

Medicentro 1998, 2(3)**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
SANTA CLARA, VILLA CLARA****MARCADORES LINFOCITARIOS EN SANGRE DEL RECIÉN NACIDO**

Por:

Dr. Alfredo Gutiérrez Maydata¹ y Dra. C. Mayra Masjuán del Pino².

1. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Asistente ISCM-VC.
2. Especialista de I Grado en Inmunología. Profesora Titular. ISCM-VC.

Resumen

Se estudiaron muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos a término y peso acorde a su edad gestacional, con el objetivo de analizar la composición de células linfocitarias en el neonato y contribuir al creciente esfuerzo que se realiza en el estudio y comprensión de las defensas inmunológicas del feto y el recién nacido. En las muestras estudiadas se encontró leucocitosis, con incremento absoluto de células mononucleares, disminución del porcentaje de células T e incremento de su número absoluto, valores similares al adulto de células formadoras de rosetas EAC, índice auxiliar/supresor reducido y presencia de subpoblación de linfocitos T inmaduros en sangre periférica (T6⁺). Los resultados refuerzan el criterio de que la madurez inmunológica del recién nacido está fuertemente influenciada por el predominio de la función inmunosupresora, a expensas de una disminución de la actividad auxiliadora.

Descriptor DeCS:

Antígenos de superficie
Recién nacidos
Recuento de leucocitos
Linfocitos T

Summary

Blood samples from term-newborn umbilical cord and weight according to gestational age were studied to analyze lymphocyte cell composition in the newborn and to contribute to the increasing effort which is being made in the study and understanding of fetal and newborn immunological protection. Leukocytosis with absolute increase of mononuclear cells, decrease of T-cell percentage and increase of its absolute number, amounts of EAC rosette forming-cells similar to those of adults, reduced helper/suppressor rate, and presence of immature T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood (T6⁺) were found in the studied samples. Results support the statement that newborn immunological maturity is strongly influenced

by the predominance of immunosuppressor function, at a helper activity decrease expense.

Subject headings:

ANTIGENS SURFACE

INFANT NEWBORN

LEUCOCYTE COUNT

T LYMPHOCYTES

Introducción

Las infecciones bacterianas y virales constituyen un problema de primer orden en la medicina neonatal. Aparecen como la causa primaria de la mortalidad perinatal en un 5 a un 20 % de los casos, y puede encontrarse, además, como un factor que, aunque no sea el primario, sí constituye un agravante entre un 20-70 % de los niños que fallecen por otras causas, especialmente ante la presencia de factores de riesgo perinatales, donde la sospecha de sepsis ha sido informada como 65 veces mayor¹.

Los mecanismos inmunológicos humorales y celulares forman las bases de la defensa contra infecciones en el organismo humano. Particularidades específicas de ambas funciones caracterizan la impotencia inmunológica del organismo en la fase de adaptación a la vida extrauterina. El número, distribución de subpoblaciones y la capacidad funcional de las células T y B, son aspectos de particular interés para poder valorar la integridad defensiva del recién nacido. Sin embargo, los resultados de las investigaciones realizadas son frecuentemente contradictorios, además de que no responden a las características de nuestra población. Se hace por tanto evidente la importancia de profundizar en el estudio del sistema inmunológico del recién nacido, como vía que ayude a esclarecer los problemas clínicos y teóricos relacionados con las infecciones neonatales.

Material y Método

La muestra estuvo integrada por recién nacidos de ambos sexos, normales al momento del nacimiento, de peso superior a 2500 g y edad gestacional de la madre de 38 a 42 semanas. Todos nacieron en el Hospital Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de la ciudad de Santa Clara, y se les tomó sangre del extremo placentario del cordón umbilical, la cual fue coleccionada en tubos heparinizados.

Se utilizaron como controles a adultos sanos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 25 años, donantes voluntarios del Banco Provincial de Sangre o estudiantes del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, a los que se les extrajo sangre venosa en tubos heparinizados.

La sangre se conservó a temperatura ambiente, y siempre fue procesada durante las 5 primeras horas de su obtención.

Se realizó conteo total de leucocitos, determinación del porcentaje y número absoluto de linfocitos, utilizando coloración de Giemsa.

La obtención de células mononucleares se realizó en todos los casos de acuerdo con la técnica de Böyum² modificada, utilizando solución separadora de Ficoll-Visotrust (? =1,077) y PBS. En todos los casos se comprobó la vitalidad mediante la prueba de exclusión de azul de tripano, la cual fue superior al 95 %.

Se cuantificaron las células RE⁺, formadoras de rosetas espontáneas, con hematíes de carnero y las EAC⁺ con eritrocitos humanos, utilizando células mononucleares de

20 recién nacidos y 30 adultos. Para la determinación de las células RE⁺ se siguieron las indicaciones de Friemel³, usando eritrocitos de carnero a una concentración de $5 \cdot 10^{-3}$ cel/ml en medio Eagle. Se permitió la formación de rosetas por espacio de 18 horas a temperatura de 4 °C antes de la determinación del porcentaje de células RE⁺, y se consideraron como tales a aquellas con tres o más eritrocitos unidos.

Las células EAC⁺ se obtuvieron siguiendo las indicaciones de Seiler y colaboradores⁴, y se emplearon eritrocitos humanos Rh positivos y suero anti-D previamente inactivado. Se consideraron células EAC⁺ a las que se unían a tres o más eritrocitos.

Después de la obtención de las células mononucleares, se separaron los linfocitos T mediante modificación de la técnica de Eckert⁵ utilizando 200 mg de fibra de nylon en columnas plásticas de 5 ml de volumen. La pureza del método se comprobó mediante la prueba de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero³, la que fue superior al 98 % en la fracción de linfocitos T.

La técnica Alfa Naftil Acetato Estearasa (ANAE) se realizó por modificación del método descrito por Müller⁶ utilizando pararrosanilina y alfa-naftil acetato. Se desarrollaron dos patrones para las células T que coinciden con lo informado en la literatura^{7, 8}.

Patrón Tm : Células con citoplasma verde y gránulos gruesos rojo-carmelitas.
Patrón Tg : Células con citoplasma verde y pequeños gránulos rojo-carmelitas.
Células con citoplasma verde, sin gránulos y, por tanto, ANAE negativas.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales producidos por el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de Cuba (INOR), utilizando las células mononucleares obtenidas de sangre de cordón de 30 recién nacidos y venosa de 21 adultos (en T6 el estudio comprendió 8 recién nacidos y 12 adultos). Se empleó el anti-T4 (anti-linfocitario de células T inductoras), Anti-T8 (reconoce linfocitos T supresores/citotóxicos) e IOR-T6 (dirigido contra timocitos fetales y del adulto). Se realizó técnica inmunoenzimática donde se utilizó antisuero antirratón biotinilado, como conjugado el complejo biotina-estreptovidina-peroxidasa y como sustrato el amino 9 etil carbazol (AEC).

Se contaron un total de 200 células, y fueron consideradas como positivas las que desarrollaron una coloración rojo-carmelita en su membrana.

Tanto los resultados obtenidos de recién nacidos, como los controles, se calcularon mediante la media aritmética y el error estándar de la media. La comparación entre los valores de ambos grupos se realizó con la aplicación de la prueba t de Student de diferencia de proporciones, con niveles de significación de 0,05, 0,01 y 0,001 de posibilidades de cometer el error tipo I, los que llamaremos significativos, altamente significativos y muy altamente significativos.

Resultados

Se comprobó una diferencia de muy alta significación estadística entre sangre de cordón umbilical y adultos en cuanto a la cantidad de leucocitos y linfocitos (tabla 1). El porcentaje de células ER⁺ fue inferior en el recién nacido, mientras que el número absoluto fue mayor que el de adultos. Por el contrario, los valores de células EAC⁺ no tuvieron diferencia significativa en su proporción entre ambas muestras, pero sí en el número absoluto, con predominio del recién nacido y con una muy alta significación estadística, explicable por la linfocitosis encontrada.

Tabla 1. Número total de leucocitos y linfocitos, porcentaje y número absoluto de células formadoras de rosetas espontáneas (RE⁺) y rosetas EAC (EAC⁺) en adultos y recién nacidos.

Determinación	Adultos n=30 n= 30		Recién nacidos n=20 n=20		Significación estadística
	\bar{X}	S _x	\bar{X}	S _x	
Nº. total de leucocitos*	6,632	0,273	11,460	0,278	p < 0,001
Nº. total de linfocitos*	2,157	0,123	4,354	0,163	p < 0,001
% células (RE ⁺)	72,100	0,452	68,020	0,939	p < 0,001
Nº. absoluto de células (RE ⁺)*	1,562	0,079	2,961	0,233	p < 0,001
% células (EAC ⁺)	18,008	0,500	18,003	0,680	NS
Nº. absoluto de células (EAC ⁺)*	0,434	0,026	0,797	0,034	p < 0,001

* (X 10⁶ cel/ml)

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la prueba ANAE para linfocitos T. El patrón T fue superior entre adultos, con una alta significación estadística en relación con los recién nacidos; lo contrario al Tm , lo que explica el índice Tm /Tg de 1,85 en el recién nacido y de 3,64 en el adulto.

Tabla 2. Subpoblaciones de linfocitos T con patrón Tm y Tg en la prueba de ANAE en sangre de adultos y cordón umbilical.

Patrón	Población	No.	Valor medio	Error estándar de la media	Significación estadística
Tm	Adulto	44	79,00	0,730	p < 0,01
	Cordón	42	65,88	0,691	
Tg	Adulto	44	21,00	0,730	p < 0,01
	Cordón	42	33,85	0,663	

Los valores de las subpoblaciones de linfocitos T4⁺ (tabla 3) en recién nacidos, muestran una disminución de alta significación estadística, lo contrario a las células T8⁺, cuyo porcentaje es superior entre los neonatos. Se observa una inversión del índice T4/T8 en sangre de cordón, que muestra el predominio de la actividad supresora.

Tabla 3. Subpoblaciones linfocitarias T₄⁺, T₈⁺ y T₆⁺ en células mononucleares periféricas de adulto y cordón umbilical.

Patrón	Población	No. de casos	\bar{X} (%)	\bar{Sx}	Significación estadística
T ₄ ⁺	Adulto	21	46,90	0,364	p < 0,01
	Recién nacido	30	39,56	0,526	
T ₈ ⁺	Adulto	21	26,71	0,447	p < 0,01
	Recién nacido	30	49,13	0,819	
T ₆ ⁺	Adulto	12	2,40	0,283	p < 0,001
	Recién nacido	8	18,50	0,585	

En la misma tabla aparecen los porcentajes de células T₆⁺ en ambas muestras; los resultados indican una diferencia de muy alta significación a favor del neonato, con valores de T₆⁺ de 18,5 ± 3,2 % y para el adulto de 2,4 ± 1,3 %.

Discusión

Los resultados obtenidos para los leucocitos y linfocitos de sangre del cordón umbilical concuerdan con los de otros autores⁹⁻¹¹. La linfocitosis del recién nacido es aceptada prácticamente de forma unánime, y su mayor interés en este análisis es la posibilidad que brinda de poder calcular el número absoluto de las diferentes subpoblaciones estudiadas.

La cuantificación de linfocitos T (células ER⁺) en cordón umbilical ha sido fuente de considerable interés y controversia. Hay autores que no han encontrado diferencias en la cantidad de células ER⁺ entre cordón umbilical y adultos^{11,12}, pero la mayoría de los trabajos revisados coinciden con nuestros resultados al encontrar una disminución del porcentaje con respecto al adulto^{9,13,14}. Por otra parte, el número absoluto fue mayor que el de adultos, lo que pudiera explicarse por la linfocitosis relativa que aparece en el recién nacido. La presencia de células T ER⁻ por inmadurez de los receptores de hematíes de carnero en el recién nacido, podría ser uno de los factores presentes, como ha sido ya planteado por Bussel¹¹.

En relación con las células B, se han utilizado diferentes marcadores de membrana para identificar para su identificación; en este sentido las células EAC⁺ con receptores para C₃ complemento, referidos fundamentalmente a las células B, se utilizan como marcadores referativos para esta subpoblación de linfocitos. Del análisis de nuestros resultados puede comprenderse que en sangre de cordón umbilical no hay diferencias en relación con el adulto en cuanto a las células mononucleares con receptores para C₃ complemento, lo que concuerda con los criterios a favor de que la limitada capacidad en la respuesta humana del neonato no sea atribuido a la inmadurez de células B, sino a la defectuosa función de los linfocitos T¹⁵, bien por déficit de células T auxiliaoras o por predominio relativo de la actividad supresora de los linfocitos T¹⁶.

Para diferenciar las subpoblaciones de células T en el hombre, se han venido utilizando las estearasas y, más recientemente, los anticuerpos monoclonales. Landay⁸ encontró resultados que muestran diferentes patrones en la coloración ANAE en las células ER⁺ que coinciden con las características de sus receptores de membrana para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas. Se ha demostrado⁷ que las células que presentan receptores para la porción Fc de la IgM (Tm) actúan como auxiliaoras de la diferenciación y proliferación de células B en respuesta al

mitógeno PMW, mientras que las que tienen receptores para la Fc de la IgG (Tg), suprimen la proliferación y diferenciación inducida por las T auxiliaoras. Para evitar la interferencia de las células B, que desarrollan un patrón similar a los linfocitos T, se hace necesario separarlas; en nuestro caso utilizamos el método descrito, que aprovecha la capacidad de adhesión de las células B a la fibra de nylon, y quedan solamente los linfocitos T en el eluato.

Nuestros resultados, con una disminución muy significativa del porcentaje de T y un incremento también muy significativo de T en relación con el adulto, podrían ser un elemento adicional para fundamentar la marcada actividad supresora del recién nacido. La disminución, en casi dos veces, de la relación Tm / Tg es un reflejo de ello. Teniendo, además, presente que alrededor del 90 % de las células T son ANAE negativas (células con citoplasma verde y sin gránulos) y sólo el 10 % tiene una actividad moderada (gránulos dispersos), puede plantearse que esta técnica refleja un incremento de las células T inmaduras, pues se acepta que la actividad estearásica es característica de células maduras^{17, 18}.

Por otra parte, los resultados del estudio con anticuerpos monoclonales anti-T4 y anti-T8 coinciden con los de otros autores^{19,20}, ya que se encontró una disminución en el número de células con patrón T4⁺ en la sangre de cordón, mientras que las células T8⁺ aumentaron en relación con la población control. Además, pudo observarse la inversión del índice T4/T8, lo que es un reflejo más del predominio de la actividad supresora del neonato.

Se pudo demostrar la presencia de células T inmaduras en sangre de cordón mediante el hallazgo de células T6⁺. La diferenciación de los linfocitos T en el timo tiene lugar en tres etapas, y es en la segunda etapa (timocito común) en que se expresan los antígenos T6; ya en la tercera se hacen T6 negativos. Por ello, encontrar células T6⁺ en sangre es un indicador evidente de inmadurez.

Esta subpoblación de células inmaduras podría contribuir a explicar la alta tasa de proliferación espontánea y ante mitógenos encontrada en linfocitos neonatales, así como los trastornos funcionales en la capacidad de respuesta encontrados en los recién nacidos.

Por último, dado que es conocido que no existe siempre coincidencia entre los marcadores que expresan las células linfoides en la sangre de cordón y la función biológica que realizan, se ofrece otra perspectiva de interpretación a nuestros resultados, que debe tenerse presente.

Referencias bibliográficas

1. Vargas PE. Bacteremia y sepsis neonatal. Rev Med Panamá. 1990; 15(2):127-137.
2. Böyum A. Separation of leukocyte from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest. 1968; 21(Suppl 97): 1257-1270.
3. Friemel H. E-Rosseten-test. En su Immunologische arbeits methoden. 3. Ed. Jena:Veb Gustav Fischer, 1984:299-302.
4. Seiler FR, Fidler IJ. Über die brauchrbit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphozyten: Spontanrosseten, Komplementrezeptor-Roseeten und Immunoglobulin rezeptören. Behring Inst Mitt: 1972;52:26.
5. Eckert R. Trennung von zellen des inmunosystems. En Friemel H. Immunologische Arbeitsmethoden. 3ed. Jena: Veb Gusatv Pischer, 1984:252-281.

6. Müller J. Nonspecific acid esterase activity: a criterium for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol.* 1975; 5:270-274.
7. Grossi CE, Webb SR. Morphological and histochemical analyses of two human T-cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG. *J Exp Med* 1978; 147:1405-1417.
8. Lauday A, Clement L. Phenotypically and functionally distinct subpopulations of human lymphocytes with T cell markers also exhibit different cytochemical patterns of staining for lysosomal enzymes. *Blood* 1984; 65(5):1007-1071.
9. Griffiths Chi S, Laszlo M. Characterization of immature T cell subpopulations in neonatal blood. *Blood* 1984; 64:296-300.
10. Balow M, Oakes J.E, David WB. Peripheral blood T-cell subpopulations in the very low birth weight (less than 1500 g) *Am J Hematol* 1987; 24:85-92.
11. Bussel JB, Corey L, Adams HG. Analysis of lymphocyte proliferative response subpopulations in very low birth weight infants and during the first 8 weeks of life. *Pediatr Res* 1988; 23:457-462.
12. Miler I, Sabala V. Immunological aspects of neonatal infections. *Zentralbl Gynakol* 1984; 106:715-720.
13. Walcs E, Kohe S, Loo LS, Pickening LK. Developmental changes in lymphocyte surface markers. *Acta Paediatr Hung* 1982; 23:299-307.
14. Samsyscia GA, Frenke WK. Assessment of peripheral lymphocyte populations in healthy newborns. *Pediatr* 1985; 3:11-15.
15. Stites DP, Ten AI. *Basic and clinical immunol.* 7ed. Estados Unidos: Ed. Appleton and Lange, 1991.
16. Mengel K. Zu einigen besonderen der Immunologie neugeborenen. *Zentralbl Gynakol* 1984; 106:709-714.
17. De Waele M. Hematologic values and lymphocyte subsets in fetal blood. *Am J Clin Pathol* 1988; 89(6):742-746.
18. Cohn PD. Differences in nonspecific esterase from normal and leukemic monocytes. *Blood* 1987; 69(6):1574-1579.
19. Maccario R. Lymphocyte subpopulation in the neonate: Identification of immature subset of OKT8-positive OKT3-negative cell. *J Immunol* 1983; 130(3):1129-1131.
20. Solinger AM. Immature T lymphocyte in human neonatal blood. *Cell Immunol* 1985; 92:115-122.