

Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Verografin. Reporte preliminar

C. GARCÍA SANTANA Y C. SILVA LEÓN

Grupo de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 13 de octubre de 1976

Recibido: 13 de diciembre de 1976

ABSTRACT. A gradient of density by centrifugation and a 15% Verografin solution have been used to purify lymphocytes. Yield, viability and purity of the cells have been studied. Such cells have also been cultivated and stimulated with PHA and also cultivated in a mixed culture to observe their behavior. According to the results its use is not inconvenient. The utility of this method for its clinical use is stated.

RESUMEN. Se purifican linfocitos mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad utilizando una solución de Verografin al 15%. Se estudian rendimiento, viabilidad y pureza de las células obtenidas. Se cultivan las mismas y se estimulan con FHA y en cultivo mixto para observar su comportamiento. De acuerdo a los resultados su utilización no ofrece inconvenientes. Se señala el aprovechamiento del método para el uso clínico.

INTRODUCCION

A partir del momento en que se demuestra el importante papel de los linfocitos en la respuesta inmunológica, muchos han sido los esfuerzos realizados por parte de los investigadores en obtener suspensiones de linfocitos viables, esencialmente libres de granulocitos y eritrocitos, partiendo de sangre venosa. Por esta razón se han descrito numerosos métodos, que en sus comienzos se limitaban a la purificación de leucocitos, fundamentalmente por medio de la sedimentación espontánea de linfocitos, con la adición de agentes como la Fitohemaglutinina (FHA), el dextrán, el fibrinógeno, (Skoog y Beck, 1956), la metil celulosa (Böyum, 1964), que favorecen la formación de agregados eritrocitarios. Posteriormente, ha-

sándose en la capacidad adhesiva y fagocítica, característica en algunos de los elementos celulares de la sangre, se obtuvieron suspensiones de linfocitos más puras. Actualmente con la técnica de centrifugación en gradiente de densidad, donde se han utilizado diversas soluciones de sustancias como la albúmina (*Ahrons y Kissmeyer-Nielsen, 1968*), Isopaque-metil celulosa, Isopaque Ficoll (*Böyum, 1964, 1968*), Ficoll-triosil (*Harris y Ukaejiofo, 1969, 1970*) se ha logrado la obtención de suspensiones de linfocitos con alto porcentaje de pureza.

Recientemente se ha utilizado el Verografin en la purificación de linfocitos por centrifugación (*Babusíková y Medzihradsky, 1974; Babusíková y cols., 1975; Babusíková y Novotná, 1975*) con buenos resultados, y se ha reportado que las suspensiones linfocitarias obtenidas con dicho método no difieren significativamente en el grado de pureza y la viabilidad de los linfocitos obtenidos, comparados con los purificados por el método descrito por Böyum, (1968) aunque el rendimiento es superior, el costo es menor y el método es mucho más rápido (*Mallea y Díaz, 1975*).

Nuestro objetivo ha sido cultivar y estimular con FHA y en cultivo mixto los linfocitos purificados por este método con el propósito de observar su comportamiento.

MATERIALES Y METODOS

Se recogieron 5 muestras de 5 ml de sangre venosa de donantes de Banco de Sangre en tubos siliconados con tapa de rosca, heparinizados (Liquemine Roche, ROCHE) a razón de 50 U/ml de sangre. Se le realizó a cada muestra conteo leucocitario total mediante hemocitómetro y extendidos en láminas. Se tiñeron con May Grünwald-Giemsa, para realizarles conteo diferencial.

Cinco mililitros de sangre fueron depositados sobre un volumen igual de una solución de Verografin Spofa al 15% (gravedad específica 1.076-1.077). Se preparó un lote único para todas las muestras, y se fraccionó mediante centrifugación en gradiente de densidad en una centrífuga de mesa MSE a 700 xg (tomado el radio al centro del tubo), durante 20 minutos a temperatura ambiente. La suspensión linfomonocitaria fue extraída de la interfase con una pipeta Pasteur y fue lavada dos veces, en medio de salina tamponada con fosfato pH 7.2 (PBS) y una vez en medio

de cultivo Parker suplementado con una mezcla de suero humano AB al 20%, y con 100 U de penicilina y 100 microgramos de estreptomycin por ml de medio. Se determinó viabilidad y el número de células con el método de exclusión de tinción de Azul de Tripano y se reajustó la concentración a $7,5 \times 10^5$ células vivas por mililitro. Se extendió una gota de las células purificadas mediante centrifugación y se tiñeron las mismas.

Para la obtención de las células estimuladoras en el cultivo mixto se siguió la técnica antes descrita, pero partiendo de 10 ml de sangre venosa. Se le agregaron 25 microlitros de Mitomicina-C (Mitomycin-C, Sigma Chem. Co.) por cada 10^7 células obtenidas. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se lavaron tres veces con PBS y una vez con medio de cultivo. Se ajustó la concentración a 3×10^6 células por mililitro.

Los cultivos se realizaron en tubos de vidrio de $6 \times 0,8$ cm de fondo plano, donde se depositaron 3×10^5 células por tubo en un volumen de 0,4 ml de medio de cultivo. Se estimularon con 2 microgramos de FHA (Bacto-Phytohemagglutinin M, Difco Lab.) y para el cultivo mixto con 6×10^5 células estimuladoras, cada uno tenía sus propios controles. Cada determinación se hizo por duplicado.

Los tubos fueron incubados a 37°C , en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO_2 , durante 68 horas para los cultivos estimulados con FHA y durante 6 días para los de cultivo mixto.

Las células estimuladoras con FHA recibieron un pulso de 4 horas y al cultivo mixto de 16 horas con 2 microCi de timidina tritiada (Methyl- H^3 Thymidine, 17 microCi/mM; The Radiochemical Center, Amersham).

El procesamiento de las células después del pulso de timidina se siguió de acuerdo a la técnica descrita por Paty y Hughes, (1972), en ambos casos. La radioactividad en los viales se contó durante un minuto en un espectrómetro de centelleo líquido (Tracerlab), con una eficiencia de un 40%, medida con un standard de hexadecano tritiado (The Radiochem. Cent., Amersham).

Se calcularon los índices de transformación blástica sobre la base de la siguiente relación:

$\text{IT} = \text{cpm de células estimuladas} / \text{cpm de células no estimuladas}$.

RESULTADOS

Nuestro estudio estuvo dirigido fundamentalmente hacia cuatro aspectos. En primer lugar se determinó el rendimiento celular; en segundo lugar la viabilidad de las células obtenidas; en tercer lugar su pureza y por último la respuesta de las células purificadas a la estimulación con FHA en el cultivo mixto.

La cantidad de células obtenidas osciló entre $0,8-2 \times 10^6$ células viables por ml de sangre original. El rendimiento linfocitario, basado en el conteo linfocitario total de la muestra de sangre original con respecto al obtenido por la purificación, se encuentra predominantemente alrededor del 25%. La viabilidad se determinó en todos los casos después de los lavados de las células purificadas y siempre fue superior al 97,5%.

Se contaron 200 células en cada extendido y el porcentaje de linfocitos fue de 94-96%, el de monocitos de 4-6%, menos del 1% de polimorfonucleares y no se encontraron eritrocitos.

Las células estimuladas con FHA tuvieron un índice promedio de transformación de 18; y las células estimuladas en cultivo mixto, tuvieron un índice de transformación de alrededor de 7.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La cantidad de células obtenidas, así como la pureza de las suspensiones celulares coincide con las obtenidas por Mallea y Díaz, (1975).

De acuerdo a la cantidad de células obtenidas por ml de sangre original, el método garantiza la suficiente cantidad de células para poder realizar curvas de dosis respuesta a la FHA que facilita la identificación de los individuos con anormalidades de la función inmunológica medida por células (Penhale y cols., 1974), además de otras estimulaciones simultáneas, partiendo de poca cantidad de sangre venosa de un individuo, lo cual cobra importancia si el estudio se desea realizar en niños.

En los cultivos se trabajó con un número reducido de linfocitos, ya que ofrece mayor utilidad para el uso clínico (Yamamura, 1973).

Como se puede apreciar las suspensiones celulares purificadas por el método de centrifugación en gradiente de densidad utilizando el Vero-grafin no ofrecen inconvenientes con respecto a rendimiento, viabilidad

y la pureza de las mismas, así como en su comportamiento en los cultivos con estimulación con FHA y en el cultivo mixto.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos la ayuda prestada por las técnicas Isabel C. Pérez y Juana G. Delgado; la asesoría en técnicas hematológicas por el Prof. Dr. P. Ula-cia; la cooperación del Banco de Sangre del Hospital Militar Escuela 'Carlos J. Finlay' y del Banco de Sangre Provincial de La Habana.

REFERENCIAS

- AHRONS S. AND KISSMEYER-NILSEN. Lymphocyte suspensions for tissue typing. *Vox Sanguinis* 15, 75, 1968.
- BABUŠÍKOVÁ O. AND MEDZIHRADESKÝ J. Survival of human peripheral blood lymphocytes in short-term cultures with PHA in cancer patients and healthy controls. *Neoplasma* 21, 655, 1974.
- BABUŠÍKOVÁ O., NOVOTNÁ L., KOREC S., SCHNEKOVÁ K., TURKOVÁ D., KAVRÁNKOVÁ M., PLENTOVÁ K. AND MEDZIHRADESKÝ J. Change in the proportion of T and B lymphocytes in human malignant neoplasia in relation to the clinical stage. *Neoplasma* 22, 413, 1975.
- BABUŠÍKOVÁ O. AND NOVOTNÁ L. Further evidence on Lymphocyte resistance of tumor-bearing in vitro rats to phytohemagglutinin. *Neoplasma* 22, 639, 1975.
- BÖYUM A. Separation of white cells *Nature* 204, 4960, 1964.
- BÖYUM A. Separation of Lymphocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, Suppl. 97, 1968.
- HARRIS R. Y UKAEJIOFO E. O. Rapid preparation of lymphocytes for tissue-typing. *The Lancet* II, 7615, 327, 1969.
- HARRIS R. AND UKAEJIOFO E. O. Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation procedure. *Brit. J. Haematol.* 18, 229, 1970.
- MALLEA L. Y DÍAZ J. W. (Comunicación personal) 1975.
- PATY D. W. AND HUGHES D. Lymphocyte transformation using whole blood cultures: an analysis of response *J. Immunol. Meth.* 2, 99, 1972.
- PENHALE W. J.; FARMER A.; MACCUISH A. C. AND IRVINE W. J. A rapid micromethod for the phytohaemagglutinin-induced human lymphocyte transformation test. *Clin. Exp. Immunol.* 18, 155, 1974.
- SKOOG W. A. AND BECK W. S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leucocytes. *Blood* 11, 436, 1956.
- YAMAMURA M. Standardization of lymphocyte transformation to PHA. *Clin. Exp. Immunol.* 14, 457, 1973.