

INMUNIDAD — TECNICA DE LAS ROSETAS *

JOSÉ O. VALL COMBELLES **

Institut de Cancérologie et Immunogénétique

(Prof. MATHÉ)

Hôpital Gustave Pussy

París

Una de las vertientes más nuevas, que han irrumpido con fuerza en el campo de la medicina y biología en general, ha sido la inmunidad, que como a todo lo desconocido, se le colocan esperanzas y se intensifica el estudio de traducir todo lo que nos manifiesta para poder confeccionar una explicación coherente a sus mecanismos y respuestas.

Al sistema inmunitario se le ha comparado al cerebro. Órgano que se adapta al medio ambiente exterior, variando el potencial bioquímico en vez de experiencias sensoriales. Se dice asimismo que tiene memoria, aunque esta faceta, la desarrolla con células que se mueven por el organismo registrando los cambios del medio en que se halla o respondiendo a los agentes provocadores de estos cambios.

La respuesta inmunitaria, es sumamente importante, aunque se mire desde distintos y aparentemente dispares puntos de vista.

Por el lado de la biología molecular, es un modelo para inducir las síntesis de las proteínas en las células de los animales superiores. Al desarrollo le interesa la formación de anticuerpos, como ejemplo fácil de controlar la diferenciación.

Desde el punto de vista filogenético, representa un importante mecanismo adaptable como patrón evolucionista de los vertebrados superiores. En Medicina Clínica, la respuesta inmune es importante en el campo de las enfermedades infecciosas, trasplante de órganos, alergias y enfermedades autoinmunes.

El momento actual respecto al estudio inmunitario se concreta en explicar muchas de sus reacciones que se dan frente a ciertos ingredientes o con técnicas precisas, pero que no se sabe dar una explicación lógica a este hecho.

El descubrimiento de la causa haría más fácil el conocer sus límites e indicaciones frente a determinadas patologías.

* Beca FIDES de la SOCIEDAD CATALANA DE PEDIATRÍA.

** Médico Becario de la SOCIEDAD CATALANA DE PEDIATRÍA.

DESCRIPCIÓN

En el año 1974 BIOZZI y ZOALBERG describieron la denominada técnica de las Rosetas, dando culminación a una prueba cómoda y de fácil visualización para poner de manifiesto las células que fijan antígenos en su superficie, después de una serie de pruebas de laboratorio salpicadas de dificultades que se venían practicando hasta entonces para demostrar esta propiedad.

Se basa dicha técnica en poner en presencia células linfoides de animales sensibilizados (a hematíes heterólogos) frente a hematíes. Basta un simple contacto para que estos hematíes se aglutinen alrededor de algunos linfocitos, dando lugar a la Roseta. Para otorgarle la denominación de Roseta debe haber cuando menos cuatro glóbulos rojos rodeando la célula linfoide.

El descubrimiento de este fenómeno es un paso fundamental en Inmunología, ya que las células que producen anticuerpos e incluyen las que llevan memoria inmunológica son formadoras de Rosetas. En la vertiente clínica es asimismo de gran ayuda para la evaluación del dintel inmunológico del individuo frente a los inmunosupresores, citostáticos, etcétera.

En los animales de laboratorio, como por ejemplo la rata inmunizada, la mayoría de células formadoras de Rosetas son igualmente células productoras de anticuerpos. Se encuentran aproximadamente de 5 a 10 % de plasmocitos en el centro de la Roseta; siendo éstas las células principales para la producción de anticuerpos. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado, que una población importante de células formadoras de Rosetas llevan memoria inmunológica, lo que quiere decir que no son productoras de anticuerpos.

El empobrecimiento de células formadoras de Rosetas en el bazo de rata inmunizada por hematíes de carnero, suprime la capacidad de las células esplénicas para responder a los hematíes de carnero.

Los monocitos-macrófagos también pueden tener la capacidad de formar Rosetas. Dichas células macrofágicas se eliminan fácilmente con la incubación de células esplénicas a 37° en vidrio o plástico. Por otra parte, no se encuentran en la sangre circulante, por lo que estas Rosetas "no específicas" no se interfiere con las denominadas específicas.

Hay que tener en cuenta pues, que las células que en el organismo fijan el antígeno en superficie e inician la respuesta inmunitaria, forman Rosetas "in vitro", cuando se las pone en contacto con el antígeno para el cual están específicamente predestinadas, lo que abunda, en la teoría de la selección clonal de BURNET.

La respuesta inmunitaria frente a algunos antígenos, como pueden ser los hematíes de carnero, hace intervenir la cooperación de dos tipos



Fig. 1. — Roseta tipo T.

de células: Células timo-dependientes (T) y bursa-dependientes (B). El papel de los macrófagos se concreta en el primer estadio de la respuesta inmunitaria, transfiriendo a los linfocitos un superantígeno. Por otra parte parece ser que en cierto sistema, la célula T podría reconocer a ciertos antígenos distintos de los de la célula B, como lo demuestra la respuesta frente a un hapteno. Al parecer son las células B las que reconocen al hapteno y producen el denominado anticuerpo anti-hapteno. Las células B, es importante señalar, son radiosensibles para la respuesta primaria.

En los días que siguen a la estimulación por el antígeno, las células T se dividen (según demostró DAVIES) siguiendo las mitosis de las células T con un marcador cromosómico. Los principales métodos para efectuar deplecciones en un organismo de sus células T son; la timectomía neonatal, tratamientos con suero antilinfocítico y la canalización del conducto torácico.

Diversos autores han mostrado que en la producción de anticuerpos frente a hematíes de carnero, son las células B las que producen los anticuerpos que se encuentran en el suero.

Si de todo lo dicho nos concretamos al hombre normal, una proporción importante (de 1 a 5 %) de los pequeños linfocitos circulantes forman Rosetas en presencia de hematíes de carnero. Minuciosos estudios han

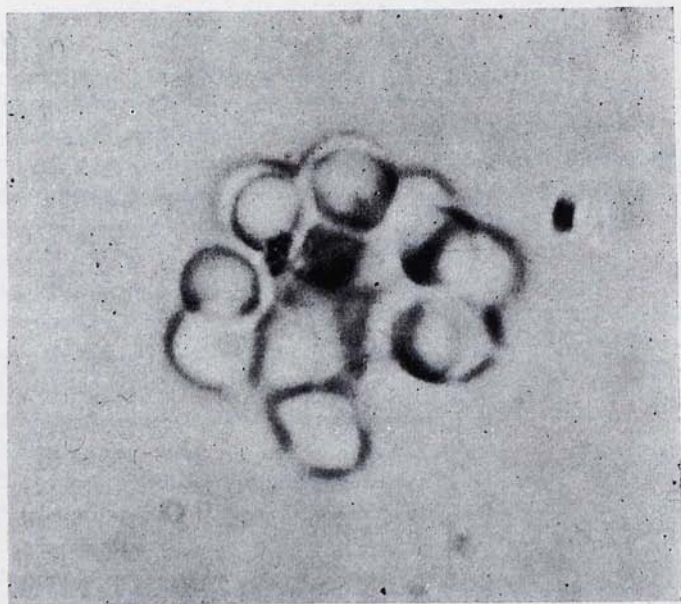


Fig. 2. — Roseta tipo B.

mostrado que las células formadoras de Rosetas humanas frente a hemáties de carnero no son específicas para el antígeno, siendo inhibidas difícilmente por los sueros anti-inmunoglobulinas; oponiéndose de esta manera a las células formadoras de Rosetas de las ratas. El mecanismo de formación del fenómeno de las Rosetas en el hombre es todavía desconocido. A pesar de ello, las Rosetas humanas anti-carnero, son importantes en la evaluación de sueros anti-linfocíticos, detección del rechazo de injertos de riñón, etc., ya que representan un índice de una subpoblación de linfocitos que juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria ya sea B o T.

En cuanto a las aplicaciones clínicas de la técnica de las Rosetas, se concretan en la vertiente inmunológica. En este momento se está en el camino de tratar de poner en evidencia las Rosetas en gran parte de las enfermedades inmunológicas, utilizando para ello el antígeno adecuado, fijado en los hemáties. No en vano dicha técnica permite examinar distintas vertientes de la inmunidad, como son: fagocitosis por los macrófagos, reconocimiento del antígeno por las subpoblaciones de linfocitos B y T, producción de anticuerpos, memoria inmunológica, etc.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describirán no sólo las distintas técnicas para

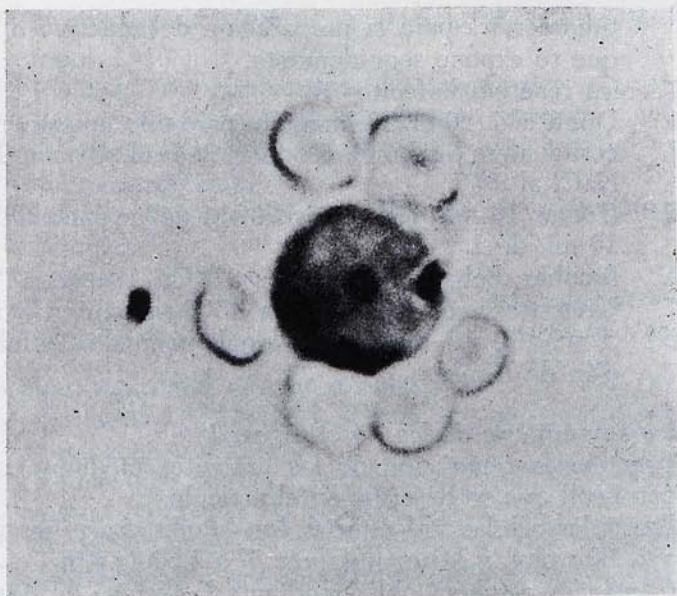


Fig. 3. — Roseta tipo M-M.

poner de manifiesto las Rosetas T, B y monocito-macrófago (M-M), sino algunas variantes de una misma técnica.

A. — *Técnica de los diferentes reactivos.*

a) Técnica reactivo linfocito T.

- 1.º Lavar tres veces los hematíes de carnero con ClNa al 9 %.
- 2.º Efectuar una solución al 1 % en medio de Hanks.

b) Técnica reactivo M-M.

- 1.º Tomar una gota de suero antihemático de carnero en 2 ml. de ClNa al 9 %.
- 2.º De la solución 1.ª, tomar 0,4 ml. en 9,6 ml. de ClNa a 9 %.
- 3.º Tomar 10 ml. de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5 % (efectuada dicha suspensión con ClNa al 9 %) y añadirle 10 ml. de la solución 2.ª.
- 4.º Incubar esta preparación 30' a 37° C.
- 5.º Lavar tres veces con un tiempo de 5' y a 1.500 r.p.m., en ClNa al 9 %.
- 6.º Tomar de 5.ª, 0,1 ml. del precipitado en 9,9 ml. de solución de Hanks (solución al 1 %).

Es importante destacar, que el reactivo M-M se debe preparar en dos tubos (doble cantidad), ya que el primer



tubo servirá para la preparación del reactivo linfocito B, que se expone seguidamente.

c) Técnica reactivo linfocitos B.

- 1.º Diluir al 1/20 el C3 humano (para ello únicamente se necesita suero humano). Es decir: 0,5 ml. C3 con 9,5 ml. de NaCl al 9 %.
- 2.º Tomar 10 ml. del reactivo M-M (solución final) y añadir 10 ml. de 1.ª.
- 3.º Incubar dicha solución 30' a 37° C.
- 4.º Lavar tres veces durante 5' a 1.500 r.p.m. en ClNa al 9 %.
- 5.º Tomar 0,1 ml. del precipitado 4.º y añadir 9,9 ml. de solución de Hanks.

B. — *Técnica Inmunitaria de las Rosetas tipo T.*

- 1.º Efectuar la separación de los linfocitos mediante la técnica con ficoll que se describe en el artículo.
- 2.º Lavar las células linfocitarias con Hanks. La primera vez 10' a 2.000 r.p.m. y la segunda vez 5' a 1.500 r.p.m.
- 3.º Contar las células viables mediante la técnica de Azul Tripán con una muestra. Si hay 40 ó 50 % de células muertas no se debe iniciar la técnica.
- 4.º Efectuar una suspensión de células a razón de 4 por 10 elevado a 6 células por ml.
- 5.º Tomar 0,25 ml. de 4.º (aproximadamente un millón de células) y mezclarlo con 0,25 ml. de hematíes de carnero del reactivo T.
- 6.º Incubarlo 15' a 37° C y posteriormente centrifugarlo durante 5' a 800 r.p.m.
- 7.º Incubarlo de nuevo 15' a 4° C. Posteriormente decantar el sobrenadante y agregar 4 ml. de Hanks.
- 8.º Resuspenderlo mediante proceso lento y rotatorio (aparato tipo APELAB). Todo ello durante 2 ó 3'.
- 9.º Lectura del resultado sobre una cámara de Neubauer o Fuchs-Rosenthal. En la observación de los resultados podremos observar las Rosetas espontáneas y los linfocitos libres. Es necesario para considerar una imagen como Roseta, que haya 4 hematíes de carnero alrededor del linfocito.

C. — *Técnica Inmunitaria de las Rosetas tipo B.*

Los apartados 1.º, 2.º, 3.º y 4.º son los mismos que los efectuados para la técnica de Rosetas T.

- 5.º Tomar 0,25 ml. del reactivo linfocitos B (reactivo C3) y mezclarlo con 0,25 ml. células linfocitarias.



- 6.º Centrifugar a 1.500 r.p.m. durante 2', bajo control de cronómetro.
- 7.º Incubar 30' a temperatura de laboratorio.
- 8.º Retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
- 9.º Añadir 2 ml. de solución de Hanks, o incluso 3 ó 4 ml. si queda muy concentrado.
- 10.º Ponerlo durante 10 segundos en un agitador rápido (tipo Wilmix).
- 11.º Lectura.

Hay que hacer notar que para el empleo del C3 solamente se necesita suero humano.

D. — *Técnica Inmunitaria de las Rosetas tipo M-M.*

Los apartados 1.º, 2.º, 3.º y 4.º son los mismos que los efectuados en las técnicas anteriores.

- 5.º Tomar 0,25 ml. del reactivo M-M y añadir 0,25 ml. de linfocitos (al igual que las técnicas anteriores).
- 6.º Incubarlo una hora a la temperatura del laboratorio.
- 7.º Añadir 3,5 ml. de solución de Hanks. Agitar suavemente con la mano.
- 8.º Lectura.

E. — *Método para eliminar las plaquetas.*

Podemos seguir dos vías. Tratar de descartar las plaquetas al principio de la técnica o al final de la misma.

1.º Desde un principio:

- a) Obtener 20 ml. de sangre y añadir 1 ml. al 3,8 % de citrato sódico.
- b) Centrifugar a 300 r.p.m. durante 10'.
- c) Desechar las plaquetas del plasma; para ello es necesario aspirar el plasma mediante una pipeta Pasteur y reemplazarlo por cloruro sódico a 0,9 % teniendo en cuenta que debemos añadir la misma cantidad que había de plasma.

2.º Técnica con fibra de Nylon.

- a) Antes de centrifugar es preciso filtrarlo a través de una fibra de Nylon para eliminar las plaquetas.
- b) Posteriormente se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 10'.
- c) Es muy importante destacar que en ningún momento debemos emplear el Nylon cuando debemos efectuar las técnicas de obtención de Rosetas B, ni Rosetas M-M.

F. — *Preparación del Ficoll-Hypaque.*

- 1.º Tomar 21,6 gm. de Ficoll y añadir 240 ml. de agua destilada. Solución A.



- 2.º Tomar 68 ml. de Hypaque y añadir 32 ml. de agua destilada. Solución B.
- 3.º Mezclar 12 ml. de la solución A con 5 ml. de la solución B. El resultado será 17 ml. de mezcla.
- 4.º Por regla general, la proporción con el volumen de sangre a mezclar será: 21 ml. de sangre por 7 ml. de Ficoll-Hypaque. Por lo tanto la proporción será de 3 ml. de sangre por 1 ml. de Ficoll-Hypaque.

DISCUSIÓN

Es importante aclarar que la técnica de las Rosetas no se considera en modo alguno una reacción a nivel antígeno-anticuerpo, ya que los hematíes de carnero no han estado nunca primados por los linfocitos del individuo en un supuesto primer contacto. Por consiguiente, siguiendo la teoría de BURNET, un supuesto antígeno en esta circunstancia nunca desencadenaría una reacción tan sumamente intensa (del orden del 55 al 60 % en las Rosetas espontáneas) si no ha habido contactos previos.

Por la misma razón expuesta anteriormente, tampoco cabe la posibilidad de que sean isoaglutininas o anticuerpos naturales. Al parecer se trata de una reacción que se da gracias a unos receptores de membrana específicos para el hematíes de carnero.

El hecho de que salgan en las distintas técnicas comentadas anteriormente Rosetas del tipo B, del tipo T o del tipo M-M, depende exclusivamente de dos variantes: a) el reactivo, y b) del modo de agitación empleado en cada técnica en que se describe en cada apartado. La imagen de la Roseta en los tipos diferentes que se han expuesto es la misma, si bien en algunos casos se ha creído ver mayor aglutinación de hematíes de carnero en los linfocitos tipo B.

Lo que nos muestran las Rosetas en sus distintos tipos es conocer, dentro de un contexto general inmunológico, y no como prueba aislada, el saber desde un punto de vista cualitativo, qué tipo de inmunidad está desarrollando el individuo en un momento determinado; ya sea en función del estado clínico, en función de los fármacos que se le administran, en función de la radioterapia, u otras vertientes.

Es necesario conocer los valores normales encontrados en cada una de las distintas técnicas, y aunque éste pueda variar en función de los valores standard de cada laboratorio, citaremos los encontrados por BACH que ha estudiado rigurosamente este campo.

Rosetas tipo T — Aproximadamente un 55 %.

Rosetas tipo B — Aproximadamente un 25 % a 30 %.

Rosetas tipo M-M — Aproximadamente de 1 a 5 %.

No es menos importante señalar cuál es la nueva nomenclatura internacional dada a los diferentes tipos de Rosetas:



Rosetas tipo T E
Rosetas tipo B C3 EAC
Rosetas tipo M-M Fc EA

Es importante resaltar una nueva faceta dentro del campo de las Rosetas, denominado Rosetas indirectas. Se trata de recubrir los hematíes de carnero de antígenos responsables de distintas patologías para observar si el linfocito ante el cual se enfrenta tiene anticuerpos específicos para reaccionar. Sólo quisiera resaltar algunas de las enfermedades que se benefician de la técnica de las Rosetas indirectas, como por ejemplo la poliartritis reumatoide, cuyo antígeno utilizado es una inmunoglobulina humana, Glomerulonefritis, siendo su antígeno membrana basal glomerular; tiroiditis y enfermedades tiroideas, el antígeno empleado es una tiroglobulina; filariasis, se utiliza el antígeno de filaria; anemias hemolíticas, el antígeno son hematíes humanos; alergias medicamentosas, cuyo antígeno son medicamentos a los cuales se puede ser sensible, etc.

Para finalizar es importante puntualizar, que las técnicas descritas, en modo alguno nos dan una visión total, ni siquiera parcial del gran campo de la Inmunología sino que, por lo contrario, es un dato más a valorar en la suma de pruebas inmunológicas que se deben efectuar de una manera constante cuando se pretende estudiar las defensas del organismo en toda su dimensión.