

FRECUENCIA DE LINFOCITOS PORTADORES DE IgE EN PACIENTES ATOPICOS

E. CASTAÑEDA, M. GUZMAN

Empleando la técnica de inmunofluorescencia directa se estudió la presencia de receptores de tipo IgE en la membrana de los linfocitos de 30 pacientes atópicos comparativamente con un grupo - control constituido por 37 personas. Los resultados mostraron que el grupo atópico presenta un porcentaje de linfocitos del $9,63 \pm 2,66$ que portan tal receptor frente al $1,77 \pm 0,37$ presentado por el grupo control. Como hecho interesante se encontró una disminución estadísticamente significativa para receptores IgM en atópicos, en cambio no hubo diferencia para IgA. La cuantificación sérica de IgE e IgA mostró un aumento para IgE y una disminución para IgA.

INTRODUCCION

El estudio de los receptores de tipo inmunoglobulina en la membrana de los linfocitos B periféricos, empleando la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), se ha realizado en un gran número de laboratorios, tanto en grupos normales (1-3) como en grupos con problemas diversos (4). Muchos de estos estudios han sido cuestionados por la presencia en la membrana de los linfocitos de receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (5), lo cual podría introducir un error en las observaciones si no se utilizan conjugados F(ab)₂, o si tales receptores no son específicamente bloqueados.

Como ha sido claramente establecido, el mecanismo inmunológico que condiciona los cuadros de hipersensibilidad inmediata está mediado por la unión de la IgE citofílica de células basófilas y mastocitos con su alérgeno homólogo (6-8). Esta IgE es sintetizada por los plasmocitos, los cuales constituyen la etapa final de diferenciación de los linfocitos B. Es por tanto lógico suponer que dentro de la población linfocitaria B, debe existir una

Srta. Elizabeth Castañeda: Microbióloga, M.Sc., Grupo de Microbiología e Inmunología, Instituto Nacional de Salud; Dr. Miguel Guzmán U.: Jefe de la Sección de Diagnóstico, Investigación y Referencia, Instituto Nacional de Salud; Profesor asociado Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Nota: Los nombres de productos comerciales o equipos que puedan aparecer en este trabajo se mencionan simplemente como identificación, pero no como una recomendación específica para su uso.

Solicitud de separatas a la Srta. Castañeda.

subpoblación de linfocitos activados para la síntesis de IgE y que ésta pueda detectarse en la membrana de linfocitos periféricos. El linfocito activado puede definirse, según Moller (citado 1), como aquél específicamente seleccionado y estimulado por su antígeno correspondiente que empieza a expresar su función de síntesis de inmunoglobulina.

Empleando la técnica ya mencionada y realizando controles para el bloqueo de receptores Fc y remoción de Igs adheridas inespecíficamente a la membrana, se intentó cuantificar la subpoblación de linfocitos B activados para la síntesis de IgE en un grupo de pacientes atópicos con el fin de establecer si existe alguna relación significativa con la atopía.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes. El grupo de pacientes quedó constituido por 30 personas con una clara historia de atopía y cuadros definidos de rinitis, asma, urticaria y en algunos casos coexistencia de eczema. El rango de edad del grupo fue de 11 a 60 años.

Control. El grupo control quedó conformado por 37 personas supuestamente sanas con rango de edad comparable al grupo problema.

Reactivos. Para los estudios de separación de linfocitos se utilizó una mezcla de Ficoll (Sigma) e Hypaque (Whintrop) comercialmente obtenidos. Para los estudios de inmunofluorescencia se utilizaron conjugados monoespecíficos comercialmente obtenidos, o producidos por la unidad de inmunoquímica del Instituto Nacional de Salud.

Equipos. Todas las observaciones fueron hechas en un microscopio de fluorescencia Orthoplan-Leitz con sistema de luz incidente y un sistema Combiphot para fotografía.

Tanto a los pacientes referidos al laboratorio para este estudio específico como a los controles, se les hizo una historia completa precodificada. A cada una de las personas seleccionadas se le tomó asepticamente una muestra de 10 cc de sangre en jeringa heparinizada (Liquemine, Roche 50 UI/cc); esta muestra se dejó sedimentar a 37°C durante una hora, al término de la cual se extrajo el plasma para proceder a la purificación de los linfocitos sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque ($d=1,077-1,080$) siguiendo la técnica de Boyum (9). Los linfocitos separados fueron colocados con pipeta Pasteur en 5 cc de medio 199 (Microbiological Associates) adicionado de 50UI/cc de heparina; posteriormente se centrifugaron a 2.000 rpm y el sedimento fue lavado dos veces con el medio y finalmente con medio sin heparina. Con el objeto de determinar la viabilidad de esta población linfocitaria se preparó una suspensión que contenía aproximadamente $10-20 \times 10^6$ células/cc y se estudió mediante la prueba de exclusión del azul de tripan al 0,5%. Conocida la viabilidad celular, se tomaron sendas cantidades de 0,1 cc de la suspensión celular y se les adicionó 0,1 cc de cada uno de los conjugados monoespecíficos: anti-IgE (Hyland), anti-IgA (Berhing) y anti-IgM (Berhing), todos ellos obtenidos en conejo, cuya pureza y especificidad fueron previamente estudiadas por procedimientos inmunoquímicos. Estas suspensiones fueron incubadas por 30 minutos en baño de hielo; posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2.000 rpm y las células lavadas con medio 199. Finalmente de cada muestra fueron realizados dos extendidos sobre portaobjetos pretratados que fueron secados al aire y luego fijados en etanol (95%) por 5 minutos. Las preparaciones fueron lavadas dos veces con solución salina buffer pH 7,2 y montadas con glicerol-buffer (9:1). Las preparaciones fueron leídas bajo el microscopio de fluorescencia contando 300 células y determinando sobre esta población el número de células con fluorescencia en su membrana (Figura 1).

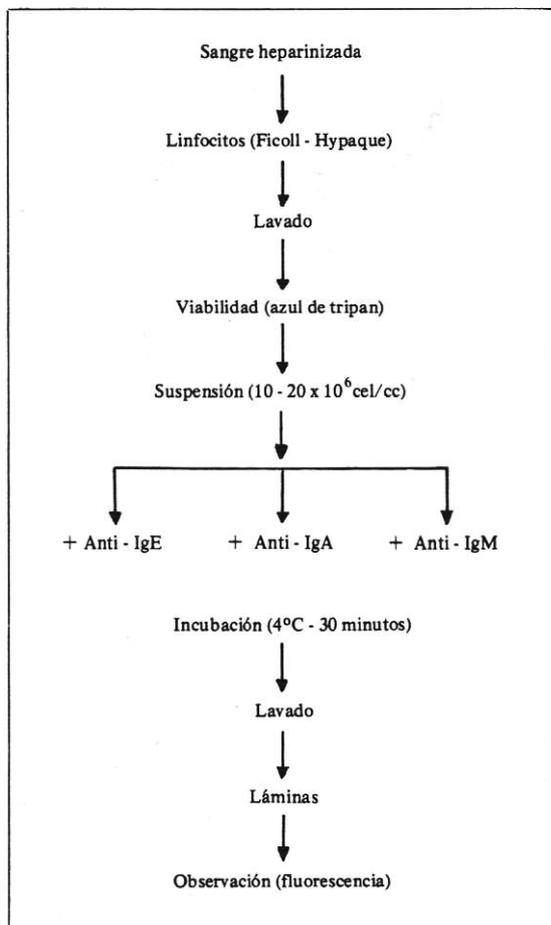


Figura 1. Secuencia general del proceso de detección de Igs en la membrana de los linfocitos.

Con el objeto de conocer si realmente un factor de error ocurre con el uso de conjugados no F(ab)₂ por el receptor para Fc en la membrana, se decidió bloquear específicamente dichos receptores en un estudio de 15 muestras, para lo cual cada suspensión de células lavadas fue dividida en tres alícuotas. La primera y la segunda fueron incubadas con conjugados mono-específicos anti-IgG y anti-IgM, respectivamente, y procesadas como ya fue descrito; la tercera se incubó a 4°C por 30 minutos con una solución de IgG de conejo purificada cromatográficamente (10) y específicamente cuantificada para este propósito. Luego de esta incubación, las células fueron lavadas con medio 199 e incubadas de nuevo con los conjugados

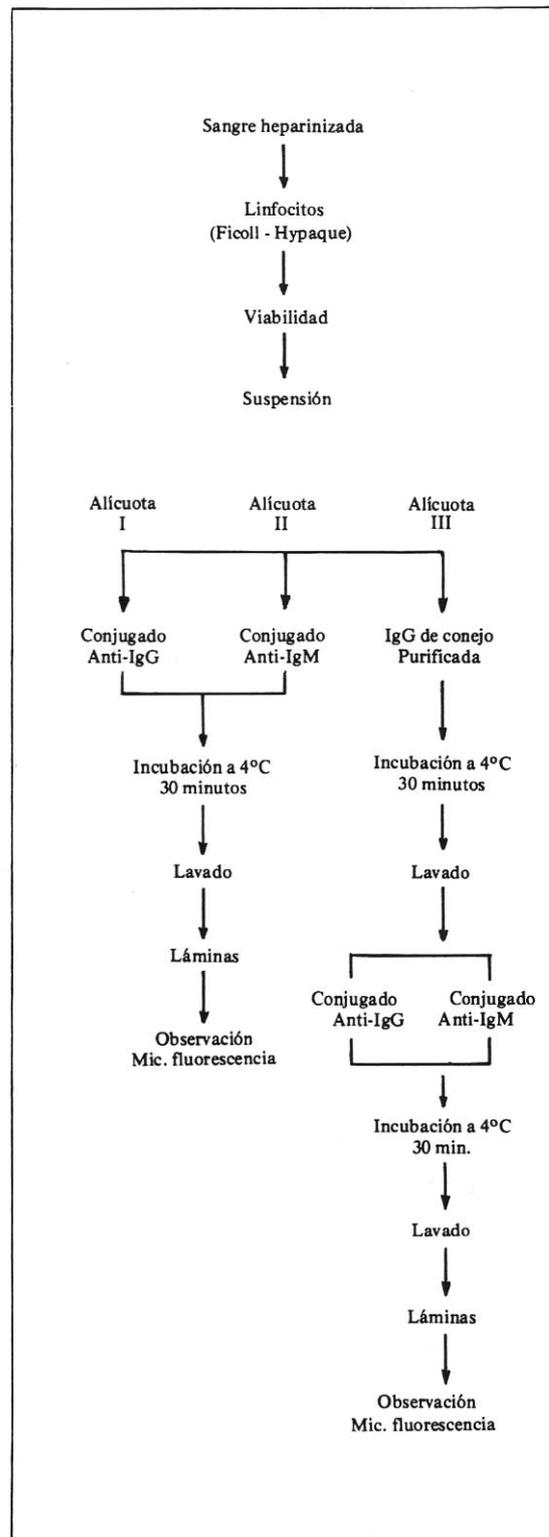


Figura 2. Método para bloquear los receptores Fc en la membrana de los linfocitos.

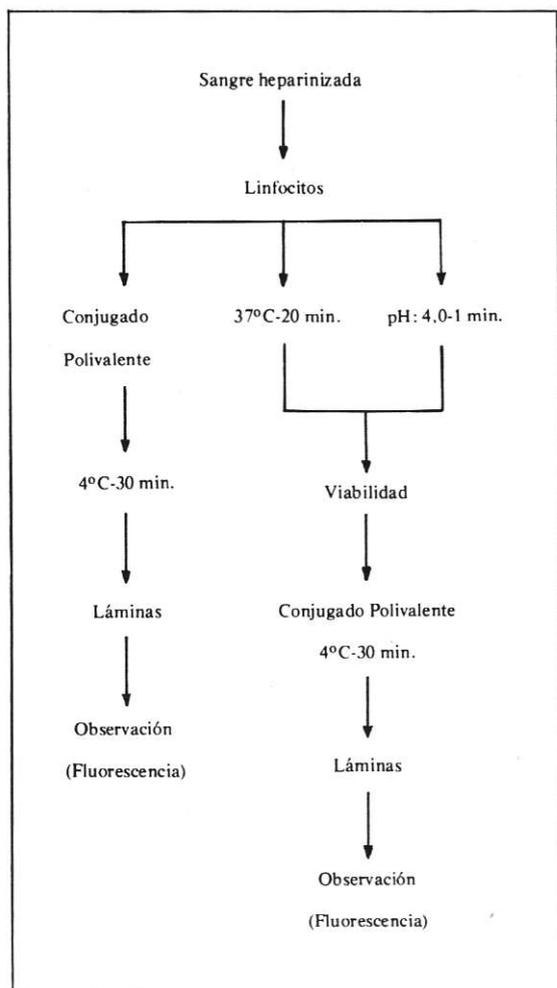


Figura 3. Remoción de Igs adheridas inespecíficamente, por tratamiento a 37°C y a pH 4,0.

monoespecíficos respectivos anti-IgG y anti-IgM y procesadas como en el caso anterior (Figura 2).

Con el objeto de asegurar que la fluorescencia correspondía a IgG sintetizada por la célula, se decidió hacer un estudio de remoción de posibles inmunoglobulinas unidas inespecíficamente a membrana de linfocitos de acuerdo a lo recomendado por Kumagai y col. (11). Para este efecto se procesaron nueve muestras en la forma siguiente: se tomaron 10 cc de sangre heparinizada y se purificaron los linfocitos en la forma ya descrita, se separaron posteriormente tres alícuotas, una

de las cuales se incubó directamente con un conjugado polivalente; la segunda se incubó a 37°C durante 20 minutos y la tercera se llevó a pH 4,0 con buffer de acetato 0,05M durante un minuto. Luego de estos tratamientos, las células fueron lavadas con medio 199, se determinó su viabilidad y se incubaron con conjugado polivalente por 30 minutos. Luego se continuó con el proceso ya descrito (Figura 3). Para correlacionar la presencia de Igs sobre la membrana con las Igs circulantes se procedió simultáneamente con el estudio anterior a cuantificar los niveles de IgA e IgE séricas utilizando la técnica de inmunodifusión radial, mediante el sistema Partigen (Berhing).

Todos los resultados fueron metódicamente registrados y luego sometidos a análisis estadísticos de acuerdo a la distribución t de Student.

RESULTADOS

La separación de linfocitos por el procedimiento adoptado mostró una buena recuperación con un porcentaje de viabilidad del 97% para los dos grupos. Los tipos de fluorescencia observados fueron los ya descritos como tipos granular, medialuna (capping) y en anillo (12) (Figuras 4 y 5).

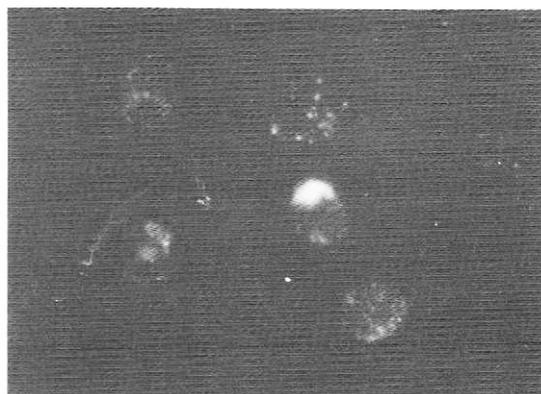


Figura 4. Linfocitos de sangre periférica que presentan fluorescencia granular y en media luna (capping).

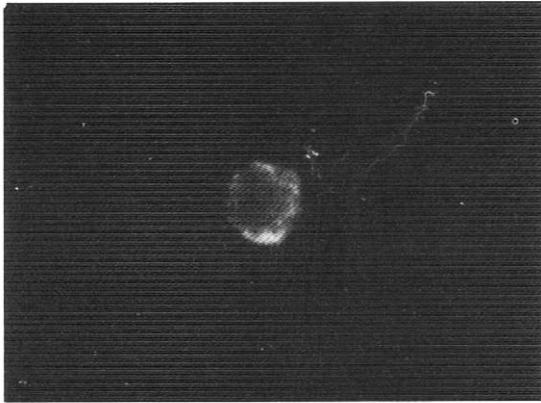


Figura 5. Linfocito de sangre periférica que presenta fluorescencia en anillo.

La frecuencia de linfocitos con inmunoglobulinas asociadas a sus membranas mostró los siguientes porcentajes: para el grupo control 1,77% de sus linfocitos periféricos con IgE frente a 9,63% para el grupo de pacientes atópicos; esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,0005$). Con relación a la IgA se encontró un porcentaje de linfocitos con tal inmunoglobulina en 10,21% para el grupo problema frente a 9,66% del grupo control; esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p < 0,2$). Para la IgM se encontró en el grupo control un 14,15% frente a un 11,56% del grupo problema; esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,0025$) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de linfocitos de sangre periférica con inmunoglobulinas en su membrana.

CLASE DE Ig	% LINFOCITOS		P
	CONTROL n = 37	PROBLEMA n = 30	
IgE	1,77 ± 0,37	9,63 ± 2,66	< 0,0005
IgA	10,21 ± 2,83	9,66 ± 2,20	NS
IgM	14,16 ± 3,92	11,56 ± 3,31	< 0,0025

NS = No significativo.

Tabla 2. Porcentaje de linfocitos con inmunoglobulinas en su membrana después del bloqueo de receptores Fc con IgG de conejo.

CLASE DE Ig	% LINFOCITOS		P
	NO TRATADOS	PRETRATADOS	
IgG	12,74 ± 3,56	15,19 ± 2,0	NS
IgM	13,03 ± 3,19	9,3 ± 1,27	< 0,0005

NS = No significativo.

En relación con el bloqueo específico de receptores Fc de membrana, para IgG no se encontró ninguna diferencia significativa entre linfocitos pretratados y no tratados ($p < 0,0125$). El grupo sin tratamiento mostró fluorescencia en el 12,74% frente al grupo tratado de 15,19%. Sin embargo, en relación con la IgM se encontró una diferencia con significancia estadística ($p < 0,0005$); el grupo sin tratamiento mostró un porcentaje de 13%, reducido después del tratamiento a un 9,3% tal como se muestra en la Tabla 2. Los experimentos realizados para remover las inmunoglobulinas que pudiesen estar inespecíficamente unidas a la membrana no mostraron ninguna variación con significancia estadística. El porcentaje observado de linfocitos fluorescentes previo marcado con un conjugado polivalente en el grupo control mostró un 19,21%; después del tratamiento con pH 4,0 fue de 21,1% ($p < 0,10$) y después de incubación a 37°C el porcentaje fue de 14,43% ($p < 0,05$) (Tabla 3).

La cuantificación individual en suero mostró en el grupo control valores para IgE menores de 2.062 UI/cc frente al grupo problema que mostró niveles de 2.216 UI/cc + 1.162,77 UI/cc. Para la IgA los niveles séricos en el grupo problema fueron 138,46 mg% frente al grupo control que mostró valores de 200,10 mg% siendo esta

Tabla 3. Porcentaje de linfocitos con inmunoglobulinas en su membrana después del tratamiento a 37°C y a pH 4,0.

TRATAMIENTO	% LINFOCITOS	P
Control	19,21 ± 6,82	—
pH 4,0	26,1 ± 13,48	NS
37°C	14,43 ± 5,34	NS
NS = No significativa.		

diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0005$) (Tabla 4).

DISCUSION

En el presente trabajo fue posible demostrar que la técnica de fluorescencia directa es útil en la investigación de IgE en la membrana de linfocitos B de pacientes atópicos y que esta técnica por su sencillez y sensibilidad puede tener un lugar en el estudio del paciente atópico. Es interesante anotar que aunque el bloqueo específico de receptores Fc no mostró una diferencia cuando se hizo la prueba con conjugado anti-IgG, sí lo mostró para IgM y este hecho demuestra que efectivamente puede introducirse un error por este factor al no usar conjugados F(ab)₂. En este caso, la modificación técnica introducida en la metodología bloqueando específicamente el receptor con IgG de conejo purificada es

una alternativa importante cuando no es posible contar con estos conjugados.

El temor expresado por algunos autores de que algunos linfocitos pueden mostrar fluorescencia por inmunoglobulinas inespecíficamente unidas a su membrana quedó claramente descartado por el tratamiento a 37°C y pH 4,0 lo cual demuestra la validez de los resultados dentro del marco experimental del presente trabajo.

Aunque nuestros resultados están en desacuerdo con otros autores (13), quienes no hallaron diferencia en la distribución de marcadores de tipo IgE en los linfocitos de niños atópicos frente a un grupo control, el rigor del estudio aquí presentado nos permite afirmar que la hipótesis planteada de que es posible detectar en la población linfocitaria periférica de pacientes atópicos la sub-población de linfocitos B específicamente activados para la síntesis de IgE ha quedado establecida para el grupo estudiado. Otros autores (14-16) también han informado un aumento en el porcentaje de linfocitos portadores de IgE en membrana, tanto en tejidos como en sangre periférica en cuadros específicos asociados a alergia.

Aunque los niveles séricos de IgE son más altos en el grupo problema, es nuestra impresión que la técnica empleada de inmunodifusión radial simple no es lo suficientemente sensible y que en ausencia de técnicas más sensibles la determinación del porcentaje de linfocitos con IgE por la técnica de fluorescencia directa puede ser de mayor utilidad. Finalmente, es interesante

Tabla 4. Cuantificación por inmunodifusión radial de IgE e IgA en el grupo de pacientes atópicos y en el control.

CLASE Ig	UNIDAD DE MEDIDA	CONTROL	PROBLEMA	P
IgE	UI/cc	2.062	2.216,25 ± 1.162,27	—
IgA	mg%	200,10 ± 24,20	138,46 ± 30	< 0,0005

hacer énfasis en el hecho observado por otros autores (17) y muy aparente en el presente trabajo, de la notoria disminución en el atópico de los niveles séricos de IgA.

SUMMARY

A study to demonstrate the existence of IgE on the cell membrane of B lymphocytes from 30 atopic patients compared to 37 healthy controls was done by means of the direct immunofluorescent technique. The results showed that $9.63 \pm 2.66\%$ of the circulating B lymphocytes from atopic patients bear this kind of receptor compared with the control group with only $1.77 \pm 0.37\%$ being this difference statistically significant. As far as IgM and IgA receptors it was found no difference between the two groups for IgA, meanwhile a statistically significant difference was seen for IgM receptors, the atopic group showed a low percentage of lymphocytes bearing such receptor compared with the control group. The quantification of circulating levels of IgE and IgA showed a definitive increase level for IgE and a decrease for IgA, in the atopic group.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todos los especialistas que nos refirieron sus pacientes específicamente para este estudio e igualmente al grupo voluntario control por su colaboración. Al doctor Bernardo Buitrago, del Grupo de Patología, por las fotografías y al señor Edgar Ramírez por su colaboración en el estudio estadístico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— WARNER NL. Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T lymphocytes. *Adv Immunol* 1974; 19: 67-216.
- 2.— BROWN Gy GREAVES MF. Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *European J Immunol* 1974; 4:302-310.
- 3.— ROWLANDS DT, DANIELE R. Surface receptors in the immune response. *N Engl J Med* 1975; 293: 26-32.
- 4.— ROWLANDS DT, DANIELE R et al. Characterization of lymphocyte subpopulations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1974; 34: 1962-1970.
- 5.— VITETTA ES, UHR W. Immunoglobulin receptors revisited. *Science* 1975; 189:964-969.
- 6.— ISHIZAKA K, ISHIZAKA T, HORN BROOK MM. Allergenic activity of γ E, γ G, and γ A antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurements of reaginic antibody. *J Immunol* 1967; 98 490-501.
- 7.— ISHIZAKA K, ISHIZAKA T. Identification of γ E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967; 99: 1187-1198.
- 8.— ISHIZAKA K, ISHIZAKA T, TERRY WD. Antigenic structure of γ E globulin and reaginic antibody. *J Immunol* 1967; 99: 849-858.
- 9.— BOYUM A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (Suppl 97): 77-79.
- 10.— PETERSON EA, SOBER HA. Methods in immunology and immunochemistry. WILLIAMS C, CHASE Meds. New York: Academic Press 1967; 321-332.
- 11.— KUMAGAI K, ABOT T, SEKIZAWA T, SASAKI M. Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes. I. Dissociation of cell bound immunoglobulins with acid pH or at 37°C. *J Immunol* 1975; 115: 982-987.
- 12.— PERNIS B, FORNI L, AMANTE L. Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. *J Exp Med* 1970; 132: 1001-1018.
- 13.— NEIBURGER RG, NEIBURGER JB, DOCKHORN RJ. Distribution of peripheral blood T and B lymphocyte markers in atopic children and changes during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 61: 88-92.
- 14.— CORMANE RH, HUSZ S, HAMERLINCK KF. Immunoglobulin and complement bearing lymphocytes in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1974; 90: 597.
- 15.— TADA T, ISHIZAKA K. Distribution of γ E-forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey. *J Immunol* 1970; 104: 337-387.
- 16.— WHITESIDE TL, RABIN BS, ZETTERBERG J, CRIEP L. The presence of IgE on the surface of lymphocytes in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 55: 186-194.
- 17.— LAMM ME. Cellular aspects of immunoglobulin A. *Adv Immunol* 1976; 22: 223-290.