concentración de neutrófilos aumenta en forma gradual hasta alcanzar los valores del adulto a los seis años. La mayor parte de los neutrófilos es una forma segmentada madura; pero, en muestras normales pueden observarse algunas bandas. La mayor parte de las variaciones en la cuenta leucocitaria total se debe a un incremento o decremento de neutrófilos.

El neutrófilo experimenta 6 modificaciones morfológicas identificables en el proceso de maduración desde la CTH unipotencial a neutrófilo segmentado funcional: 1) mieloblasto, 2)

promielocito (progranulocito), 3) mielocito, 4) metamielocito, 5) granulocito en banda, 6) granulocito segmentado o neutrófilo polimorfonuclear (PMN).

Durante la maduración hay un cambio progresivo en el núcleo. Los nucleolos desaparecen, la cromatina se condensa y la masa nuclear, antes redonda, empieza a mostrar muescas y por último se segmenta. Estos cambios nucleares se acompañan de modificaciones citoplásmicas definidas. El citoplasma basófilo agranular, escaso en las etapas más jóvenes, es reemplazado de manera gradual a voluminoso teñido de rosa al final de la diferenciación.

Los valores de eosinófilos se mantienen para siempre en 1 a 3% (0 a $0.45 \times 10^9/l$). Es posible que la eosinofilia no pueda verse en un diferencial de cien células; no obstante, un sondeo cuidadoso del frotis entero deberá revelar una eosinofilia ocasional.

Es aleatorio afirmar que el eosinófilo se origina del mieloblasto o de una CTH unipotencial separada. Colonias discretas de eosinófilos se desarrollan en cultivos de agar semisólido, separadas de las de neutrófilos y monocitos, por acción de un factor estimulante de colonias secretado por los linfocitos T activados. Esto sugiere que los eosinófilos tienen una célula progenitora independiente. El eosinófilo experimenta una maduración morfológica semejante a la del neutrófilo. No es posible diferenciar por su morfología a los precursores de eosinófilos de los correspondientes neutrófilos con el microscopio de luz hasta la etapa de mielocito, cuando aparecen las granulaciones acidófilas típicas. Al contrario de la formación de gránulos primarios y secundarios en los neutrófilos, las pruebas indican que durante el proceso de maduración del eosinófilo sólo se forma un tipo de gránulos citoplásmicos. La producción empieza en la etapa de promielocito, cambia en forma gradual sus características de tinción de púrpura oscuro o azul, y por último al color rosa anaranjado típico. Los mielocitos eosinófilos son células distintivas que se caracterizan por la abundancia de gránulos eosinófilos grandes (0.5 a $1.5 \mu\text{m}$). La maduración de mielocito a metamielocito, banda y forma segmentada es análoga a la de los neutrófilos con depresión y segmentación gradual del núcleo, sin cambio apreciable en el citoplasma. Los gránulos esféricos anaranjados rojizos son de igual tamaño y distribución de manera uniforme en toda la célula. Debido al escaso porcentaje de eosinófilos en la médula ósea, no es útil intentar la diferenciación del eosinófilo y de sus etapas de maduración, cuando la cuenta es normal. Su tiempo de maduración y almacenaje medular es más o menos de nueve días. Los gránulos eosinófilos derivan de los azurófilos y no son, como los neutrófilos, una población independiente. Los gránulos azurófilos se convierten en eosinófilos, se observan como gránulos de color rojo violeta, gránulos anaranjados y formas transicionales, de color gris entre ellos. El color naranja de los gránulos eosinófilos es debido a sus componentes de mucopolisacáridos y proteína básica de los eosinófilos

Los basófilos son las células menos abundantes en la sangre periférica, 0 a 1% (0 a $0.2 \times 10^9/l$), por lo que no es inusitado que las personas experimentadas reporten 0% de basófilos en diferenciales de cien células, aunque el hallazgo de una basofilia absoluta es muy importante ya que con frecuencia indica neoplasias malignas hematológicas, éstos son los granulocitos más pequeños (10 a $14 \mu\text{m}$) y se originan en la médula ósea, siendo su proceso de maduración análogo al de los neutrófilos. La primera etapa reconocible es el promielocito, aunque es muy difícil de diferenciar la de la correspondiente en eosinófilos y neutrófilos. El promielocito basófilo es más pequeño con una proporción N: C más elevada que el promielocito neutrófilo o eosinófilo. Igual que en los eosinófilos, las diversas etapas de maduración del basófilo se caracterizan por depresión y segmentación gradual del núcleo. Las formas mielocítica, metamielocítica, banda y segmentada de los basófilos se diferencian con facilidad de otros granulocitos por la presencia de grandes gránulos negros purpúreos (0.2 a $1.0 \mu\text{m}$), distribuidos de modo irregular en todo el citoplasma. En un principio se consideró que estos gránulos eran basófilos, en la actualidad, se ha establecido con

precisión que lo que se creía que eran gránulos “basófilos” son en realidad metacromáticos y contienen histamina y un mucopolisacárido sulfatado (heparina). Los gránulos han sido llamados “bolsas sucias” porque la liberación de grandes cantidades de estos gránulos en el choque anafiláctico puede causar la muerte del individuo. Su solubilidad en agua hace que los gránulos celulares parezcan escasos en los frotis teñidos. Con frecuencia, se observan sólo unos cuantos gránulos teñidos en forma intensa sobre el núcleo, en tanto que los restantes tienen un aspecto desteñido. Por lo común, el núcleo es bilobulado en el basófilo maduro, pero su conformación real la cubren con frecuencia los gránulos superpuestos. El citoplasma puede tener un color rosa o lavanda, o no está teñido. Debido a que estas células son tan escasas en la médula ósea y sangre periférica.

Basófilos y células cebadas actúan como mediadores de las respuestas inflamatorias, en especial de las respuestas inflamatorias, en especial las de hipersensibilidad. Estas células tienen receptores de membrana para IgE que, al adherirse, provocan la desgranulación celular; este último proceso libera enzimas vasoactivas, broncoconstrictivas y quimiotácticas (en especial para los eosinófilos). Esta liberación de mediadores inicia los signos clínicos clásicos de la hipersensibilidad inmediata. Estas células pueden sintetizar más gránulos después de la desgranulación inicial.

Los monocitos por lo general oscilan de 4 a 10% (0.2 a 0.8 x 10⁹/l) de leucocitos. En ocasiones, los linfocitos reactivos pueden semejar monocitos. Estos se forman en la médula ósea a partir de unas células madres bipotenciales (UFC-NM) que pueden dividirse en dos tipos de células maduras: neutrófilos y monocitos. Se desconoce el estímulo para la maduración en una u otra línea celular; pero es probable que intervenga una enzima análoga a la eritropoyetina. La bipotencialidad del precursor del monocito que respalda las semejanzas morfológicas e inmunológicas de clonas neoplásicas, se observa en las leucemias que afectan a monocitos y neutrófilos. La proliferación clonal neoplásica de neutrófilos como ocurre en la leucemia mieloide crónica, así como en la leucemia mielomonoblástica aguda, hay proliferación incontrolable de monoblastos y mieloblastos. En estos trastornos es muy probable que la célula que sufrió transformación maligna sea la madre bipotencial.

Los precursores monocíticos en la médula ósea son monoblastos y promonocito. Estas células son abundantes sólo en procesos leucémicos del sistema monocítico. Se desconoce si el proceso leucémico de maduración simula la monocitopoyesis normal. En el microscopio de luz es difícil distinguir por su morfología al monoblasto medular del mieloblasto, excepto cuando hay una proliferación notable de la serie monocítica, como ocurre en la leucemia monocítica. Se emplean con frecuencia colorantes citoquímicos para diferenciar estas dos líneas celulares. El promonocito es la primera etapa en que se desarrollan características morfológicas que permiten su diferenciación como precursor monocítico en el microscopio de luz. La identificación de los primeros precursores del monocito se facilita por la observación de pliegues, dobleces o depresiones en el núcleo y por su relación con monocitos maduros.

Por años, después de su descubrimiento, el linfocito, fue considerado un componente insignificante de la sangre y la linfa. Desde 1960 los extraordinarios adelantos en inmunología han coronado al linfocito como directriz de las actividades de todas las demás células de la respuesta inmunitaria. La función primaria del linfocito es reaccionar con antígenos y trabajar con monocitos para modular la respuesta inmunitaria.

La concentración de linfocitos varía con la edad del individuo. Alrededor de 30% de leucocitos son linfocitos al nacer, éstos aumentan a 60% alrededor de los tres a cuatro meses y permanecen en ese valor hasta los cuatro años, ocurre luego una declinación gradual hasta alcanzar valores de 30% a los ocho años. En los adultos la concentración varía de 20 a 40% (1.5 a 4.0 x 10⁹/l) y después de los 65 años, los linfocitos disminuyen en ambos sexos.

Cómo ya se describió, la línea celular linfoide surge de la CTH pluripotencial que se encuentra en la médula ósea. Dicha célula da origen a dos células madres restringidas la linfoide y la mieloide. La primera se diferencia y madura, bajo la influencia inductiva de microambientes selectivos, en dos tipos de linfocitos de morfología idéntica, pero inmunológica y funcionalmente diferentes: linfocitos T y linfocitos B. (1)

Las CTH medulares pueden dar origen tanto a células mieloides como a células linfoides. Las segundas se diferencian probablemente a partir de una hipotética célula formadora de colonias linfoides que puede dar origen a dos tipos de linfocitos: unos que siguen la línea de diferenciación hacia linfocitos B, dentro de la misma médula ósea, y otros que tempranamente abandonan la médula ósea y se establecen temporalmente en el timo para seguir la línea de diferenciación hacia linfocitos T.

Los linfocitos que se convertirán en linfocitos B permanecen en la médula ósea y en este sitio experimentan una serie de cambios peculiares en su genoma. Para explicar estos cambios hay que recordar que las inmunoglobulinas o anticuerpos están constituídos por dos cadenas protéicas mayores (pesadas) y dos cadenas protéicas menores (ligeras). Las porciones terminales de una cadena pesada y una ligera forman, en conjunto, la zona de unión con los antígenos. Estas porciones son distintas para cada antígeno.

Una vez que en un linfocito en la médula ósea ha tenido este rearrreglo de los genes de las cadenas pesadas y ligeras (que incluye la eliminación de varios genes intermedios situados entre los genes que sí permanecen y se combinan), la célula es llamada linfocito "B". A continuación la célula se reproduce varias veces "horizontalmente" –es decir, sin cambiar su estado de maduración –, para formar una pequeña familia o "clona" de células, todas ellas con el mismo rearrreglo genético.

Las células de la clona empiezan a producir la inmunoglobulina peculiar que su rearrreglo genético también peculiar y azaroso determina; en esta etapa de maduración no secretan las moléculas de inmunoglobulinas, sino que las insertan en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, con las zonas de unión para el antígeno dirigidas hacia el exterior. Estas inmunoglobulinas de superficie funcionan como receptores específicos para el antígeno.

La unión del antígeno en las condiciones apropiadas determinará que estas células proliferen aún más, amplificando enormemente la clona, y que algunas de ellas inicien su maduración hacia células plasmáticas. Estas células ya no poseen inmunoglobulinas de superficie sino que las secretan. La clona que en el curso de la vida no se encuentra con su antígeno se produce en millones de células; azarosamente se determinan millones de clonas distintas, cada una de ellas con la capacidad para formar un tipo diferente de inmunoglobulina.

De la misma manera que los linfocitos B rearreglan genes que codifican para inmunoglobulinas, los linfocitos que migran al timo rearreglan en este sitio los genes que codifican para la porción terminal de las dos cadenas (α y β) que forman el receptor de las células T, una molécula parecida a una inmunoglobulina, que los linfocitos T utilizan como un receptor de membrana para antígenos, aunque nunca la secretan.

En el timo se producen millones de clonas diferentes de linfocitos T, cada una con un receptor de células T distinto. Cuando en el timo aparece un linfocito cuyo receptor de células T, por azar, es complementario con una molécula propia de ese órgano, ese linfocito es destruido. Simultáneamente al rearrreglo genético, los linfocitos T adquieren una de dos moléculas de membrana: o la proteína CD4 o la proteína CD8. Cuando salen del timo los linfocitos T poseen en su membrana tanto moléculas receptoras para antígenos (receptores de células T) como moléculas de "co-receptores" (CD4 o CD8, pero no ambas).

El número de representantes de cada clona de linfocitos T y B no es muy grande; como estas células no pueden estar simultáneamente en todos los sitios del cuerpo por donde pueden ingresar

los antígenos, viajan de un sitio a otro utilizando la sangre para transportarse. Estos son los linfocitos T y B “pequeños”, mal llamados “maduros”, que encontramos en la sangre. Las células tienen escaso citoplasma débilmente basófilo y su núcleo es pequeño, con cromatina gruesa irregularmente condensada sin nucleolos.

Los linfocitos pequeños normalmente observados en la circulación corresponden a células T (aproximadamente el 80%) y a células B (aproximadamente 20%), pero no pueden distinguirse morfológicamente entre sí con tinciones de Romanowsky. Los estudios de inmunocitoquímica con anticuerpos monoclonales, muestran que ambos tipos son similares: células pequeñas con escaso citoplasma débilmente basófilo y núcleo que ocupa un porcentaje grande del volumen celular, con cromatina gruesa, sin nucleolos. Los linfocitos B son positivos para CD20 y los T para CD3, entre otros.

Por otro lado, las formas maduras de ambos tipos celulares son diferentes y reconocibles morfológicamente. En el caso de los linfocitos T, una vez que una clona se ha puesto en contacto con su antígeno correspondiente a través de células presentadoras de antígenos apropiadas, las células empiezan a reproducirse para aumentar la población de la clona. Simultáneamente se inicia la maduración que comienza por la transformación de las células T a inmunoblastos.

Esta transformación blástica –que solamente se observa en los tejidos linfáticos– se produce porque ahora las células empiezan a sintetizar proteínas en mayor cantidad. En las porciones de cromatina desenrollada se sintetizan moléculas de RNA mensajero y de transferencia. En otras zonas se sintetizan moléculas de RNA ribosomal que se acumulan mientras maduran, formando los nucleolos. Una vez que los ribosomas han salido al citoplasma y se han unido a membranas para formar el retículo endoplásmico rugoso, el citoplasma adquiere un color basófilo intenso y aumenta de tamaño.

Cuando todo el aparato sintético de proteínas (RNAm, RNAt y ribosomal) se ha formado, la cromatina se vuelve a condensar y el núcleo toma forma oval o arriñonada. El extenso citoplasma basófilo muestra un contorno bien delimitado, poligonal, con porciones que frecuentemente se adosan (artificialmente) a las células adyacentes, en el frotis.

Estos los linfocitos T activados salen a la circulación y corresponden a las células antiguamente llamadas linfocitos “irritativos”, “atípicos” o “virocitos”, frecuentes en las infecciones virales. La mayor parte de estas células con esta morfología son linfocitos T CD8⁺ cuya función es la destrucción de células infectadas por virus y de células malignas. Los linfocitos CD4⁺ activados pueden tener una morfología similar, aunque en general son más pequeños y tienen un contorno menos poligonal. Muy ocasionalmente un linfocito B activado puede tener una morfología similar.

(2)

1.1.8. Plaquetas.

Las plaquetas, formadas en la médula ósea, derivan de la misma célula precursora (CFU-S) que las series eritroide y mieloide. Bajo influencia hormonal, esta célula precursora se diferencia en los precursores megacariocíticos. Se han identificado por lo menos dos etapas en la maduración de la célula precursora: la célula precursora megacariocítica inmadura y la célula precursora megacariocítica restringida (CFU-Meg), en su morfología, estas células aparecen como células linfoides pequeñas que pasan inadvertidas.

Un proceso regulador mantiene la concentración adecuada de plaquetas. La producción puede aumentar o disminuir en respuesta a un estímulo, que puede ser la masa plaquetaria y/o la masa megacariocítica. Cuando ese estímulo disminuye o aumenta, hay un aumento o disminución

inverso correspondiente en la concentración del factor regulador. Se han descrito dos factores reguladores, aunque se sabe poco de sus funciones, naturaleza química o mecanismo de acción. Al parecer, el factor estimulante de colonia megacariocítica (CSF-Meg) influye en el número de megacariocitos, lo más probable es que CSF-Meg actúe al nivel de la célula precursora, induciendo proliferación y diferenciación de la CTH pluripotencial. Al segundo factor, (posiblemente un grupo de factores) se le llama trombopoyetina, ésta influye, de manera primaria, en el tamaño final del megacariocito y, por lo tanto, en el número de plaquetas producidas.

La estimulación de receptores de la célula precursora por CSF-Meg desencadena la formación de un megacarioblasto. Esta célula blasto experimenta una secuencia de maduración que es diferente de la de las otras células medulares ya que la maduración nuclear se adelanta y completa mucho antes que principie la maduración citoplásmica, además, el proceso de maduración nuclear es único, ya que consiste en una serie de endomitosis. Con cada una de éstas, el contenido de DNA de la célula se duplica, pero la división celular no tiene lugar. Así, las células formadas tienen un contenido de DNA o ploidía de $4N$ a $32N$ ó, aún mayor. La etapa $8N$ es la primera reconocible en un frotis de médula ósea y es la clase de ploidía más común. (1)

En el megacariocito maduro se produce un fenómeno de división citoplásmica muy especial, formándose en principio segmentos más o menos grandes de citoplasma que contienen lo que después serán varias plaquetas; posteriormente estos segmentos se dividen en plaquetas individuales.

El proceso de segmentación citoplásmica se produce por la aparición de vacuolas limitadas por membranas que poco a poco coalescen, separando segmentos citoplásmicos.

Los megacariocitos lanzan proyecciones digitiformes de citoplasma hacia la luz de los sinusoides de la médula ósea, en donde se lleva a cabo el fenómeno de segmentación. Alternativamente penetran completos en la sangre periférica llegando a la microcirculación pulmonar en donde se produce la división citoplásmica; los núcleos restantes son fagocitados por macrófagos. (2)

I.2. DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.

El timo funciona de manera primaria durante la vida fetal y los primeros años de existencia; por lo tanto, el sistema linfoide T se desarrolla en su totalidad al nacer. La extirpación quirúrgica del timo después del nacimiento, no altera en forma grave la defensa inmunológica; sin embargo, la falta de desarrollo tímico en el feto (síndrome de Di George) provoca la ausencia de linfocitos T y un deterioro grave de la respuesta inmunitaria celular. Las células T confieren protección contra los antígenos que tienen la propiedad de esquivar el contacto con anticuerpos debido a que residen y proliferan dentro de las células huésped; por consiguiente, pueden producirse infecciones graves con parásitos, bacterias, hongos y virus intracelulares si hay deficiencia de linfocitos T. (1)

I.2.1. Desarrollo de las células mononucleares del sistema linfoide.

Los marcadores linfocitarios han permitido concretar el desarrollo de las células mononucleares del sistema linfoide. La mayor clase de linfocitos y células de las series monocito-macrófago originadas por CTH se encuentran en el tejido hematopoyético, incluyendo islas sanguíneas del saco vitelino, el hígado y bazo fetal y la médula ósea. Una CTH común da salida a células hijas las cuales se desarrollan, posteriormente, a lo largo de las líneas B o T. Los linfocitos T progenitores migran al timo, donde son sometidos a una serie de pasos de diferenciación bajo la influencia de sustancias semejantes a hormonas tales como la timopoyetina, un polipéptido que es producido por las células epiteliales del timo. Como los timocitos proliferan y se diferencian adquieren las glicoproteínas CD4 y CD8; ellos pierden el receptor desoninucleotidil transferasa terminal (dTt). El receptor de la célula T, T_i , tiene unión específica de la célula T. El CD3 modula la respuesta celular a la señal de unión del antígeno receptor de la célula T. Los genes para las proteínas del receptor T_i , α y β , son sometidas a reorganización durante el desarrollo tímico. Durante la reorganización, múltiples segmentos dispersados de los genes son reorganizados al azar dentro de una secuencia continua, sometidos a activación transcripcional, un proceso paralelo a aquellos genes de inmunoglobulinas reorganizados en la generación de diversidad inmunológica de los receptores T_i (3). Una parte de células precursoras linfoides de la médula ósea migra al timo, donde prolifera y se diferencia para adquirir las características celulares de linfocitos T. En esta etapa, la linfopoyesis no es dependiente de la estimulación antigénica. La extinción intratímica de linfocitos T potenciales es alta, alrededor de 95%; en consecuencia, sólo una porción pequeña abandona el timo, como linfocitos T inmunocompetentes. Al final de la maduración en el timo, los linfocitos T experimentan diversificación en células T cooperadoras (T_H) o linfocitos T citotóxicos/supresores (T_C o T_S). Estos subconjuntos tienen fenotipos y funciones distintas, pero su morfología no es susceptible de diferenciación. Más o menos 75% de linfocitos en la sangre periférica son células T. La proporción de células cooperadoras: supresoras en la circulación es de 2:1. (1)

Los subgrupos $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ son las células T cooperadoras/inductoras y supresoras/citotóxicas, respectivamente. Las moléculas CD4 y CD8 son invariables moléculas que reconocen antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad en el timo. (3)

Dentro del timo, los linfocitos T desarrollan la habilidad de reconocer antígenos extraños por una interacción con la expresión de sus propios antígenos en células epiteliales o macrófagos

tímicos. Siguiendo el desarrollo intratímico, los timocitos migran a los tejidos linfoides periféricos, donde son sometidos a una diferenciación adicional y son encontrados en la pulpa blanca del bazo, nódulos linfoides de la paracorteza y las áreas interfoliculares del tejido linfoide gastrointestinal, así como en la linfa y sangre. (3)

1.2.2. El timo.

El timo se desarrolla aproximadamente a la octava semana de gestación. Surge de la tercera y cuarta bolsas branquiales como un órgano epitelial poblado de células linfoides, los timocitos. El timo es un órgano bilobulado el cual incrementa su tamaño a lo largo de la vida fetal y posnatal hasta la pubertad, donde su peso es de aproximadamente de 40g. En la edad adulta, el timo involuciona y empieza a ser francamente atrófico en la edad adulta.

El timo está dividido en estructuras cortical y medular con una arquitectura lobular formada por secciones capsulares. La corteza del timo consta de timocitos pequeños y de mediano tamaño, células epiteliales y macrófagos. Los timocitos predominan en número, están densamente empaquetados y aparecen como linfocitos de tamaño un poco variable con dispersiones con raras mitosis. Las células epiteliales son notables, revelan conexiones interepiteliales y aparecen adheridas a timocitos, mientras los macrófagos están primeramente localizados cerca del cruce corticomedular. Se piensa que el epitelio tímico juega un papel en la inducción de maduración de los timocitos dentro de la corteza en el sitio de diferenciación tímica, y es en la corteza donde los linfocitos dependientes del timo (células T) adquieren los marcadores de superficie de las subpoblaciones CD4⁺ cooperadoras y CD8⁺ supresoras. En la médula las células T adquieren el antígeno de superficie CD3, la marca de células maduras. En el timo los linfocitos más desarrollados son destruidos; sin embargo, un pequeño porcentaje de linfocitos producidos en el timo dejan la médula finalmente y migran hacia la sangre de otros órganos.

La médula del timo forma la parte central del órgano y se extiende hacia cada división cortical lobular, la médula del timo contiene timocitos maduros y células epiteliales escamosas con pequeños cuerpos compuestos de degeneración parcial llamados corpúsculos de Hassall, los cuales son encargados de representar el estado final de diferenciación en el epitelio tímico medular.

Extractos de timo son capaces de inducir la aparición de marcadores entre las células de médula ósea en cultivo. La diferenciación de timocitos, por lo tanto, se sugieren encontrarse bajo la influencia de control hormonal parcial, tal como timopoyetina y timosina.

La sangre de venas capilares esta presente en la corteza del timo y médula, las venas de la corteza parecen relativamente impermeables a las proteínas plasmáticas cuando se comparan con venas medulares, quizá sirven para aislar timocitos maduros de la influencia exterior del timo.

Los protimocitos se originan en la médula ósea y migran al timo, donde la maduración ocurre, ésta es seguida de una adquisición secuencial por los timocitos de varios marcadores de las células T, dTT es encontrado en los protimocitos y en timocitos inmaduros, pero esta ausente en células T maduras, es encontrado en ciertas células linfoides neoplásicas, tales como en leucemia linfoblástica aguda y su presencia es provechosa en la clasificación de enfermedades de diferenciación tímica.

Con el envejecimiento, el timo empieza a atrofiarse, hay desaparición de poblaciones de timocitos y finalmente con evolución grasa, sin embargo, el timo conserva un grado de función durante la vida.

El timo en algunas especies esta listo para conferir maduración de los componentes T al nacimiento, y la subsecuente supresión del timo podría disminuir su efecto, sin embargo, ciertos

animales requieren la presencia del timo intacto por varios días después del nacimiento para la maduración del sistema de linfocitos T. La supresión del timo al nacimiento en estos animales resulta en un profundo defecto en la inmunidad mediada por células. (3)

1.2.3. Tejidos linfoides accesorios.

Los nódulos linfoides solitarios con estructuras folicular y centro germinal existen en la mucosa y submucosa del tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal (particularmente dentro del íleon), el tracto urinario y la vagina. Durante los estados de inflamación crónica, los nódulos linfoides con marcada actividad folicular podrían consistir en un centro localizado de función linfoide, los anillos de Waldeyer en tejidos linfoides faríngeos y las áreas de Peyer en el íleon contienen agregados prominentes de tejido linfoide. Estos órganos linfoides accesorios difieren del timo, nódulos linfáticos y bazo por la falta de una cápsula separadora del tejido linfoide de los tejidos circundantes. Las venas eferentes o aferentes no están presentes en los tejidos linfoides accesorios.

Las áreas o placas de Peyer encontradas en una capa delgada propia del intestino (debajo de la mucosa cerca de la unión ileocolónica) consisten de 50 o más nódulos linfáticos, los cuales podrían estar cubiertos por una capa sencilla de epitelio columnar. Ellas están bien desarrolladas en la juventud y sufren retroceso con la edad. Las áreas de Peyer y los nódulos linfoides genitourinarios y respiratorios están involucrados en la respuesta inmune al ataque local de la mucosa por antígenos afines a microorganismos y otras sustancias extrañas.

Los tejidos mucosos respiratorio y gastrointestinal son ricos en células plasmáticas y eosinófilos. Las células plasmáticas son un recurso de secreción de inmunoglobulinas, las cuales son transferidas entre los tractos bronquial y gastrointestinal. La mayoría de las células plasmáticas en la mucosa del bronquio e intestino contienen IgA, la cual es liberada de las células plasmáticas y después combinada con una sección secretora más semejante sintetizada en el epitelio mucoso. La IgA es secretada cruzando las microvellosidades del epitelio mucoso y previniendo la colonización patógena o membranas mucosas. Los nódulos linfoides a lo largo del tracto mucoso sirven como precursores de IgA produciendo células, y los nódulos linfoides actúan para preservar la integridad contra muchos microorganismos y antígenos. Los pliegues demasiado especializados de las células epiteliales en el intestino transportan material antigénico por pinocitosis con la subsecuente inmunización y secreción de IgA.

La función de los tejidos linfoides accesorios es ejemplificada con la examinación de pulmones e hígado. Los pulmones son expuestos a más de 10,000 litros de aire cada 24 horas, y este aire contiene un gran número de partículas. La inmunidad protege a través del sistema linfoide activo dentro del pulmón resultando en una secreción de IgA. Sin embargo el pulmón parece capaz de localizar la reacción inmunológica mediada por célula y también por anticuerpo, y el daño pulmonar podría ocurrir secundario a reacción inmunológica in situ. En algunos casos de asma o neumonía, por ejemplo, resulta en daño respiratorio severo. Uno de estos interesantes hallazgos de sarcoidosis respiratoria, una inflamación crónica granulomatosa de etiología desconocida, tiene la presencia de numerosos linfocitos T activados dentro de estructuras alveolares.

Las amígdalas están cubiertas por variadas superficies epiteliales, dependiendo de la localización del tejido, con profundidad, depresiones afluentes y las criptas. (3)

1.2.4. Linfopoyesis dependiente de antígeno.

Durante el desarrollo de los linfocitos T y B inmunocompetentes las células adquieren receptores específicos para antígeno, que los restringen a una especificidad antigénica. El contacto y fijación de este antígeno específico a los receptores sobre los linfocitos inmunocompetentes inicia una secuencia completa de fenómenos celulares conocida como transformación blástica (blastogénesis) El resultado final es una amplificación clonal de las células cuya función es la expresión manifiesta de la inmunidad a ese antígeno específico. La serie de fenómenos, que por lo general se desarrollan en un ganglio linfático incluye, crecimiento de la célula, aumento de la síntesis de DNA, ampliación de nucléolos, abundancia de retículo endoplásmico rugoso y mitosis. Al parecer, estas células transformadas, llamadas inmunoblastos, tienen la opción de diferenciarse en células con memoria o en células efectoras capaces de mediar la respuesta inmunitaria. (1)

- Linfocito reactivo.

Una forma de célula estimulada por antígeno es el linfocito reactivo. Aunque no existe la certeza de que ocupe un lugar en el proceso de la transformación blástica, puede ser un precursor del inmunoblasto. El linfocito reactivo exhibe diversas características morfológicas y por lo común su forma es excéntrica. Su tamaño es mayor que el de los linfocitos en reposo (no estimulados) con aumento de la basofilia difusa o localizada, que a menudo es intensa en la periferia de la membrana citoplásmica. Los gránulos azurófilos pueden ser más abundantes y en ocasiones hay vacuolas. La membrana citoplásmica sufre depresión con facilidad por los eritrocitos circundantes que le dan a la célula una forma festonada. El núcleo puede ser redondo, pero es oblongo, extendido e irregular con más frecuencia. La cromatina se hace más dispersa y su tinción es más clara que en los linfocitos en reposo. Es posible ver los nucléolos si el patrón de cromatina es fino y disperso (reticular). El linfocito reactivo se conoce también como estimulado, transformado, atípico, activado y leucocitoide. Es posible observar en la sangre de varones sanos algunos linfocitos reactivos, pero su concentración es mayor en las infecciones virales. Por esta razón, el linfocito reactivo se llama también virocito. (1)

- Inmunoblasto.

Este tipo celular es la siguiente etapa en la transformación blástica. Se caracteriza por nucléolos destacados y cromatina nuclear de patrón fino (aunque más burdo que la de otros blastos leucocitarios). El núcleo grande es por lo común central y se tiñe de color azul púrpúreo. El citoplasma, abundante, es de color azul intenso por la gran densidad de polirribosomas. La célula es grande y oscila entre 12 y 25µm.

Los linfocitos reactivos e inmunoblastos pueden ser linfocitos T o B. La definición final requiere estudios de marcadores celulares. En el pasado, los inmunoblastos y linfocitos reactivos se conocieron como células Downey y clasificaron como tipos I, II y III, dependiendo de varios criterios morfológicos. Esta clasificación es obsoleta porque los diversos tipos de células Downey son en realidad variaciones morfológicas que acompañan al proceso de transformación blástica.

El inmunoblasto prolifera incrementando el fondo común de células programadas para responder al antígeno original. Estas células hijas programadas (linfocitos efectores) maduran y median el brazo eferente de la respuesta inmunitaria. Las células hijas de inmunoblastos B, que median la inmunidad humoral, son los linfocitos plasmacitoides y las células plasmáticas. Se cree que el linfocito plasmacitoide (célula plasmática linfocitoide) es el precursor inmediato de la célula plasmática. Su nombre descriptivo deriva de su semejanza morfológica con el linfocito, pero posee una basofilia citoplásmica notable, similar a la de las células plasmáticas. Estas últimas tienen un

núcleo excéntrico con abundante cromatina aglutinada, citoplasma basófilo intenso y un área, sin teñir, parañuclear prominente (complejo de Golgi). Al contrario de la progenie del inmunoblasto B, las células hijas que se originan del inmunoblasto T, los linfocitos T efectores tienen una morfología distinta a la de los linfocitos originales sin sensibilizar. Cierta número de células hijas de inmunoblastos T y B puede formar, de manera alterna, células con memoria T y B. Las células con memoria tienen una morfología similar a la de linfocitos en reposo, retienen la memoria del antígeno estimulante y son capaces de provocar una respuesta inmunológica secundaria al desafiarlas otra vez el mismo antígeno.

Comúnmente, el linfocito reactivo se halla en la sangre durante una infección viral, sin embargo, el inmunoblasto, el linfocito plasmacitoide y la célula plasmática se encuentran sólo en ganglios linfáticos y otro tejido linfoide secundario. No obstante, estas células transformadas pueden encontrarse durante estimulación intensa del sistema inmunitario, encontrarse en la sangre periférica debido a la recirculación. (1)

1.2.5. Linfocitos T.

Las subpoblaciones linfocitarias se identificaron en un principio en virtud de sus receptores de superficie únicos. Estos últimos tienen una afinidad para fijar ciertos ligandos. La fijación de eritrocitos de carnero por linfocitos T ha sido el marcador más útil para identificar estos últimos. El receptor "E" en los linfocitos T se une a los eritrocitos de carnero formando una roseta, que tienen al linfocito como centro y los eritrocitos situados alrededor. Este receptor existe básicamente en timocitos maduros y en linfocitos T de la sangre periférica. Estos últimos poseen también receptores para la región Fc de IgM o IgG. Se pensó en un principio que receptores Fc diferentes identificaban subpoblaciones distintas de linfocitos T. Se sabe ahora que los linfocitos T pueden cambiar la especificidad de su receptor Fc durante la estimulación antigénica.

Es posible definir las distintas etapas de la diferenciación intratímica de los linfocitos T usando probadores para identificar la presencia de antígenos de diferenciación en la superficie celular. Por medio de anticuerpos monoclonales se ha comprobado que algunos determinantes antigénicos aparecen en una etapa muy temprana de la célula y desaparecen con la madurez, mientras que otros determinantes únicos se presentan en células más maduras. Con estos probadores se encontró que los linfocitos T en desarrollo pueden separarse en tres estadios intratímicos discretos: timocito inmaduro, timocito común y timocito maduro. Los primeros antígenos de célula T en aparecer en el timocito inmaduro son CD71 y CD38, puede presentarse CD2 más adelante en esta etapa o no aparecer hasta el estadio de timocito común. El determinante CD2 se encuentra también en los linfocitos T maduros de la sangre periférica. En condiciones normales CD38 no aparece en esta población; empero, después de infecciones virales o inmunizaciones, un elevado porcentaje de linfocitos circulantes posee el determinante CD38. Se pierde CD71 al pasar el timocito inmaduro a timocito común. Los determinantes de células T cooperadoras y supresoras CD4 y CD8, respectivamente, existen ya en el timocito común. El antígeno CD1 es único de la etapa de timocito común. La diferenciación en linfocitos cooperadores con determinante CD4 o linfocitos supresores con determinante CD8, no ocurre hasta la etapa de timocito maduro. Además de portar antígenos CD4 y CD8, todos los timocitos maduros contienen antígenos T1 y CD3. Estos antígenos existen también en linfocitos T de la sangre periférica. Alrededor de 75% de linfocitos T de la sangre periférica son cooperadores, predominan también en las células T de los ganglios linfáticos. Los linfocitos supresores constituyen sólo 35% de las células T de la sangre periférica, pero predominan en las células T de la médula ósea. La proporción normal CD4/CD8 en la sangre circulante es 2:1.

El equilibrio entre células CD4 y CD8 debe conservarse para actividad normal del sistema inmunitario. Esta proporción puede traducirse en infección viral, estados inmunodeficientes y síndrome de inmunodeficiencia adquirida. La proporción puede conllevar otros trastornos como enfermedad aguda de injerto contra huésped, esclerodermia y esclerosis múltiple. (1)

I.3. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS LINFOCITOS T.

El linfocito T, el linfocito B y el macrófago interactúan en una serie de eventos que permiten al organismo atacar y eliminar antígenos extraños. Esta serie de eventos se conoce en forma colectiva como la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T actúan en una parte de la respuesta inmunitaria que se conoce como inmunidad mediada por células. La inmunidad mediada por células, requiere interacción entre macrófagos histocompatibles, linfocitos T y antígeno. Es independiente de la producción de anticuerpo por linfocitos B. Por lo menos tres subpoblaciones funcionales importantes de linfocitos T intervienen en la respuesta inmunitaria: linfocitos T cooperadores, linfocitos T supresores y linfocitos T citotóxicos. Cuando a estas células se las estimula en la respuesta inmunitaria, proliferan y producen linfocinas. Las linfocinas son mediadores químicos secretados por los linfocitos T que influyen en la función de otros linfocitos, macrófagos y otras células corporales. Los linfocitos B se ocupan de la parte de la respuesta inmunitaria conocida como inmunidad humoral; es decir, producen anticuerpos. Para que la inmunidad humoral sea eficaz, el linfocito B periférico se debe activar para diferenciarse de una célula plasmática.

La capacidad del organismo para generar la respuesta inmunitaria contra un antígeno extraño particular se controla por los genes de la respuesta inmunitaria que se localizan en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en el cromosoma 6. Estos genes codifican a antígenos de histocompatibilidad que se encuentran, en la superficie de todas las células nucleadas. El término para describir al conjunto genético CMH en el hombre es el de región del antígeno leucocitario humano (HLA). Los genes HLA se localizan en regiones específicas dentro del complejo conocidas como HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D y HLA-DR. Las regiones se clasifican de acuerdo con su estructura y actividad específicas en la respuesta inmunitaria. Los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C codifican las proteínas de reconocimiento clase I de la superficie celular (prácticamente en todas las células nucleadas). Estas proteínas son necesarias para que los linfocitos T_C distinguan lo propio de lo no propio. Los genes HLA-D y HLA-DR codifican los antígenos de clase II en linfocitos B, monocitos, macrófagos y linfocitos T activados. La región D codifica las proteínas que determinan la habilidad de las células inmunológicas para cooperar e interactuar en la respuesta inmunitaria. Los genes -DR afectan la capacidad de las células para responder a inmunógenos específicos. Los genes clase III codifican los componentes del sistema del complemento.

Por lo general, la respuesta inmunitaria empieza con el reconocimiento del antígeno por los macrófagos, seguido por fagocitosis y degradación del antígeno. En este proceso ciertos determinantes inmunológicos críticos son preservados y presentados a los linfocitos T_H . Estos linfocitos T cooperadores se unen al antígeno y a las moléculas DR clase II, ubicadas en la superficie del macrófago. El macrófago activado elabora una monocina, interleucina-1 (IL-1). La fijación del antígeno, más el efecto de IL-1, desencadena una secuencia de modificaciones bioquímicas y morfológicas en el linfocito T_H que conduce a proliferación y diferenciación de linfocitos T sensibilizados en forma específica. El linfocito T_H sensibilizado (activado) secreta interleucina-2 (IL-2) y también otras linfocinas que afectan a otros linfocitos y macrófagos. Además, los linfocitos T_H activados desarrollan receptores para IL-2 en su superficie, de modo que la célula se une a IL-2 y empieza a proliferar.

Se cree que los linfocitos T_S así mismo poseen receptores para IL-2 y la fijación de esta linfocina estimula la actividad de estas células. Los linfocitos T_S actúan suprimiendo la respuesta inmunitaria y pueden reprimir a otros linfocitos T o detener la producción de anticuerpos en los linfocitos B.

Dentro de la población de linfocitos T están los linfocitos citotóxicos (T_C), conocidos también como células T efectoras. Normalmente, en el individuo sano, hay muy pocos linfocitos T_C que funcionan en la citólisis restringida específica de antígeno CMH clase I. La adherencia del antígeno y las moléculas clase I del macrófago más la fijación de IL-2 a receptores específicos sobre linfocitos T_C estimula la proliferación de la célula. El linfocito T_C reconoce y destruye a las células autólogas, modificadas por virus. Se cree también que este linfocito interviene en la respuesta injerto contra huésped como ocurre en individuos con trasplantes alogénicos. En la enfermedad injerto contra huésped, el receptor inmunorreprimido no puede desarrollar una respuesta inmunitaria contra el tejido injertado, éste contiene linfocitos T_C capaces de atacar a los antígenos del huésped.

Además de la producción de linfocitos T activados que participan en forma directa en la inmunidad mediada por células, cada tipo de linfocito T puede producir células con memoria. Estas últimas retienen la del antígeno estimulante; cuando el mismo antígeno se pone otra vez en contacto con ellas obtienen una respuesta inmunológica rápida y eficaz.

La actividad funcional del linfocito B incluye la síntesis y secreción de anticuerpos. La inmunoglobulina de superficie en el linfocito B sirve como receptor para el antígeno procesado, unido al macrófago y al linfocito T_H . Las moléculas HLA-DR del linfocito B se adhieren a los receptores HLA-DR del linfocito T_H . Este complejo de tres células, linfocito T_H , macrófago, linfocito B, inicia la transformación blástica de linfocito B. El inmunoblasto continúa hasta la célula plasmática secretora de anticuerpo. El linfocito T_H activado produce un factor de crecimiento de la célula B que la estimula a proliferar, además de madurar a célula plasmática, el linfocito B activado puede generar células B con memoria, es importante que para que se produzca esta respuesta inmunitaria los linfocitos T_H deben reconocer y unirse no sólo al antígeno sino también a las moléculas HLA-DR en la superficie del macrófago y del linfocito B.

Los antígenos poliméricos de unidades idénticas repetidas pueden estimular en forma directa al linfocito B sin la ayuda de linfocitos T_H . Estos polímeros se conocen como antígenos independientes de T. Antígenos más complejos requieren la participación del linfocito T_H y se conocen como antígenos dependientes de T.

Es evidente que la activación de la respuesta inmunitaria, la eliminación exitosa del antígeno y la supresión subsiguiente de la respuesta, requieren la interacción de macrófagos histocompatibles, linfocitos T y linfocitos B. Las alteraciones en este sistema complejo pueden perturbar la respuesta inmunológica normal. Las infecciones recurrentes o la incapacidad para combatir a los microorganismos reflejan inmunodeficiencia. Se pueden presentar también trastornos que impidan que los linfocitos distinguan los antígenos propios de los extraños, las consecuencias clínicas de este problema son las enfermedades autoinmunitarias. (1)

1.3.1. Receptores de antígeno de los linfocitos T.

El receptor de antígeno en la mayoría de las células T está formado por dos polipéptidos, denominados α y β con dos uniones disulfuro a cada una y asociadas con un grupo invariable de proteínas llamadas CD3 en la membrana plasmática. Los receptores comprometidos de la célula T por la unión resulta en un incremento en los niveles de calcio intracelular, baja del fosfatidilinositol y finalmente la activación y proliferación de la célula T. A través de este proceso, una clona de células T específica para un ligando particular podría incrementar la ayuda para la destrucción inmune de la invasión de organismos con relación a ese ligando.

Las proteínas receptoras de antígeno de las células T están estructuralmente relacionadas a moléculas de inmunoglobulina. En adición a la secuencia hidrofóbica de 18 a 29 aminoácidos, cada cadena tiene un dominio amino terminal de 102 a 119 aminoácidos denominada región variable. Esta designación refleja la variación de la estructura primaria de esos dominios entre diferentes receptores polipeptídicos de células T, cada cadena tiene una región carboxi terminal de 87 a 113 aminoácidos, denominada región constante porque esta región es invariable entre cadenas de la misma clase. Debido a su papel como receptores de superficie de membrana, cada cadena tiene un péptido pequeño conector, una región transmembranal de 20 a 24 aminoácidos y una pequeña región citoplásmica de 5 a 12 carboxiterminal.

Como en los dominios de inmunoglobulinas, cada región variable y constante contienen residuos de cisteína en posiciones consistentes con la presencia de un disulfuro localizado centralmente en los aminoácidos 63 a 69. La secuencia en comparación con inmunoglobulinas indica que varios aminoácidos están altamente conservados, incluyendo las interacciones dominio-dominio, que son conservadas en los receptores de las cadenas de células T. El algoritmo que da una secuencia primaria de aminoácidos hidrofílica, hidrofóbica y la formación potencial de uniones β plegada y α hélices sugieren que las cadenas de receptores de células T tienen un doblez similar a las configuraciones terciarias, como las cadenas ligera y pesada en las moléculas de inmunoglobulina. (3)

1.3.2. Heterodímeros α y β .

El receptor de células T es el heterodímero $\alpha\beta$, compuesto de una α glicoproteína ácida de 39 a 46 kDa y una básica, β glicoproteína de 40 a 44 kDa unida con puentes disulfuro entre las regiones constantes de las dos cadenas. Al ser trasladadas dentro de la proteína, ambas cadenas son glicosiladas y ensambladas en un dímero para la subsecuente expresión en la superficie celular. Cada una de las cadenas de genes α y β contienen por lo menos tres sitios para la glicosilación. El tamaño máximo de la superficie celular deglicosilada que forman las subunidades de α y β son de 27 kDa y 32 kDa respectivamente. (3)

I.3.3. Heterodímeros $\gamma\delta$.

Un pequeño porcentaje de células T periféricas y timocitos, expresan un heterodímero receptor diferente, compuesto de dos glicoproteínas designadas γ y δ . Como el heterodímero $\alpha\beta$ e inmunoglobulinas, el heterodímero $\gamma\delta$ está clonalmente distribuido. Similares al heterodímero $\alpha\beta$, las cadenas $\gamma\delta$ se expresan en asociación con el complejo CD3 y parecen capaces de estimular la activación de células T cuando se une al ligando específico. Juntas las dos cadenas tienen características estructurales y de tamaño similares a aquellos del heterodímero $\alpha\beta$. (3)

I.3.4. Genética del heterodímero receptor del linfocito T.

Similar a los genes de inmunoglobulinas, cada cadena del receptor de la célula T es codificada por elementos genéticos que se reorganizan durante el desarrollo. Se localizan en la banda q35, en el brazo largo del cromosoma 7, el complejo de la cadena β tiene dos genes unidos cercanamente, cada uno capaz de codificar la región constante de la cadena β . La región constante de cada gen se asocia con un grupo funcional de segmentos de genes J β y un segmento sencillo D β . El gen funcional codifica la región variable de la cadena β que está construido por el rearreglo de alguno de los aproximadamente 50 segmentos de genes de la región variable a cualquiera de las dos regiones D β y una de las 13 regiones J β . El complejo de la cadena α está localizado en la banda q11.2 en el brazo largo del cromosoma 14 y por consiguiente está unido al complejo de la cadena pesada de la inmunoglobulina. El gen del complejo de la cadena α consiste en una región constante, de menos 50 segmentos diferentes de la región J, y aproximadamente 50 genes diferentes de la región variable. El gen funcional codifica la región variable de la cadena α y se deriva de la yuxtaposición de cualquiera de esos segmentos de la región variable, con uno de los segmentos J α a través del rearreglo que generalmente incluye la delección del DNA. Los genes que codifican la cadena δ están actualmente localizados entre los segmentos de la región variable y los segmentos J de la cadena α y usualmente son deletados durante el rearreglo de la cadena α . El complejo del gen γ está localizado en la banda p15 en el brazo corto del cromosoma 7. Este complejo consiste de por lo menos 12 segmentos de genes de la región variable, dos virtualmente idénticos a los segmentos J y dos segmentos de genes de región constante.

La variedad del receptor de la célula T para antígeno se realiza por varios mecanismos, algunos de los cuales son los mismos que generan la variedad entre moléculas de inmunoglobulinas. La unión de dos elementos diferentes V, D y J para producir el gen completo V, la presencia de errores hechos durante la recombinación de estos elementos genéticos y la variedad combinatoria permitida por las uniones al azar de dos cadenas codificadas por diferentes complejos de genes de todas las funciones para elevar la variedad del repertorio de los receptores de antígeno de las células T. Una importante diferencia entre los mecanismos usados para elevar la diversidad de receptores de las células T y B es el caso de la mutación somática. Este proceso aparentemente ocurre únicamente en los genes de inmunoglobulinas que han sufrido rearreglos, y no operan en los genes de la región variable del receptor de la célula T.

Durante la diferenciación de la célula T, las células inmaduras pasan a través del timo donde son "informadas" para su propia distinción con relación a las proteínas de superficie celular del CMH. El ligando para el receptor de la célula T actualmente procesa el antígeno presentado por las

proteínas del CMH. Una interacción cercana con las moléculas del CMH podría perderse si los genes de la región variable del receptor de la célula T permitiera discrepar significativamente del repertorio de la línea germinal heredada. La mutación somática de los genes de la región variable de la expresión del receptor de la célula T constituye el proceso de activación de la célula T presentando su propio antígeno por las propias moléculas de CMH permitiendo quizás la enfermedad autoinmune. (3)

1.3.5. El complejo CD3.

Una asociación cercana y requerida para la expresión de superficie de dos polipéptidos del receptor de la célula T es el complejo de polipéptidos de CD3. Este complejo está compuesto de por lo menos tres cadenas distintas designadas CD3- γ , CD3- δ y CD3- ϵ , los genes que codifican cada una de estas cadenas están agrupadas en la banda q23 en el brazo largo del cromosoma 11. El CD3- γ tiene un polipéptido que es el principal de 16 kDa que está muy glicosilado con masa molecular de 25 a 28 kDa. CD3- δ y CD3- ϵ tienen cada uno una masa molecular de 20 kDa. El CD3- δ es una glicoproteína que consiste de 30% de carbohidratos, en contraste, el CD3- ϵ no está glicosilado. Los CD3- γ y CD3- δ son grandemente homólogos y ambos tienen el nivel de secuencia de la proteína y el ácido nucleico. La secuencia del ácido nucleico para CD3- γ y CD3- δ tienen señales típicas de péptidos, dominios extracelulares hidrofílicos de 79 a 89 aminoácidos, una región transmembranal hidrofóbica y un dominio intracelular hidrofílico de 44 aminoácidos. El CD3- ϵ es similar, con una señal de 22 residuos de péptido, un dominio extracelular de 104 aminoácidos, un dominio transmembranal y un dominio intracelular comparativamente largo de 81 aminoácidos. Ninguno de estos polipéptidos tienen homología con las inmunoglobulinas, indicando que los genes que codifican las cadenas del complejo CD3 no pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas. Las tres cadenas tienen carga negativa a aminoácidos en la porción central de la región transmembranal hidrofóbica que podría estabilizar el complejo CD3 con las dos cadenas del receptor de la célula T.

Estudios recientes han identificado nuevos miembros de la familia de polipéptidos de CD3. Mediante la búsqueda de homólogos humanos en una cosecha de polipéptidos de CD3 de ratón, se descubrió un polipéptido de 16 kDa no glicosilado designado CD3- ζ . Este polipéptido podría estar débilmente asociado con el complejo CD3, éste no puede ser coimmunoprecipitado con anticuerpos del receptor de la célula T u otros polipéptidos de CD3. Otros polipéptidos, designados CD3- ω han sido identificados en asociación con el complejo CD3 durante la biosíntesis, pero no viajan con el receptor a la membrana plasmática. Esta proteína se piensa tiene un papel en la unión y transporte del receptor intacto CD3/complejo receptor celular. Estudios futuros podrían revelar otras proteínas que están asociadas débilmente con este importante complejo de polipéptidos.

El complejo CD3 requiere de señales de transducción del heterodímero $\alpha\beta$ a proteínas asociadas a la membrana plasmática intracelular. En la unión a ligandos específicos, el heterodímero $\alpha\beta$ del receptor de la célula T podría sufrir cambios estéricos que resulten en la fosforilación de los dominios intracelulares de algunas cadenas polipeptídicas en el complejo CD3. Junto con estas perturbaciones del complejo $\alpha\beta$ /CD3 puede resultar la activación a través de la cascada de eventos bioquímicos. Tal como las proteínas de superficie de CD3 son componentes funcionales integrales del complejo receptor de la célula T. (3)

I.3.6. Moléculas de adhesión accesorias.

Al lado de las moléculas CD3/receptor de célula T, varias otras proteínas de superficie son necesarias para el reconocimiento eficiente del antígeno de la célula T. Estas proteínas de superficie pueden ser denominadas moléculas de adhesión accesorias, ellas facilitan la adhesión de la célula T a su apropiada célula presentadora de antígeno (CPA) o célula blanco. Para facilitar la adhesión celular, estas moléculas accesorias permiten al complejo antígeno receptor de la célula T a interactuar mejor con las glicoproteínas del CMH o de otras células, permitiendo el reconocimiento eficiente del antígeno de la célula T y la activación. Debido a que cada miembro de este grupo de moléculas accesorias tiene distintas afinidades para la expresión de moléculas de superficie por CPA o célula blanco, la expresión diferencial de estas moléculas accesorias podría desarrollar diferencias en la especificidad antigénica y/o tipos celulares con los cuales las células T interactúan, como tal, la expresión diferencial de estas moléculas accesorias por células T periféricas podría definir la distinción fisiológica de subgrupos de células T.

- Moléculas accesorias CD4 y CD8.
 - + Timocitos precursores.

CD4 y CD8 son unas importantes moléculas accesorias expresadas por todas las células T precursoras. Sólo una pequeña fracción de timocitos no expresa ni CD4 ni CD8. Estas células se cree que son derivadas de precursores de la médula ósea a la inmensa mayoría de timocitos que expresan ambos CD4 y CD8. Los timocitos maduros y todas las células T periféricas expresan CD4 ó CD8, pero no ambos.

- + Células T cooperadoras y supresoras (citotóxicas).

La expresión que se anula entre sí de CD4 ó CD8 define los dos grupos sanguíneos mayores de células T. Las células T que únicamente expresan el antígeno de superficie de CD4 son designadas células cooperadoras. Estas células normalmente comprenden el 65% de células T sanguíneas, generalmente, las células T cooperadoras producen linfocinas por la activación de antígenos extraños presentados por las moléculas del CMH expresado en la superficie de CPA. Las células sanguíneas que expresan CD8 son designadas células supresoras. Estas normalmente constituyen 25 a 35% de la población de células T periféricas. Los linfocitos T citotóxicos (LTC) tienen como función de estas células es de lisar células blanco que albergan antígenos de superficie para los cuales son específicos.

- + Características moleculares de CD4 y CD8.

La caracterización molecular de CD4 y CD8 revela que estas glicoproteínas comparten características estructurales con otras moléculas receptoras codificadas por genes dentro de la familia de inmunoglobulinas. El receptor CD8 es una glicoproteína de 32 kDa codificada por un gen que está estrechamente ligado a la cadena ligera κ de la inmunoglobulina localizada en la banda p12 en el brazo corto del cromosoma 2. La secuencia de la proteína del dominio amino terminal de CD8 comparte más del 28% de semejanza con las regiones variables de la cadena ligera κ . Este dominio es llamado semejante a la región variable (V-s). Siguiendo este dominio V-s, las moléculas CD8 tienen una pequeña región rica en prolina, treonina y serina como las de la región bisagra de la

inmunoglobulina. Esta región también contiene sitios para glicosilación y es anclada por una región transmembranal hidrofóbica. La molécula de CD8 tiene un aminoácido citoplásmico terminal que consiste en residuos de bases. Dentro del dominio V-s dos cisteínas forman un puente disulfuro que estabiliza el doblez de la inmunoglobulina. Un residuo de cisteína adicional está localizado dentro del dominio V-s, la región bisagra, segmentos transmembranales y citoplásmicos. Estas cisteínas forman puentes disulfuro intermoleculares entre dos o más moléculas de CD8, estos puentes estabilizan los homodímeros y multímeros de CD8 que están expresados en la superficie de la célula T. Los homodímeros expresados en la superficie de la célula CD8 comparten aproximadamente la misma geometría como heterodímeros de inmunoglobulina de cadenas pesada y ligera. CD4, por otra parte, no forma tales homodímeros. Es una glicoproteína monomérica de 55 kDa que es codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 12. Este consiste en 5 dominios externos, un tramo de residuo transmembranal hidrofóbico y una parte terminal de 40 residuos. Similar a CD8, el dominio amino terminal de CD4 también tiene semejanza a las regiones variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. Sin embargo, siguiendo este dominio V-s es un dominio de 270 aminoácidos ligeramente parecidos a otras proteínas codificadas por genes de la familia de inmunoglobulinas. Junto con este dominio de 270 aminoácidos, el dominio V-s de la molécula CD4 aparentemente forma un heterodímero intramolecular en la superficie de la célula T.

+ Función de CD4 y CD8.

Los receptores CD4 y CD8 facilitan el reconocimiento del antígeno de la célula T por la unión a glicoproteínas del CMH. La molécula CD8 se une a regiones no polimórficas del CMH clase I (HLA-A, B o C) y la molécula de CD4 se une a regiones no polimórficas del CMH clase II (HLA-D región codificada por moléculas: DP, DQ y DR). Estas moléculas aparentemente son el foco de moléculas del CMH por una CPA o célula blanco sobre la superficie de la célula T, permitiendo el reconocimiento específico del antígeno "procesado" que es el puente con las glicoproteínas del CMH. Debido a que CD4 y CD8 difieren en sus uniones específicas con el CMH, las células T que expresan CD4 o CD8 reconocen únicamente antígenos presentados por las clases I ó II del CMH, respectivamente.

En adición, las moléculas de CD4 y CD8 también pueden aumentar su respuesta antigénica por la transducción de una señal directamente o conjuntamente con el complejo CD3/receptor de célula T. La región citoplásmica de CD4 es conservada entre vertebrados, sugestiva de que esta región es esencial para la función de la molécula de CD4. Esta región contiene cinco serinas y una treonina o más de las cuales es fosforilada por la proteína cinasa C expuesta sobre las células T a ésteres de forbol o antígenos específicos. Subsecuentemente a la fosforilación, la glicoproteína CD4 es internalizada concomitantemente con la activación de la célula T. Similarmente, la proteína CD8 también posee una alta carga y conserva el dominio citoplásmico que podría estar involucrado en la señal de transducción transmembranal. Los receptores CD4 y CD8 actualmente podrían ser componentes integrales de la función del receptor del complejo de la célula T necesario para desencadenar la activación de la célula T y/o función sobre la exposición a antígeno específico.

La molécula CD4 es el receptor para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Los anticuerpos monoclonales específicos para la glicoproteína CD4 bloquean la infección por VIH. Además, mediante ingeniería genética del CD4 soluble puede competir con el CD4 de la superficie celular para la unión de VIH. La internalización de CD4 sobre la activación de la célula T se cree facilita la entrada del virus a estas células T que son estimuladas específicamente en un antígeno de respuesta inmune.

+ Subgrupos de células T CD4.

La población CD4⁺CD8⁻ podría estar dividida más adelante en los subgrupos de células T CD4 “supresor-inductor” y “cooperador-inductor” usando anticuerpos monoclonales reactivos con la diferenciación de dos antígenos de superficie, designados CDw29 y CD45R. Estos antígenos de superficie son proteínas con masa molecular de 130 kDa y 200/220 kDa, respectivamente. Las células T CD4 supresor-inductor expresan altos niveles de CD45R y muy bajos niveles de CDw29. Estas células aparentemente podrían suprimir las respuestas de anticuerpos específicos manejados por la clona de la línea de células T cooperadoras-inductoras y también podrían dirigir un tipo de hipersensibilidad retrasada y citotoxicidad mediada por células. La clona de las líneas de las células T supresoras-inductoras producen interleucina 2, γ -interferón y linfotoxina. La población de células T CD4 cooperadoras-inductoras, del otro lado, expresan pequeña o nada CD45R y altos niveles de CDw29. Estas células aparentemente podrían proveer actividad de ayuda para respuesta específica de células B pero no pueden mediar la supresión, hipersensibilidad retrasada o citólisis. Las clones de células T cooperadoras-inductoras producen interleucina 4 y 5. Esta dicotomía funcional aparente señalada en diferentes líneas de células T CD4 se relacionan con los niveles relativos de la expresión de CDw29 y CD45R y es evidente que estas moléculas de superficie contribuyen a las propiedades funcionales de estos dos subgrupos de células T CD4. (3)

I.3.7. Función de los linfocitos asociada a glicoproteínas.

Las moléculas de función asociada a linfocitos son una importante familia de glicoproteínas que facilitan la adhesión eficiente célula-célula. Las moléculas son primeramente identificadas con anticuerpos monoclonales que podrían bloquear la función de la célula T, tal como la citotoxicidad mediada por linfocitos T eliminando a células blanco. De esos rápidos experimentos tres moléculas mayores de superficie fueron identificadas y designadas LFA-1, LFA-2 y LFA-3. Siguiendo la convención internacional, LFA-2 podría estar referida a CD2.

La molécula LFA-1 pertenece a una familia de glicoproteínas relacionadas: LFA-1, MAC-1 y p150 y 95. Cada proteína consiste de una subunidad distintiva no covalente asociada con una subunidad β común glicoproteína de 95 kDa. La subunidad α de LFA-1, designada CD11a, es una glicoproteína de 180 kDa. Esta molécula de 180 kDa es expresada sobre un tercio de todas las células de la médula ósea, todas las células T, células B y células asesinas naturales (NK). La subunidad α de MAC-1 es una glicoproteína de 170 kDa, designada CD11b. MAC-1 es expresado en las células asesinas naturales, monocitos, macrófagos, granulocitos y pequeñas poblaciones de células T y B. La subunidad α de p150, 95, designada CD11c, es una glicoproteína de 150 kDa que no se expresa en los linfocitos T.

La familia de glicoproteínas de LFA-1 son importantes moléculas de adhesión. La subunidad β tiene una extensa secuencia homóloga a la subunidad β del receptor de adhesión de las plaquetas. La glicoproteína IIb/IIIa y la subunidad β de una familia de proteínas de adhesión relacionadas al los antígenos de muy lenta activación (ALA). Muchos de estos receptores funcionan en interacciones célula-célula y reconocen sus ligandos como sitios que contienen la secuencia de aminoácidos de Arg-Gly-Asp. La subunidad α lo hace más selectivamente, porque esta subunidad α se une mejor al ligando de la superficie celular llamada molécula de adhesión intercelular 1 (MAI-1). Este ligando

es una glicoproteína de 90 a 114 kDa expresada en las células endoteliales, linfocitos, fibroblastos y monocitos. MAC-1, por otro lado, es el receptor del complemento "CR3", un receptor del fragmento inactivado de C3b. Como tal, MAC-1 aparentemente está comprometido en el reconocimiento de las principales opsoninas para fagocitosis.

La familia de glicoproteínas de LFA son necesarias para la función de células T y presentador de inmunidad. Los anticuerpos monoclonales específicos para LFA-1 podrían inhibir directamente la citólisis de las células T de células blanco. Unas pocas clonas de células T CD8⁻ o CD4⁺ citolíticas expresan MAC-1. Anticuerpos contra CD11b podrían inhibir la formación del conjugado entre estas clonas de células T y sus células blanco específicas y por consiguiente bloquear la citotoxicidad mediada por linfocitos T. Finalmente, pacientes con una deficiencia heredada de su habilidad para producir la subunidad β común sufren infecciones bacterianas y fungoides recurrentes que amenazan su vida, y raramente sobreviven más allá de la infancia. El receptor CD2 es una glicoproteína de aproximadamente 50 kDa encontrada en todos los linfocitos T, linfocitos grandes granulares y timocitos, el CD2 facilita la adhesión célula-célula por unión a LFA-3, en una glicoproteína de superficie de 55 a 70 kDa que está expresada en eritrocitos y leucocitos, también como en células endoteliales, células epiteliales y células del tejido conectivo en muchos órganos estudiados. Los anticuerpos monoclonales que unen a CD2 podrían inhibir una variedad de funciones de linfocitos T, incluyendo especificidad antigénica mediada por citólisis de linfocitos T y respuesta proliferativa de linfocitos T a lectinas, aloantígenos y antígenos solubles. Anti-CD2 inhibe la citotoxicidad mediada por linfocitos T por unión a la célula T antes que a la célula blanco, la cual generalmente no expresa el CD2. Por otra parte, los anticuerpos dirigidos contra LFA-3 inhibe la citotoxicidad mediada por linfocitos T por unión a LFA-3 en la célula blanco, por consiguiente bloquea la interacción de CD2 con LFA-3. Experimentos indican que las células T podrían ser activadas por ciertos anticuerpos monoclonales contra CD2, aparentemente independientes del complejo CD3/receptor de célula T. Por consiguiente, aparte de ser un receptor para LFA-3, el CD2 podría jugar un papel principal en la señal de transducción transmembranal a la activación de la célula T en respuesta al antígeno. (3)

I.4. MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LINFOCITOS POR SUS MARCADORES DE SUPERFICIE.

I.4.1. Fenotipos inmunológicos.

Mediante la aplicación de técnicas inmunológicas para la detección de expresión diferenciada de moléculas en particular, líneas celulares, ha revolucionado la caracterización de células; las líneas celulares, estado de maduración y grado de activación o modulación con respecto a varios estímulos. En cada línea hematopoyética, como las células leucémicas, se representan estados particulares de diferenciación, que pueden ser caracterizados de acuerdo a su fenotipo. En algunos casos estos datos ya se correlacionan con terapia y resultado.

En sangre, los linfocitos B típicos son detectados por inmunoglobulinas de membrana (Igm) que es similar en estructura extramembrana al suero de inmunoglobulinas. Los linfocitos T carecen de estas moléculas, inversamente, los linfocitos T típicos son receptores de antígenos nominales. Estos receptores son homólogos a las moléculas de inmunoglobulinas pero son relativamente difíciles de detectar por reactivos convencionales. En adición, hay una variedad de diferentes moléculas en células B y T y sus subgrupos son reconocidos por anticuerpos monoclonales.

Entre las otras células nucleadas en la sangre, los monocitos y granulocitos son diferenciados principalmente de los linfocitos por su función fagocítica, separabilidad física por adhesión o densidad y características morfológicas, así como también una variedad de estructuras de superficie reconocidas también por anticuerpos monoclonales o interacciones ligando-receptor.
(4)

I.4.2. Indicaciones clínicas.

- Evaluación de linfocitos.

Varias áreas clínicas requieren una evaluación de linfocitos. La determinación de una proliferación maligna podría requerir, una evaluación de sangre periférica, un análisis de aspirado de médula ósea o linfocitos obtenidos de un nódulo linfático u otras biopsias.

Los linfocitos B se elevan en una gama de malignidades linfoproliferativas que varían de una leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y macroglobulinemia de Waldenström, una variedad de linfomas y mieloma múltiple.

Una segunda área de aplicación clínica es la sospecha de deficiencia del sistema inmune. La atención es generalmente dirigida a deficiencias inmunes por infecciones recurrentes e inusuales, fiebre inexplicable, pérdida de peso y linfadenopatía o la presencia de ciertos factores de riesgo que predisponen al paciente a la deficiencia inmune. Una variedad de fallas diferenciadas adquiridas (tal como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA), heredadas y defectos funcionales están incluidos en este grupo. Sin embargo, las deficiencias más comunes son las que se acompañan de procesos normales de envejecimiento y a los cuales únicamente la atención ha sido dirigida. La evaluación de ambos marcadores linfocitarios y células accesorias del sistema inmune tales como monocitos, acoplados con las pruebas apropiadas de función de linfocitos, podrían permitir una correcta definición de la naturaleza de los más graves defectos celulares y una predicción de las

complicaciones probables para el paciente. Estas pruebas podrían formar las bases de un planteamiento para corregir o compensar la deficiencia.

Una tercera área que requiere la evaluación de linfocitos incluye una gran variedad de enfermedades agudas y crónicas asociadas con la evidencia de alguna alteración en el sistema inmune. El uso de una variedad de anticuerpos dirigidos a antígenos activados permite un análisis del estado del comportamiento del sistema inmune. En algunas enfermedades, tales como mononucleosis infecciosa, el objetivo del estudio es la caracterización de la respuesta celular a un organismo conocido. En otras infecciones, tales como la lepra o enfermedades parasitarias, el objetivo es definir los elementos de la respuesta de una infección inmune. (4)

I.4.3. Procedimientos de la prueba y reactivos.

- Preparación celular.

Separaciones por densidad. El método de Ficoll-Hypaque es usado para separar células mononucleares de células polimorfonucleares. Este método es utilizado con sangre, otros fluidos o células de tejido disociadas. Este proceso consiste en una secuencia de centrifugaciones y separaciones por densidad de la parte mononuclear y el posterior lavado de ésta, para eliminar la toxicidad celular a la que están expuestas por el procedimiento. La gran mayoría de tipos celulares de tejidos celulares disociados son aislados con la fracción celular mononuclear. En general, es necesario tener cuidado para obtener 70% o más de la fracción mononuclear para asegurar resultados representativos y también se debe poner atención a la fuerza y duración de la centrifugación y la manera mediante la cual el sobrenadante es desechado o eliminado es importante. Una cuenta total celular con fórmula diferencial del material antes de la centrifugación por densidad podría ser usada en las muestras para permitir el cálculo de la cuenta celular actual, la viabilidad podría ser del 100%. El procedimiento necesita llevarse a cabo bajo condiciones de esterilidad, los reactivos deben estar libres de contaminación bacterial y fungoide, los neutrófilos podrían ser obtenidos de la fracción eritrocítica del gradiente de Ficoll-Hypaque. Después, todo el sobrenadante es aspirado, los eritrocitos son selectivamente lisados por la adición de una solución de cloruro de amonio, y los neutrófilos remanentes son lavados en el medio de tinción deseado.

Las muestras de sangre de individuos que no son sanos podrían requerir modificaciones en el procedimiento de preparación celular. Por ejemplo, en artritis reumatoide u otros estados de inflamación similar, las plaquetas y los monocitos se encuentran aumentados y tienden a formar grumos, también, los eritrocitos contaminan más frecuentemente la capa de células mononucleares. Las bases biológicas de este fenómeno no son completamente conocidas, pero incluyen una atracción e interacción célula-célula, así como cambios en la densidad de los eritrocitos, por consiguiente, podría ser necesario reducir primero los eritrocitos por sedimentación de las células en dextrán al 5%, o simplemente permitiendo la alta velocidad de sedimentación de los eritrocitos usualmente encontrada en estas muestras, para conseguir la preparación de plasma rico en leucocitos. (4)

- Marcaje de los monocitos.

Las preparaciones de linfocitos obtenidas por Ficoll-Hypaque son primeramente desprovistas de eritrocitos y leucocitos polimorfonucleares maduros. De esta manera, los monocitos componen aproximadamente un tercio de las células aisladas de la sangre de un individuo normal por este método. Los monocitos, si no son adecuadamente identificados como tales, pueden reaccionar positivamente en varias de las pruebas y podrían permitir serios errores de interpretación.

Una manera de resolver este problema es el de marcar los monocitos por ingestión en una base de látex. Esto es particularmente útil para precisar las determinaciones de las estructuras de linfocitos con las características morfológicas de monocitos y linfocitos en microscopía de fases. El procedimiento también proporciona una ventaja para permitir la reacción en frío de anticuerpos anti-linfocitos encontrados en varias enfermedades con características autoinmunes. (4)

- Anticuerpos anti-linfocitos.

Los anticuerpos anti-linfocitos y otras sustancias encontradas en ciertos estados patológicos podrían causar serias interferencias con la prueba. Ellos confieren tinción en células de inmunoglobulinas policlonales y bloquean el acceso a ciertos antígenos para teñir con anticuerpos monoclonales. Si se sospecha su presencia, tal como en pacientes con lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren o SIDA, este efecto puede ser usualmente minimizado eliminándolo por un procedimiento de incubación en látex o una incubación equivalente a 37°C en la ausencia de suero autólogo y lavado con buffers a 37°C. En circunstancias no comunes, podría ser necesario incubar toda la noche en un medio como RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternero o suero normal de humano para permitir el desprendimiento del anticuerpo. (4)

I.4.4. Ensayo para la formación de rosetas.

Ensayo de rosetas (formación espontánea de rosetas con eritrocitos de carnero).

Las rosetas que se forman entre los linfocitos T y eritrocitos de carnero se obtienen mediante la incubación a 4°C. Hay un número de variantes metodológicas usadas. Este procedimiento da un alto grado de formación de rosetas. El ensayo clásico de rosetas ha sido por muchos años el método primario usado para identificar células T. Actualmente, este ensayo es usado para preparar células T purificadas o células T-mermadas (E'), las cuales son después utilizadas en donde los marcadores a ser investigados se encuentran en células B y ciertas células T. Alternativamente, la expresión del receptor E de carnero puede ser monitoreado por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos para el receptor E de carnero tal como CD2 (OKT11 (Ortho Diagnostics), Leu 5 (Becton-Dickinson) o T11 (Coulter Electronics)). (4)

I.4.5. Análisis por microscopía de fluorescencia.

El procedimiento de tinción difiere de acuerdo al procedimiento de elección del anticuerpo primario marcado con un fluorocromo (inmunofluorescencia directa) o la elección de un anticuerpo desarrollado que es marcado con un fluorocromo necesario para detectar la unión del anticuerpo en la primera etapa (inmunofluorescencia indirecta). Esencialmente, desde el procedimiento indirecto se implica una repetición de la reacción de tinción directa, ambos tipos de reacciones pueden ser desarrolladas en un procedimiento integral después de los pasos críticos de lavado. Este procedimiento integrado es comúnmente realizado usando paneles de anticuerpo monoclonales que incluyen reactivos marcados directamente y no marcados. Las células relacionadas a receptores Fc pueden también ser determinados por el mismo procedimiento usando incubación con agregados solubles de inmunoglobulina G humana (IgG) en la primera etapa con un fluorocromo marcando el reactivo de anti-IgG humana.

- Microscopía.

Los portaobjetos son examinados con el objetivo de aceite de inmersión de alta resolución, alternando la fase óptica con la iluminación con fluorescencia incidente del mecanismo utilizado para identificar el tipo celular y realizar el análisis de fluorescencia. Esto es absolutamente crítico para alinear la fluorescencia, ya que puede haber errores ocurridos por la carencia del reconocimiento, si la iluminación de la fluorescencia es inadecuada. Se cuentan un total de 100 a 500 células, dependiendo del porcentaje de positividad celular encontrado y de la decisión de veracidad. Las células con citoplasma teñido homogéneamente debido a muerte celular temprana no se deben contar y se reconocen por la ausencia del anillo circunferencial de fluorescencia y gran intensidad de fluorescencia en el centro celular.

La intensidad de fluorescencia es medida como sigue: +/-, fluorescencia tenue la cual es o no positiva pero se observa diferente del control; tr, una traza de fíable y definida tinción, pero con un débil nivel consistente; 1+ a 4+, un grado fuertemente incrementado de fluorescencia.

Se realiza la cuenta de células positivas fluorescentes dependiendo del anticuerpo que se ha utilizado para marcar los linfocitos y determinar el subgrupo al que pertenece de la población de linfocitos T. (4)

1.4.6. Anticuerpos monoclonales.

Las preparaciones con técnicas de separación por gradientes, han sido ampliamente reemplazadas por el uso de anticuerpos monoclonales, los cuales ofrecen una inmensa superioridad para casi cada aplicación

El análisis estructural de los anticuerpos, en el que han participado muchos laboratorios, ha progresado por más de 50 años. Los primeros estudios se realizaron con mezclas naturales de anticuerpos presentes en la sangre de individuos inmunizados. La sangre contiene muchos anticuerpos diferentes, cada uno derivado de un clon particular de células B y cada uno con una estructura y especificidad para el antígeno diferente. Sin embargo, los anticuerpos son lo suficientemente similares entre sí para que Michael Heidelber y sus colaboradores fueran capaces de purificar mezclas de anticuerpos a partir de la sangre, lo que fue la base para posteriores estudios estructurales. Trabajando con estas muestras, los inmunólogos fueron capaces de deducir la estructura general de los anticuerpos. No obstante, la heterogenicidad molecular de estos anticuerpos policlonales interfirió con un análisis más detallado de la estructura de los mismos, como la determinación de la secuencia de aminoácidos. El progreso metodológico clave en este esfuerzo fue el descubrimiento de que pacientes o animales, que tenían a menudo en su sangre u orina concentraciones elevadas de anticuerpos o porciones de los mismos bioquímicamente idénticos, lo que proporcionó una fuente de anticuerpos individuales de una sola especificidad (aunque habitualmente desconocida). En 1975, Georges Kohler y César Milstein describieron un método para inmortalizar células secretoras de anticuerpos a partir de un animal inmunizado, permitiendo la selección de anticuerpos monoclonales de una especificidad predeterminada. La disponibilidad de poblaciones homogéneas de anticuerpos y células productoras de anticuerpos permitió la determinación de la secuencia completa de aminoácidos de varias moléculas de anticuerpo y, finalmente, la clonación molecular y el análisis genético de los anticuerpos. Estos estudios han culminado en la determinación cristalográfica mediante rayos X de la estructura tridimensional de varias moléculas de anticuerpo y, en unos pocos casos, del anticuerpo con el antígeno unido. (5)

CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL.

II.1. SELECCIÓN DEL DONADOR.

Se tomó una muestra de sangre venosa anticoagulada con EDTA a 200 donadores que asistieron al Banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología, a los que se les realizó la citometría hemática y la citometría de flujo, la primera para obtener el número y porcentaje de linfocitos para correlacionarlos con el porcentaje de CD3, CD4 y CD8 obtenidos en la citometría de flujo y obtener los valores absolutos.

Los datos fueron recopilados en un formato especial para cada paciente con su nombre, edad y sexo, así como los resultados de las determinaciones realizadas para cada uno con su número de identificación para el fácil manejo de las muestras.

Criterios de inclusión.

- Donadores que acudan al Banco de sangre con una historia clínica que sea aprobada por el Médico y sea apto para realizar la donación.
- Individuos entre 20 y 47 años.
- Ambos sexos.

Criterios de exclusión.

- Donadores que presenten en su historia clínica un resultado o dato que el médico decida su rechazo como donador.
- Individuos de menos de 20 y más de 47 años.

Planteamiento del problema.

¿Qué tan importante es el conocimiento de los valores de referencia de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) para el tipo de pacientes que son tratados en el Instituto Nacional de Cancerología?

Objetivos.

- Generales.

Establecer los valores de referencia de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) en donadores sanos del Banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología.

- Específicos.

Observar el grado de inmunosupresión en la que se encuentran los pacientes atendidos en este Instituto.

Hipótesis.

Los valores de referencia obtenidos de donadores de Banco de sangre son similares a los de individuos sanos adultos reportados en otros países.

II.2. MATERIAL Y REACTIVOS EMPLEADOS.

- Agujas para tubos al vacío.
- Tubos de 5ml al vacío con EDTA.
- Gradilla.
- Ligadura.
- Torundas de algodón con alcohol.
- Pipeta automática de 10 µl.
- Pipeta automática de 100 µl.
- Puntas desechables para las pipetas.
- Tubos de 12 x 75 limpios.
- Gasas.
- Guantes desechables.
- Reactivo de anticuerpos monoclonales, **CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC**.
- Kit **InmunoPrep** (sols. lisante, estabilizadora y fijadora).
- Equipo **Q-Prep** preparador para las muestras.
- Equipo **Cell-dyn 3500R** para realizar las citometrías hemáticas.
- Equipo **Coulter**, citómetro de flujo **EPICS XL-MCL**.
- **DNA-CHECK**.
- Kit de células control, **COULTER CYTO-TROL**.
- **Isotón II**.
- **Clenz**.
- **Fox Pro**, base de datos.
- **SAS 6.03**, paquete estadístico.

El reactivo de anticuerpos monoclonales **CYTO-STAT/COULTER CLONE CD3-ECD/T4-RD1/T8-FITC**, es un reactivo de tres colores fluorescentes compuesto de tres anticuerpos monoclonales preparados en ratones, específicos para diferentes antígenos de superficie celular. Cada anticuerpo está marcado con un diferente color fluorescente. Este reactivo permite la identificación simultánea y medición total de linfocitos $CD3^+$ (CD3), $CD4^+$ (T4) y $CD8^+$ (T8), doble tinción de $CD3^+/CD4^+$ (CD3/T4) y $CD3^+/CD8^+$ (CD3/T8) en sangre total por citometría de flujo. Los tres colores en el mismo reactivo son: **CD3-ECD**, tinción de energía acoplada, rojo, **T4-RD1**, ficoeritrina, naranja y **T8-FITC**, isotiocianato de fluoresceína, verde.

Sus rangos de excitación y emisión son los siguientes: **ECD** (rojo), excitación a 486-575 nm, emisión a 610-635 nm; **RD1** (naranja), excitación a 486-575 nm, emisión a 568-590 nm y **FITC** (verde) excitación a 468-509 nm, emisión a 504-541 nm.

De acuerdo con los filtros del citómetro de flujo que se emplean para la lectura de las longitudes de onda que emiten diferentes fluorescencias, la fluorescencia 1 (FL1) corresponde al color verde, la fluorescencia 2 (FL2) al color naranja y la fluorescencia 3 (FL3) al color rojo.

El kit de **ImmunoPrep** es un sistema de reactivos usado para la preparación de los leucocitos de sangre completa para mediciones de inmunofluorescencia en citómetros de flujo. Este sistema de reactivos es empleado en el equipo preparador **Q-Prep**.

El sistema de reactivos de **ImmunoPrep** es rápido, suave, el sistema de lisado de eritrocitos mantiene la morfología de los leucocitos y la integridad de la superficie celular. Las células no se lavan y la centrifugación es eliminada. Desde que estos pasos dejaron de ser requeridos, el tiempo de procesamiento se ha reducido sustancialmente.

El sistema de reactivos de **ImmunoPrep** es un equipo de tres reactivos para una preparación específica en la estación de trabajo **Q-Prep**. La combinación de reactivos consiste de **ImmunoPrep A**, un agente lítico de eritrocitos, **ImmunoPrep B**, un estabilizador de leucocitos y el **ImmunoPrep C**, un fijador de membrana.

El **ImmunoPrep A** contiene ácido fórmico, el **B** una combinación de carbonato de sodio, cloruro de sodio y sulfato de sodio y el **C** contiene paraformaldehído.

El equipo **Cell-dyn 3500R**, es un equipo automatizado que realiza la citometría hemática completa, cuenta de rojos, concentración de hemoglobina, hematócrito, volumen globular medio, concentración media de hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular, cuenta de plaquetas, cuenta de leucocitos y el diferencial. Del diferencial se toma la cuenta absoluta de linfocitos y el porcentaje para obtener las cuentas absolutas de CD3, CD4 y CD8 tomando los porcentajes obtenidos en la citometría de flujo.

El **DNA-CHECK**, está compuesto de partículas uniformes de poliestireno con una tinción fluorescente. Esta tinción fluorescente tiene un espectro de emisión de 525 a 700 nm, con una longitud de onda de excitación de 488 nm. El pico del espectro de emisión está localizado aproximadamente en 560 nm.

Este reactivo es utilizado para alinear las partículas para que incidan por el paso del rayo láser, lo cual se consigue con un programa en el cual en el primer histograma se hace un gate o ventana cuadrática para elegir la población de partículas a alinear, debiéndose obtener un porcentaje de 90% o más para tener en cuenta la mayor cantidad de partículas que pasan por el flujo. En los demás histogramas se realizan las cuentas del tamaño contra granularidad, FL1, FL2 y FL3, estas cuentas deben coincidir con el 100%, ya que se está tomando en cuenta lo marcado en la ventana y un coeficiente de variación menor del 2% en cada histograma para asegurar una buena incidencia de las partículas a través del rayo láser.

El **CYTO-TROL**, es un control de células usado para asegurar la actividad de los anticuerpos monoclonales por citometría de flujo. Es una preparación de linfocitos humanos liofilizados, los cuales exhiben antígenos de superficie detectables con anticuerpos monoclonales. Estas células son aisladas de sangre periférica y expresan antígenos que son representativos en linfocitos normales.

La solución electrolítica isotónica balanceada (**Isotón II**) empleada como diluyente en el conteo y medición de células sanguíneas en los instrumentos **Coulter counter**. Esta solución produce junto con la presión de vacío ejercida por el citómetro y la muestra, un flujo continuo de partículas las cuales pasan por el rayo láser y es determinada su fluorescencia.

Esta solución contiene cloruro de sodio, etilendiaminotetracetato disódico, cloruro de potasio, fosfato monosódico, fosfato disódico y cloruro de sodio.

La solución detergente limpiadora (**CLENZ-COULTER**) es empleada en los componentes de los instrumentos **Coulter** que estén en contacto con sangre, incluyendo aperturas y válvulas de muestreo.

Los resultados fueron capturados en el paquete **FOX** crear la base de datos para la realización del análisis estadístico en el paquete estadístico **SAS 6.03** para obtener las estadísticas descriptivas, media, desviación estándar, moda y varianza para cada una de las variables del estudio, CD3, CD4 y CD8, tanto sus porcentajes como los valores absolutos.

II.3. METODOLOGÍA.

En el lapso comprendido entre los meses de junio y julio de 1998, se realizó un estudio prospectivo de donadores sanos para obtener los valores de referencia de las subpoblaciones de linfocitos T.

Estos valores fueron determinados en una población de adultos geográficamente elegidos, siendo del D.F., Hidalgo y ciudades vecinas. El intervalo de edad en estudio fue de 20 a 47 años (de 20 a 30 años, 114 donadores y de 31 a 47 años, 89 donadores), de los cuales fueron 167 hombres (83.5%) y 33 mujeres (16.5%).

A. Toma de la muestra.

1. Localización de la vena a puncionar.
2. Asepsia del sitio a puncionar.
3. Ligado del brazo a puncionar.
4. Realizar la punción y toma de muestra en el tubo con EDTA.
5. Desligar.
6. Retirar el tubo y aguja y colocar torunda con alcohol en el sitio de punción.
7. La preparación de la muestra para la cuenta de los antígenos de superficie (CD3, CD4 y CD8) se realizó antes de 6 h de haberse realizado la punción.

B. Citometría hemática.

1. Del tubo primario se realizó la citometría hemática y se registraron los resultados, cuentas absolutas de leucocitos y linfocitos.

C. Citometría de flujo.

1. Preparación de la muestra para su análisis.
 - a. Colocar en un tubo limpio, para cada paciente, 10 µl del reactivo de anticuerpos monoclonales.
 - b. Añadir 100 µl de la muestra bien homogeneizada, lentamente por inversión del tubo.
 - c. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz.
 - d. Colocar la muestra en el preparador (Q-Prep) con un ciclo de 35 segundos para que sean agregadas las soluciones lisante (600 µl), estabilizadora (265 µl) y fijadora (100 µl).

- e. La muestra se encuentra lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

2. Análisis de la muestra.

- a. Cada tubo es colocado individualmente en el citómetro para el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T.
- b. La muestra es absorbida por el sistema de vacío hasta que se obtiene una cuenta total de 5,000 linfocitos.
- c. Las diferentes longitudes de onda de las fluorescencias son observadas obteniéndose los porcentajes individuales, así como las cuentas totales para cada marcador de los linfocitos contados,
- d. Se obtienen los resultados en aproximadamente 5 min., se imprimen y se registran.

3. Obtención de resultados.

- a. Se hizo una relación del número absoluto de linfocitos (obtenido en la citometría hemática) a un 100%, con los porcentajes de CD3, CD4 y CD8 (obtenidos en la citometría de flujo).
- b. Se obtienen los valores absolutos de los antígenos de superficie estudiados y se recopilan en el formato de cada paciente.
- c. Se realizó la base de datos con todos los resultados para hacer el análisis estadístico y obtener los valores de referencia.

Los resultados fueron recopilados en formatos como el que se presenta a continuación:

Valores de referencia de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3, CD4 y CD8) en donadores sanos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cancerología.

Sexo: _____ Edad: _____ Fecha: _____ Id: _____

Leucocitos/mm³: _____ Linfocitos/mm³: _____

CD3%: _____ CD3 /mm³: _____

CD4%: _____ CD4 /mm³: _____

CD8%: _____ CD8 /mm³: _____

II.4. MANEJO DEL EQUIPO.

Citómetro de flujo COULTER EPICS XL-MCL.

La citometría de flujo incluye un sistema de flujo, que expone a las células en una sola fila a un haz de luz excitador. Se recolecta la escasa luz y cualquier fluorescencia emitida por esta interacción (principalmente por colorantes usados para teñir moléculas celulares específicas) se convierte en señales eléctricas que después pueden ser analizadas para proporcionar características específicas de la célula.

El citómetro de flujo de COULTER es completamente automatizado, con la totalidad de sus funciones operacionales controladas por el software de la computadora a la que está conectado. Cuenta con monitor, teclado, la unidad de procesamiento (CPU), impresora de inyección de tinta, compresora para el vacío, la cámara de flujo celular y a su lado se encuentra el depósito de desecho. El equipo se observa en la figura 1, sin el depósito de desecho.

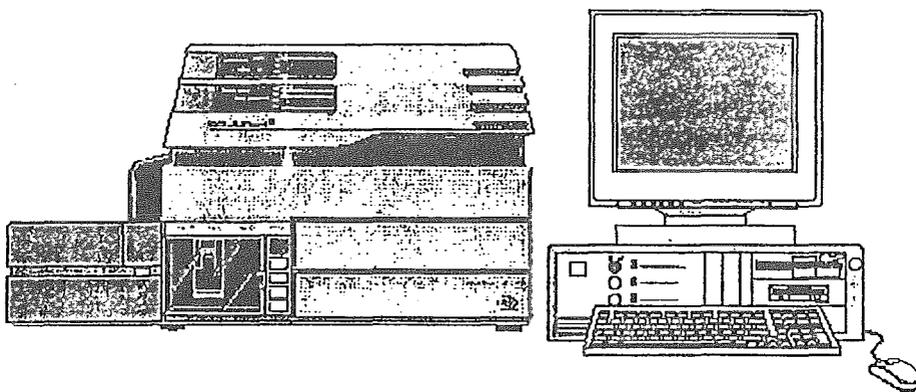


Fig. 1. Vista general del citómetro COULTER EPICS XL-MCL.

En el citómetro está integrado un depósito para el isotón, con el cual se genera el flujo celular y otro depósito para el clez (solución detergente).

El primer paso para poder analizar las muestras, es la alineación de la población, para que incida por el paso del rayo láser. Para lo cual se utiliza ua suspensión de partículas de látex fluorescentes llamadas **DNA-CHECK**.

Una vez alineado el sistema óptico, se hace pasar el **CYTO-TROL**, (control positivo) que es preparado como las muestras y los valores de CD3, CD4 y CD8 medidos deben estar dentro de los intervalos reportados en el inserto.

Ya realizados estos pasos el equipo se encuentra en condiciones óptimas para realizar el análisis de las muestras.

Se coloca una alícuota de la muestra en el sistema de flujo (preparada como una suspensión de células o partículas biológicas) a través de una aguja de diámetro pequeño en un torrente de flujo rápido de diámetro mayor. La aceleración diferencial del torrente y de la muestra inyectada fuerza a ésta última a formar un haz central (foco hidrodinámico) de un diámetro muy semejante al de la célula o partícula que se analiza. Esto elimina la posibilidad de agrupamiento celular (que pudiera detectar dos o más células como un evento), asegura que las células o partículas que pasan por el sitio de análisis son expuestas al haz de luz excitador en forma individual. Este proceso se observa en la figura 2.

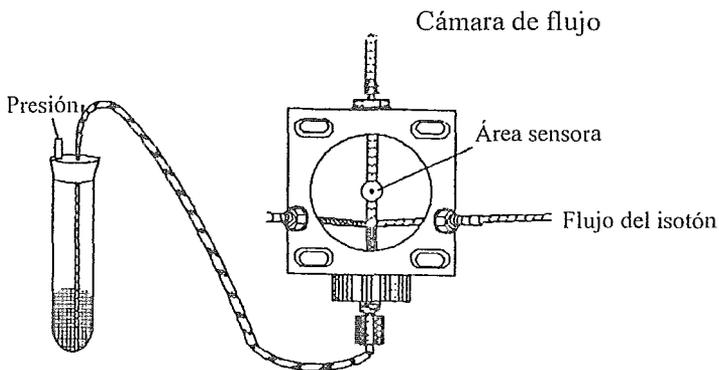


Fig. 2. La muestra pasando hacia la cámara de flujo.

Dentro del citómetro de flujo, la velocidad de paso de la muestra en relación con la del torrente puede controlarse en forma neumática para determinarse el diámetro del haz central. La velocidad del flujo de la muestra puede ser bajo, medio o alto. En el bajo se absorbe un volumen de 10 μl , en el medio 30 μl y el alto 60 μl . Es muy importante obtener el foco

hidrodinámico óptimo relativo al tamaño de la partícula en aplicaciones como el análisis del DNA celular, pero esto es menos significativo para el análisis de mediciones heterogéneas y más ampliamente distribuidas como la inmunofluorescencia de la superficie celular, para trabajar estas muestras es más indicado en flujo medio, ya que en este no existe mucho choque entre las partículas que altere su incidencia por el rayo laser. El volumen de muestra administrado puede ajustarse para asegurar que se cuenten un número de eventos estadísticamente significativo. Esto se observa en la figura 3.

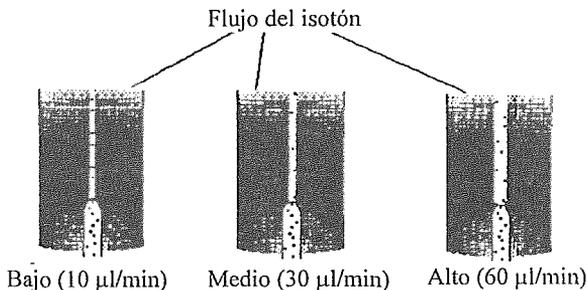


Fig. 3. Velocidades de flujo para la muestra.

Aunque la fuente excitadora de luz puede ser de varios tipos, los más empleados son los rayos laser porque producen un haz de luz de alta intensidad y de una sola longitud de onda, que tiene baja divergencia y que puede enfocarse usando técnicas simples.

La forma del haz de luz en el sitio de análisis se controla por medio de lentes. En situaciones óptimas, el diámetro del haz debe ser mayor que el diámetro del haz de la muestra. Este haz más ancho asegura una iluminación uniforme de toda la muestra y optimiza la precisión de la medición; sin embargo, el haz es menos intenso. Para compensar este problema se crea por óptica un haz que es angosto por lo menos en el eje del haz de la muestra. Esto proporciona la sensibilidad para detectar moléculas con bajo nivel de expresión y aumenta la doble discriminación.

En la figura 4 se observa la ubicación del rayo laser, el sitio donde se lleva a cabo el flujo celular, los filtros y los fotodetectores.

La interacción del haz del laser con la célula o partícula en el punto de análisis produce un haz de luz visible que se dispersa. Por lo tanto, más fluorescentes, usadas para marcar características específicas de las células, esto permite un análisis cuantitativo de varias características celulares.

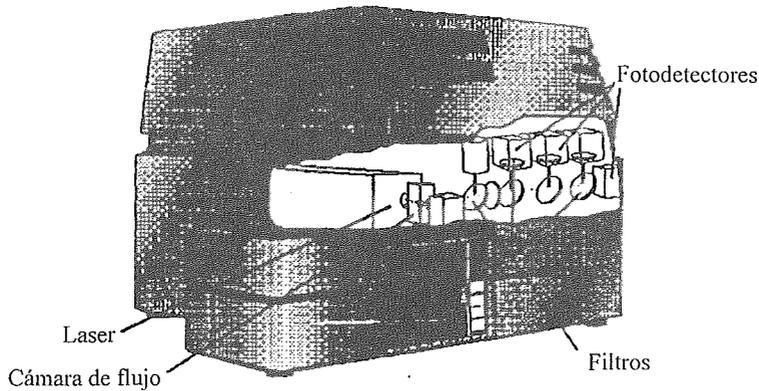


Fig. 4. Localización de los filtros, fotodetectores, laser y cámara de flujo.

La luz del laser que se ha dispersado se colecta en fotodetectores dentro de algunos grados del eje del haz excitador (dispersión frontal, Forward Scatter, FS) y también en dirección perpendicular al haz (dispersión lateral, Side Scatter, SS). Por lo general la intensidad de dispersión de la luz frontal correlaciona con el tamaño de la célula, lo que permite distinguir diferentes tipos celulares y detritos o agregados en una muestra heterogénea. La luz de dispersión lateral correlaciona con la complejidad estructural del interior celular, lo que también es útil para discriminar poblaciones celulares específicas. En la figura 5 se observan los fotodetectores FS y SS.

Por ejemplo, se emplean patrones de dispersión anterior y lateral para distinguir en las preparaciones de sangre total los linfocitos, monocitos y granulocitos. Sin embargo, estas interacciones son complejas.

También se recolectan las emisiones fluorescentes detectadas en los fotodetectores que producen electrones en forma proporcional a la llegada de luz, y los datos se digitalizan y reúnen para análisis computarizado. Debido a que la intensidad de la luz fluorescente emitida es significativamente menor que la luz visible dispersa, los fotodetectores fluorescentes suelen ser tubos fotomultiplicadores diseñados para amplificar fotoelectrones. Un operador puede controlar este proceso y presentar las señales amplificadas en una de dos formas: lineal (salida directamente proporcional a la entrada) o logarítmica (salida proporcional al logaritmo de la entrada), dependiendo de la precisión e intervalo de distribución de las señales requeridas para el análisis. En la figura 6 se observa el interior de un fotomultiplicador.

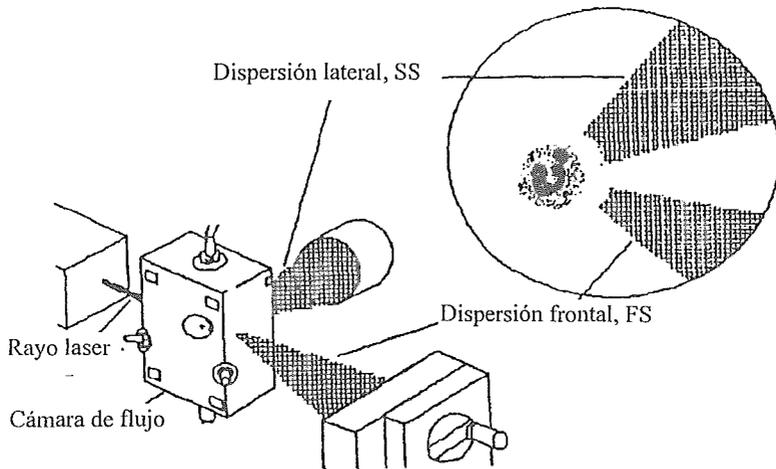


Fig. 5. Localización de los fotodetectores FS y SS.

Para obtener los “colores” específicos se usan filtros ópticos para separar la mezcla de fluorescencia y de luz dispersa y para elegir el espectro deseado en el intervalo de longitudes de onda específicas, que corresponden a la emisión(es) de el/los colorantes fluorescentes usados para marcar macromoléculas específicas de las células. Esta separación se observa en la figura 7.

Aunque la intensidad de la luz dispersa es útil para identificar los subgrupos en una población heterogénea de células, la detección de fluorescencia ha sido la base para analizar diferentes características celulares, incluyendo la expresión de antígenos de bajo nivel. Además, el uso de múltiples sondas fluorescentes de diferentes colores, dirigidas contra parámetros celulares variables, permite el análisis y discriminación detallada de las células de poblaciones heterogéneas (citometría de flujo o parámetros o colores múltiples).

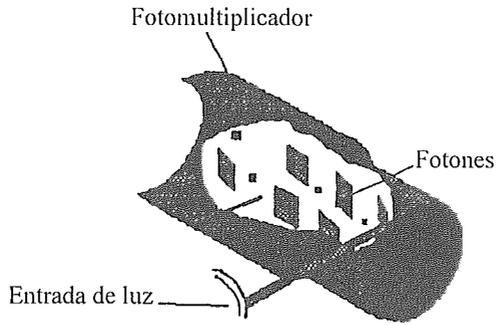


Fig. 6. Interior de un fotomultiplicador.

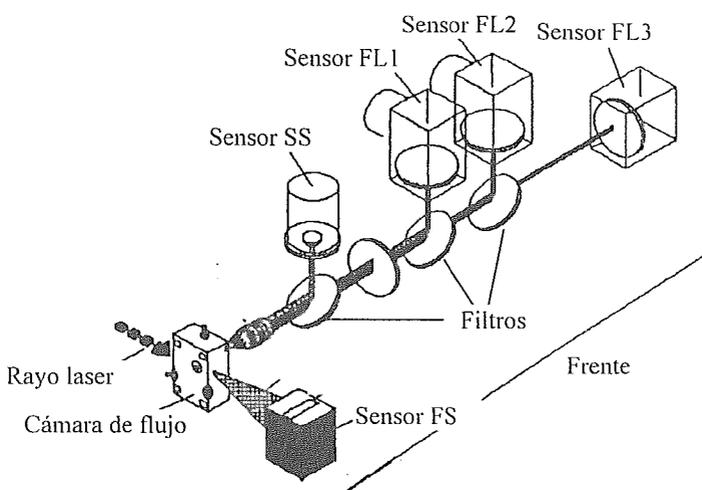


Fig. 7. Separación de la mezcla de fluorescencia y de luz dispersa.

La disponibilidad de colorantes fluorescentes (fluorocromos) permite realizar análisis multicolores. El espectro fluorescente se divide en forma arbitraria para distinguir el verde del naranja, el naranja del rojo, etc. Sin embargo, cada colorante emite en realidad luz dentro de un intervalo de longitudes de onda, y muchos colorantes tienen emisiones (colores) que se traslapan. En otras palabras, una emisión fluorescente puede detectarse en una región espectral que haya sido asignada a otra emisión fluorescente (definienda por los filtros ópticos). Esto se observa en la figura 8.

Para eliminar esta sobreposición se usa procesamiento de señales para restar las fracciones contaminantes o traslapadas de una señal sobre las otras, y se eligen los reactivos colorantes y los filtros ópticos que permitan minimizar la sobreposición y las correcciones matemáticas compensatorias necesarias. Esta compensación de color es especialmente importante al evaluar la fluorescencia débil, que puede reflejar la expresión positiva y clínicamente relevante de un antígeno de especial interés (por ejemplo, marcadores de activación de células normales y neoplásicas de origen inmunológico). Es obvio que la señal débil puede ser semejante a la emisión de color traslapada de un segundo colorante. En consecuencia, la compensación exacta puede afectar en forma significativa la discriminación e interpretación de la expresión débil.

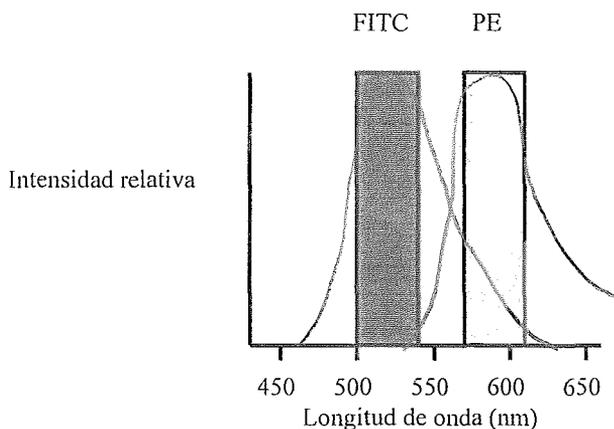


Fig. 8. Histograma de distribución de emisión de fluorescencia.

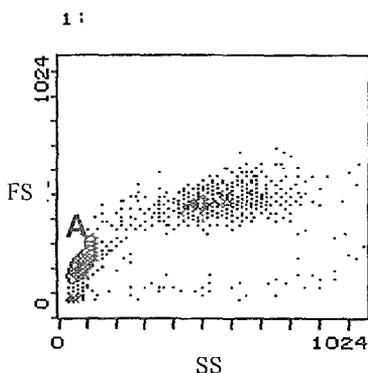
En la actualidad puede realizarse de rutina una citometría de flujo de tres colores por medio de un instrumento con un solo rayo laser de argón al combinar los reactivos marcados con FITC (verde), RD1 o PE (naranja) y varios reactivos del tercer color ECD (rojo), todos excitados de modo adecuado con la línea laser de argón azul de 488 nm. La separación de la emisión de estos reactivos fluorescentes es suficiente para permitir la detección con niveles de compensación de color adecuados.

Una vez digitalizados y almacenados, los datos computarizados deben mostrarse de varias maneras, incluyendo histogramas simples de un parámetro. El eje de las X representa la

intensidad de la señal, que aumenta al aumentar el número de canal, y el eje de la Y representa el número de eventos. Las gráficas de dos parámetros permiten correlacionar la información, discriminando entre las células con base en la expresión de múltiples marcadores. Los histogramas de dos parámetros, en los que los ejes X y Y representan el aumento en la intensidad de señal de diferentes parámetros, deben mostrarse en dos gráficas (en las que la densidad de puntos representa el número de eventos).

Al usar los métodos de gráfica previamente mencionados puede seleccionarse o definirse una región de interés (ventana), y recolectarse los datos solo para las células o eventos que ocurran en ella.

Por ejemplo, con base a dispersiones frontal y lateral, se pueden seleccionar los linfocitos de la población total de leucocitos y examinar la expresión de los parámetros solo en esta subpoblación. Los procedimientos de ventana no están restringidos a las características de la luz dispersa, sino que pueden aplicarse a parámetros de fluorescencia, solos o en combinación con parámetros de dispersión. En la figura 9 se observa un histograma de dos parámetros, tamaño, FS y complejidad, SS, en el cual está seleccionada la ventana A que delimita la ubicación de los linfocitos.



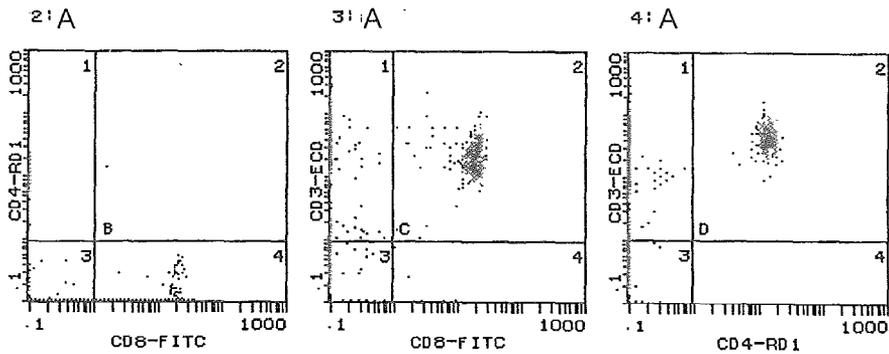
Histograma	Región	ID	%	Cuenta
I	A	AUTO	22.7	5000

Fig. 9. FS Vs SS.

Después, la ventana es asignada a los histogramas y únicamente los datos dentro de la ventana son incluidos en los histogramas, la asignación a los histogramas se observa a un lado del número del histograma. El programa empleado para la cuenta de CD3, CD4 y CD8, consta de un total de 8 histogramas. El primero, es el que se muestra en la figura 9. En las gráficas cuadráticas de dos parámetros que a continuación se muestran en la figura 10 en relación con la fluorescencia de CD3 y CD8, se puede determinar que células son CD3⁺ y CD8⁺ (región 4,

células asesinas naturales, NK), CD3⁺ y CD8⁺ (región 2, células supresoras), CD3⁺ y CD8⁻ (región 1, células cooperadoras) y CD3⁻ y CD8⁻ (región 3, todos los demás linfocitos, detritos, etc.).

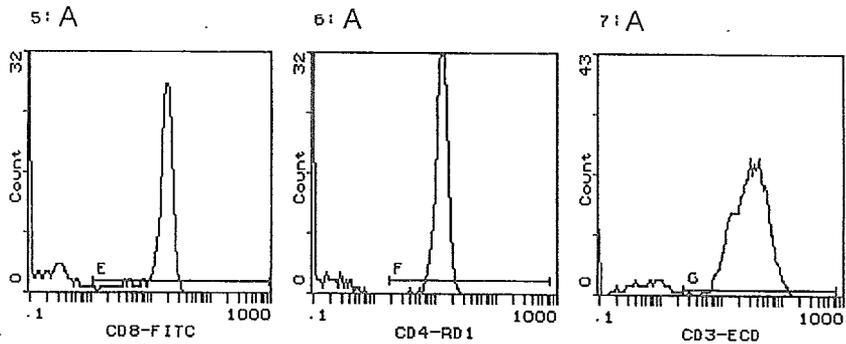
En estos histogramas se relacionan las tres fluorescencias entre sí, FL1(CD8) Vs FL2(CD4), FL1(CD8) VS FL3(CD3) y FL2(CD4) VS FL3(CD3), en los cuales se observan los dobles positivos como son CD8 con CD3 y CD4 con CD3, en estos histogramas se obtienen las cuentas correspondientes a los porcentajes en cada cuadrante, así como el número del histograma y la región de identificación.



Histograma	Región	ID	%	Cuenta
2	B1	B	41.5	2074
	B2	B	0.1	5
	B3	B	19.5	976
	B4	B	38.9	1945
3	C1	C	41.5	2647
	C2	C	0.1	1888
	C3	C	8.0	398
	C4	C	1.3	67
4	D1	D	48.7	2435
	D2	D	41.6	2079
	D3	D	9.7	486
	D4	D	0.0	0

Fig. 10. Combinaciones de las tres fluorescencias.

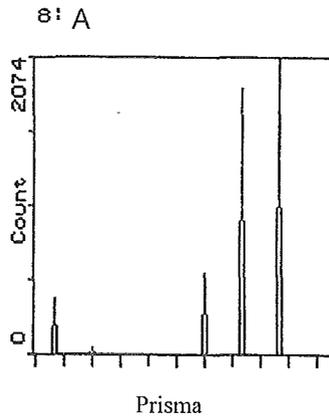
Los tres histogramas siguientes son lineales de un parámetro, en ellos se mide el porcentaje y cantidad de células contadas para cada fluorescencia, como se observa en la figura 11.



Histograma	Región	ID	%	Cuenta
5	E	E	38.8	1939
6	F	F	41.4	2072
7	G	G	87.2	4358

Fig. 11. Medición de porcentajes y cantidad de células de cada fluorescencia.

El último histograma se llama prisma, e indica los porcentajes de las posibles combinaciones que se tienen en las células empleando estos tres anticuerpos marcados. Este histograma se muestra en la figura 12.



CD8-FITC	-	+	-	+	-	+	-	+
CD4-RD1	-	-	+	+	-	-	+	+
CD3-ECD	-	-	-	-	+	+	+	+
Porcentaje	20.0		41.4		87.2		41.6	
		38.8		0.0		37.8		0.0

Fig. 12. Histograma de prisma.

El proceso final es el análisis de los histogramas estadísticamente. Y así, se obtienen los porcentajes de los CD3, CD4 y CD8 medidos.

CAPÍTULO III.RESULTADOS.

Los resultados fueron capturados en un paquete estadístico para obtener las estadísticas descriptivas, media, desviación estándar, moda y varianza para cada una de las variables del estudio, CD3, CD4 y CD8. Los valores de referencia son expresados en porcentaje y cuentas absolutas ($\times 10^9/l$). Para obtener los valores de referencia se tomó la media de cada variable, tanto en porcentaje como en sus cuentas absolutas (#), tomando como intervalo (+/-) una desviación estándar.

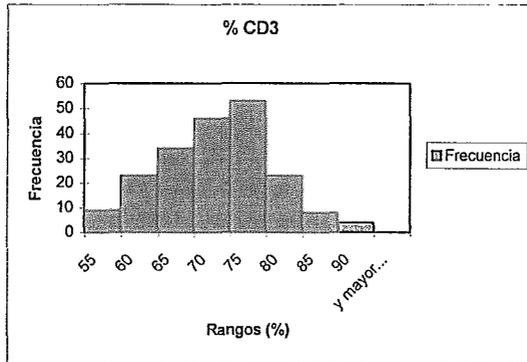
Estos datos se muestran en la siguiente tabla:

Ag de superficie	% (media)	+/- 1 DS	Absoluto (media)	+/- 1 DS
CD3	68.2	7.6	1.700	0.477
CD4	37.5	6.7	0.932	0.279
CD8	29.4	7.6	0.737	0.301

A continuación se muestran las gráficas de barra para cada una de las variables, tomando en el eje de las X los rangos de la positividad de cada antígeno de superficie tanto en porcentajes como en sus cuentas absolutas. En el eje de las Y se representa la frecuencia de donadores observada para cada rango.

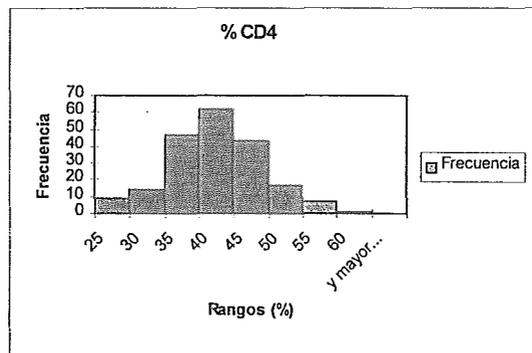
Para obtener las cuentas absolutas de cada antígeno de superficie se hace una relación de las cuentas absolutas y porcentaje de los linfocitos de la citometría hemática con los porcentajes de cada antígeno de superficie obtenidos en la citometría de flujo.

La gráfica 1 corresponde al porcentaje de CD3, en el que se observa una distribución normal, con 9 casos en el rango menor de 55 a 60% y 4 en el rango mayor de 90% y más. Teniéndose una media de 68.2%, una desviación estándar de +/- 7.6, moda de 72.5%, una varianza de 58.2, un valor máximo de 87.2% y un valor mínimo de 50.3%.



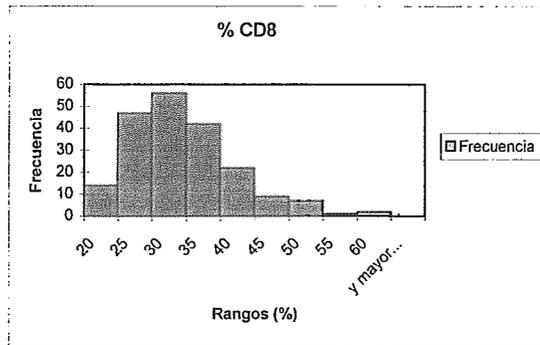
Gráfica 1. Rangos y frecuencia para %CD3.

La gráfica 2 muestra una distribución normal para el porcentaje de CD4, observándose 9 casos en el rango menor de 25 a 30% y 1 caso en el rango mayor de 60% y más. Teniéndose una media de 37.5%, una desviación estándar de +/- 6.7, moda de 32.9%, una varianza de 45.1, el valor máximo de 57.1% y un mínimo de 21.6%.



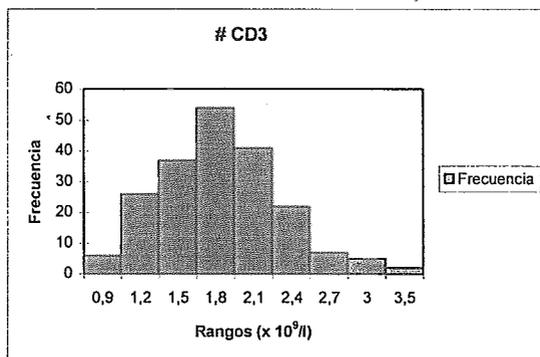
Gráfica 2. Rangos y frecuencia para %CD4.

La gráfica 3 corresponde al porcentaje de CD8, en el que se observa una distribución un poco desviada a la izquierda, teniendo 14 casos en el rango menor de 20 a 25% y 2 casos en el rango mayor de 60% y más. Obteniéndose una media de 29.4%, una desviación estándar de +/- 7.6, moda de 24.8%, una varianza de 58.4, un valor máximo de 56.7% y un valor mínimo de 15.5%.



Gráfica 3. Rangos y frecuencia para %CD8.

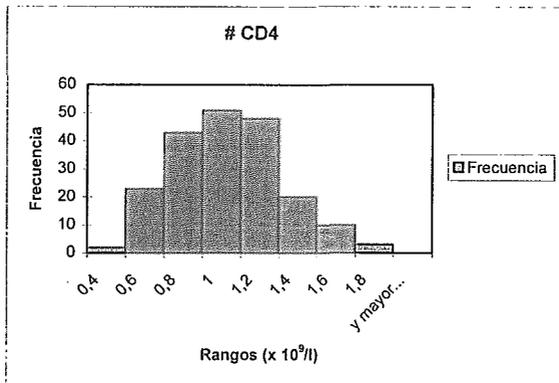
La gráfica 4 muestra una distribución normal, que corresponde a las cuentas absolutas de CD3. Se observan 9 casos en el rango menor de 0.900 a 1.200 y 2 casos en el rango mayor de 3.000 a 3.500. Teniéndose una media de 1.700, una desviación estándar de +/- 0.477, moda de 0.958, una varianza de 0.228, un valor máximo de 3.342 y un valor mínimo de 0.777.



Gráfica 4. Rangos y frecuencia para #CD3.

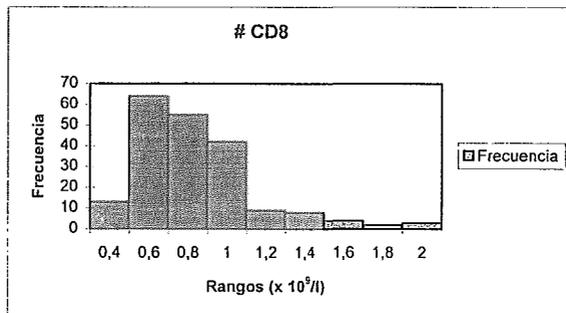


La gráfica 5 corresponde a la cuenta absoluta de CD4, en el que se observa una distribución normal de 2 casos en el rango menor de 0.400 a 0.600 y 3 casos en el rango mayor de 1.800 y mayor. Teniéndose una media de 0.932, una desviación estándar de +/- 0.279, moda de 1.221, una varianza de 0.078, un valor máximo de 1.636 y un valor mínimo de 0.351.



Gráfica 5. Rangos y frecuencia para #CD4.

La gráfica 6 es de las cuentas absolutas de CD8, en el que no se observa una distribución normal, sino un poco desviada a la izquierda. Se tienen 13 casos en el rango menor de 0.400 a .0600 y 3 casos en el rango mayor de 2.000 y mayor. Se obtuvo una media de 0.737, desviación estándar de +/- 0.301, moda de 0.637, varianza de 0.091, un valor máximo de 1.928 y un valor mínimo de 0.323.



Gráfica 6. Rangos y frecuencia para #CD8.

DISCUSIÓN.

Aunque se cuenta con estándares internacionales para los valores normales de las subpoblaciones de linfocitos es útil obtener en cada laboratorio sus propios valores de referencia.

Un valor de referencia se crea cuantificando el número de diferentes tipos de linfocitos (basados en la expresión de antígenos de superficie) en muestras de sangre colectadas de un grupo de hombres y mujeres sanos. Fueron usadas las muestras de sangre de los donadores entre 20 y 47 años para generar los valores de referencia considerando la existencia de inmunocompetencia durante estas edades. Individuos que tuvieron enfermedad reciente debieron ser excluidos del grupo ya que sus valores estarían alterados por su enfermedad. (4)

La presentación de las subpoblaciones de linfocitos en poblaciones sanas es amplia. Las variables biológicas que están correlacionadas con la presencia en sangre periférica de las subpoblaciones de linfocitos incluyen edad, raza, género e influencia del ambiente, incluyendo temporada, drogas y cigarro. Los números absolutos del subgrupo de células T en niños sanos son significativamente más altos que los valores de adultos, predominantemente la relativa linfocitosis durante los primeros años de vida. Ha sido reportado en infantes, un porcentaje más elevado de células CD4 que en adultos. En gente joven se ha reportado una mínima disminución en el porcentaje de células CD8. (4)

A estas variables influye también el ritmo circadiano en el nivel de linfocitos circulantes, particularmente células CD4 a lo largo del día. Esta alteración correlaciona con una fluctuación del nivel de corticosteroides, por consiguiente, el porcentaje y número de células CD4 circulantes baja entre las 8:00 a.m. y el mediodía, aproximadamente 4 horas después del nivel pico de corticosteroides circulantes. El nivel de CD4 se incrementa gradualmente en la tarde y permanece alto a lo largo de la noche. El promedio de fluctuación en los niveles de CD4 absoluto a lo largo del día es de 15 a 20% pero puede ser tan alto como 50%. (4)

A pesar de tal variabilidad en las mediciones en individuos sanos, los efectos de enfermedad e intervención inmunológica tal como trasplante de órganos, enfermedad inmunológica, inmunosupresión y malignidad linfoide pueden ser profundos y específicos de alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos en individuos afectados, los cuales deben estar fuera para la obtención de los intervalos de referencia. (4)

Tomando en cuenta el sexo, no se encontró variación trascendente, fue hecho un muestreo a 34 mujeres del total de 200 y sus valores no fueron diferentes de los encontrados para los hombres. Para la temporada del año en que fue realizado el muestreo, que fue junio y julio de 1998, la época

fue calurosa y seca en la cual se presentaron altos índices de contaminación por el mismo motivo. En el caso de la edad, se eligió de 20 a 47 años para considerar donadores de edad adulta.

El método utilizado para la determinación de estos valores fue por citometría de flujo de tres colores, empleando equipo y reactivos de Coulter, siendo esta metodología bastante sencilla, reproducible y confiable.

CONCLUSIONES.

Los valores de referencia de las subpoblaciones de linfocitos T obtenidos en el presente trabajo, presentan ciertas semejanzas con los reportes encontrados de la UCLA Medical Immunology Laboratory (4), con los valores de referencia para una población de 152 adultos de Malasia (21), también con un reporte de Rumania para una población de 100 voluntarios caucásicos (22), estas comparaciones se observan en la siguiente tabla:

Ag de superficie	CD3 %	Cels. CD3 $\times 10^9/l$	CD4%	Cels. CD4 $\times 10^9/l$	CD8%	Cels. CD8 $\times 10^9/l$
UCLA	72	1.258	45	0.756	25	0.450
Malasia (21)	57.9- 75.1	2.066	24.7- 41.7	1.028	22.7- 40.5	0.982
Caucásicos (22)	71.4- 77.0		39.5- 44.5		23.2- 34.6	
I.N.Can.	60.6- 75.8	1.223- 2.177	30.8- 44.2	0.653- 1.211	21.8- 37.0	0.436- 1.038

Como ya se mencionó anteriormente la utilidad de que cada laboratorio elabore sus valores de referencia por las diferencias metodológicas que existen entre laboratorios, condiciones ambientales, efectos de enfermedad e intervención inmunológica, como transplante de órganos, inmunosupresión o malignidad linfoide por los diferentes pacientes que se atienden en cada hospital.

BIBLIOGRAFIA.

1. McKenzie, Shirlyn B., Hematología Clínica, edit. El Manual Moderno, 1991, Cap. 2, pp. 10-23, Cap. 3, pp. 24-25, Cap. 4, pp. 51-83, México, D.F.
2. Carrillo-Farga, Joaquín, Pérez-Vega, Sonia, El Atlas de Hematología, Edición Latinoamericana, Cybercell, S. A. de C. V., 1997, Cap. I, pp. 1-19,
3. Williams, Williams J., et. Al. , Hematology, fourth edition, 1990, Cap. 5, pp. 37-47, Cap. 6, pp. 48-54, Cap. 104, pp. 939-944, McGraw-Hill, USA.
4. Rose, R. Noel, Friedman Herman, Fahey John L., Manual of Clinical Laboratory Immunology, American Society for microbiology, Washington, D. C., 1986, Cap. 31, pp. 212-225, Cap. 33, pp. 236-246.
5. Abbas, Abul K., et. Al. , Inmunología celular y molecular, 2da. ed. edit. Interamericana McGraw-Hill, 1995, Cap. 2, pág. 38, España.
6. Aiuta F., Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M., Dickler HB, Froland S., Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligman M, Siegal FP, Stjernsward J., Terry WD and Wynbran J, Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS), Report-July 1974, Clin. Immunol and Pathol, 1975; 3:584-97.
7. Foon KA and Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood, 1986; 68:1-31.
8. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut, 1988; 57:327-39.
9. McMichel AJ, de, Leukocyte Typing III. Oxford:Oxford University Press, 1987; 38:302-315.
10. Ira L. Zackon, Goolsby Charles L. Guía clínica para la citometría de flujo, Contemporary oncology, 1995; 7:29-40.

11. Centers for Disease Control, 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. 1993; 41.
12. Taylor JM, Fahey JL, Detels R, et. al.: CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infections: wich to choose and how to use. *J. Acquir Immune Defic Synd* 1989; (2):114.
13. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes. National Committee for Clinical Laboratory Standards Document. 1992; 12(6).
14. Marie Ge, Fleisher TA: Application of lymphocyte imminophenotyping in selected diseases. *Pathol Immunopathol Res* 1988; (7):319.
15. Schroeder TJ, First MR, Hurtubise PE, et. al.: Immunologic monitoring with Orthoclone OKT3 therapy. *J Heart Transplant*; 1989; (8):371.
16. Zambrano, Sergio A., *Inmunología*, edit. Interamericana. McGraw-Hill, 1993, Cap 9, pp. 107-119.
17. Roitt, Ivan M., *Essential Immunology*, Blackwell Scientific Publications, 8th, ed., 1994, Cap. 15, pp. 299-309, Oxford.
18. Kotylo PK, Fineberg NS, Freeman KS, Redmond NL, Charland C. Reference ranges for lymphocyte subset in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 1993 Aug;100(2):111-115.
19. Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Jensen H, Engelmann M, Christensen LB. T-lymphocyte subsets in West African children: impact of age, sex and season. *J Pediatr* 1997 Jan; 130(1): 77-85.
20. Stulning T, Maczeck C, Bock G, Majdic O, Wick G. Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from "healthy" young and aged subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 1995 Nov;108(3):205-210.
21. Dhaliwal JS, Balasubramaniam T, Queck CK, Gill HK, Nasuruddin BA. Reference ranges for lymphocyte subset in a defined Malaysian population. *Singapore Med J* 1995 Jun;35(3):288-291.

22. Roman S, Moldovan I, Calugaru A, Regalia T, Sulica A. Lymphocyte subset reference ranges in Romanian adult Caucasians. *Rom J Intern Med* 1995 Jan;33(1-2):27-36.
23. McKinney RE Jr, Wilfert CM. Lymphocyte subsets in children younger than 2 years old: normal values in a population at risk for human immunodeficiency virus infection and diagnostic and prognostic application to infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1992 Aug;11(8):639-644.
24. Bofill M, Janossy G, Lee CA, MacDonald-Burns D, Phillips AN, Sabin C, Timms A, Johnson MA, Kernoff PB. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 1992 May;88(2):243-252.
25. Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, Totterman T, Lydyard P, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 1991 Aug;60(2):190-208.
26. Robinson M, O'Donohoe J, Dadian G, Wankowicz A, Barltrop D, Hobbs JR. An analysis of the normal ranges of lymphocyte subpopulations in children aged 5-13 years. *Eur J Pediatr* 1996 Jul;155(7):535-539.
27. Ginaldi L, Farahat N, Matutes E, De Martinis M, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of T cell antigens in normal peripheral blood lymphocytes: a quantitative analysis by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1996 Jul;49(7):539-544.
28. Webster HK, Pattanapanyasat K, Phanupak P, Wasi C, Chuenchitra C, Ybarra L, Buchner L. Lymphocyte immunophenotype reference ranges in healthy Thai adults: implications for management of HIV/AIDS in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996 Sep;27(3):418-429.