

Linfocitos T CD4+ y CD8+ en calostro y sangre autóloga de mujeres mexicanas

A.G. Acosta*, J. Ortiz**, L. Barragán**, S. Torres** y J.I. Santos***

*Departamento de Investigación. Escuela Médico-Naval. Secretaría de Marina-Armada de México. **Laboratorio de Inmunología y Reumatología. Hospital Infantil de México (HIM) Federico Gómez. ***Departamento de Enfermedades Infecciosas. Hospital Infantil de México (HIM) Federico Gómez.

El calostro y leche materna humanos contienen elementos celulares y humorales que confieren protección inmunitaria específica e inespecífica para el recién nacido lactante. En el presente estudio se examinó el número y proporción de leucocitos y subpoblaciones de linfocitos T en el calostro obtenido dentro de las 36-48 h después del parto en un grupo de mujeres mexicanas con edades entre 16 y 48 años. El número total de leucocitos en 63 mujeres mostró una gran variabilidad individual, con un valor medio de 829.382/μl que se incrementaba con la multiparidad; la proporción de macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos fue, respectivamente, del 66.38, 32.38 y 7.23%. En 28 casos se aislaron los linfocitos del calostro mediante gradientes discontinuos de Percoll para analizar su reactividad con anticuerpos monoclonales CD3, CD4 y CD8 mediante inmunofluorescencia indirecta. Estas subpoblaciones linfocitarias en calostro se compararon con las presentes en la sangre periférica autóloga. Si bien la proporción de linfocitos T (CD3+) en calostro (69.9%) es similar a la de sangre periférica autóloga (70.83%), la distribución de linfocitos T CD4+ y CD8+ muestra diferencias; en el calostro, la proporción de linfocitos T CD8 es más alta (45.07% en calostro por 31.7% en sangre), mientras que la de linfocitos T CD4 es más baja (33.07% en calostro por 43.2% en la sangre). El cociente linfocitario CD4/CD8 en calostro (0.803 ± 0.477) fue significativamente ($p < 0.05$) inferior al de la sangre periférica autóloga (1.434 ± 0.40).

Palabras clave: *Linfocitos T. CD4+. CD8+. Calostro. Sangre autóloga.*

CD4+ and CD8+ T lymphocyte subsets in colostrum and peripheral blood from Mexican women

Human colostrum and milk contain cellular and humoral components that convey immunological specific and nonspecific protection to the newborn. In the present study, the number and proportion of leukocytes and T lymphocyte subsets in the colostrum collected within 36-48 hr postpartum have been investigated in a group of Mexican women ranging in age from 16 to 48 yr. In the colostrum of 63 women, the

number of leukocytes showed a great individual variability, with a mean of 829,382/μl, which increased with multiparity; the proportion of macrophages, polymorphonuclears and lymphocytes was 66.38%, 32.38% and 7.23%, respectively. In 28 cases, colostrum lymphocytes were isolated by means of discontinuous Percoll gradients and their reactivity with CD3, CD4 and CD8 monoclonal antibodies assessed by indirect immunofluorescence; these lymphocyte subsets were compared to those found in autologous peripheral blood. Although the proportion of total T lymphocytes (CD3+) in colostrum (69.9%) was similar to that of autologous blood (70.83%), the distribution of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subsets in colostrum showed differences with respect to that found in blood; in colostrum, the proportion of CD8+ T lymphocytes was higher (45.07% vs. 31.7% in blood) while that of CD4+ T lymphocytes was lower (33.07% in colostrum vs 43.2% in blood). The CD4/CD8 lymphocyte ratio in colostrum (0.803 ± 0.477) was significantly ($p < 0.05$) lower than that found in autologous peripheral blood (1.434 ± 0.40).

Key words: *T lymphocyte. CD4+. CD8+. Colostrum. Peripheral blood.*

INTRODUCCIÓN

El calostro es secretado al final del embarazo y durante los primeros 7 días posparto. Las cantidades oscilan entre 30 y 40 ml en los primeros 3 días, pero del quinto al sexto días¹, aumentan a 250 ml.

En el calostro se han identificado elementos humorales y celulares; entre los primeros se observaron principalmente anticuerpos IgA² y en menor concentración IgG, IgM, IgD e IgE. Estas Ig poseen actividad anticuerpo contra bacterias, hongos, parásitos y virus. Dentro de los elementos celulares los macrófagos representan el mayor porcentaje, alcanzando un 70%. En trabajos previos hemos demostrado que los macrófagos de calostro humano afectan la viabilidad de los trofozoitos de *E. histolytica*³.

En lo que respecta a la población linfocitaria, los corpúsculos de grasa y la variabilidad de una muestra a otra del contenido celular dificultan el aislamiento de los linfocitos para analizar su fenotipo de membrana como células viables en suspensión mediante anticuer-

Correspondencia y solicitud de separatas: Dr. A.G. Acosta. Departamento de Investigación. Escuela Médico-Naval. Centro Médico Naval. Boulevard Adolfo López Mateos. 230 Col. Tizapán. San Ángel. 01090 México DF.

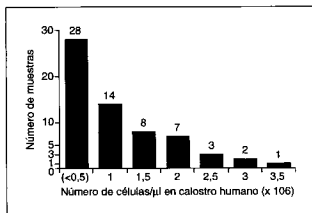


Fig. 1. Frecuencias de los promedios de células presentes en 63 muestras de calostro humano.

pos monoclonales. En el presente trabajo se describe el procedimiento para su aislamiento usando gradientes de Percoll, y su análisis con anticuerpos monoclonales CD3, CD4 y CD8 mediante inmunofluorescencia indirecta en una muestra amplia de mujeres mexicanas con productos a término con el fin de establecer una comparación con datos similares en mujeres de áreas socioeconómicas distintas^{4,5}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras de calostro

Las 63 muestras de calostro humano fueron obtenidas en un periodo de 36 a 48 h posparto en el Hospital de la Mujer, perteneciente a la Secretaría de Salud, localizado en Tizapán, San Angel. Se seleccionó un grupo de mujeres mexicanas entre los 16 y 48 años de edad.

El calostro fue sustraído por expresión manual y se depositó en tubos estériles con los siguientes antibióticos: 50 μg/ml de gentamicina y 100 U/ml de penicilina. Hasta su procesamiento, que fue en un período no superior a 3 h, las muestras

se conservaron a 4 °C. Por otra parte, también se analizaron 28 binomios de sangre periférica y calostro, que se obtuvieron por punción venosa de 5-10 ml y fueron puestos en tubos previamente heparinizados (10 U/ml).

Recuento y aislamiento de células linfoides de calostro

El calostro se procesó individualmente y se diluyó 1:2 con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (0,15 M, pH 7,2) y centrifugado a 1.500 rpm durante 15 min a 4 °C.

La capa lipídica se separó y el sedimento celular obtenido se lavó tres veces con PBS. Las células se cuantificaron en un hematocitómetro y en un frotis se tiñeron con hematoxilina para el recuento diferencial. La viabilidad se determinó por el método de exclusión de azul de tripan.

Los linfocitos del calostro humano se obtuvieron por gradientes discontinuos de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) al 70, 60, 50 y 40%⁵ diluidos a 1:2 con PBS y se centrifugaron a 2.500 rpm en un tiempo promedio de 20 min a 4 °C⁶. En las interfases correspondientes al 60 y 70% equivalentes a una densidad de 1,077 g/ml, se aislaron los leucocitos mononucleares, que se resuspendieron y se lavaron tres veces con PBS.

Obtención de células mononucleadas de sangre periférica

Las células mononucleadas de sangre periférica se obtuvieron por el procedimiento estándar de centrifugación de la sangre diluida al 1:2 en PBS, sobre gradiente de Ficoll de densidad de 1,077.

Identificación de las subpoblaciones linfocitarias por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos monoclonales CD3, CD4 y CD8

La identificación de las subpoblaciones de linfocitos T, tanto de las muestras de calostro como de la sangre perifé-

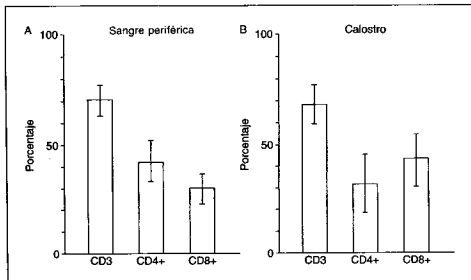


Fig. 2. Linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ en 28 binomios de sangre periférica y calostro. A: linfocitos de sangre periférica; B: linfocitos de calostro humano. La diferencia para linfocitos CD8 en sangre y calostro fue de $p < 0,0001$ utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney.

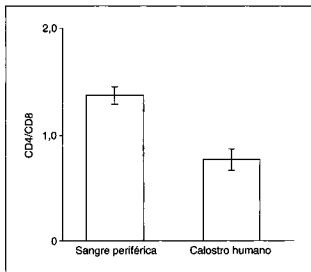


Fig. 3. Cociente linfocitario CD4/CD8 en sangre periférica y calostro de 28 mujeres.

rica autóloga, se realizó con anticuerpos monoclonales e inmunofluorescencia indirecta: 1 ml de suspensión de linfocitos (1×10^5 ml) fue centrifugado a 1.500 rpm, durante 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se distribuyó en tubos a los que se añadieron por separado 10 µl de anticuerpos monoclonales BMA 030 (Behring Diagnostic) diluidos 1:50 con PBS 0,15 m, pH 7,0 con el propósito de identificar linfocitos T totales; también por separado se agregaron 10 µl de BMA 040 para identificar linfocitos T CD4+ y 10 µl de BMA 081 para identificar linfocitos T CD8+. Las suspensiones se incubaron a 4 °C durante 30 min y se agitaron cada 10 min; posteriormente, se lavaron cinco veces con 1 ml de PBS, y se les añadieron 50 µl de anti-IgG de ratón/fab conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se incubó nuevamente a 4 °C durante 30 min, agitando cada 10 min. Finalmente, se lavó tres veces con PBS, y al botón celular se le añadieron 20 µl de formaldehído al 9% y se colocaron en un portaobjetos para sellarlos con un cubreobjetos y parafina e inmediatamente la muestra fue observada con el microscopio de epifluorescencia (CARL ZEISS) con un filtro azul.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento diferencial de leucocitos en 63 muestras de calostro humano

Se encontró un rango de células entre 126.786 a 3.200.000 células por µl de calostro teniendo como promedio 829.382 células por µl. En la figura 1 se observa en un número importante de las muestras un número reducido de células; con la multiparidad aumenta el número total de células en las muestras estudiadas. Los macrófagos representaron el 60,38%, seguidos por los polimorfonucleares con un 32,38% y los linfocitos con el 7,23%. La viabilidad de las células osciló entre el 80 y el 95% con un promedio total del 89,61%. El número variable de células y los corpúscu-

los de grasa dificultan la obtención de linfocitos de las muestras de calostro. Solamente la técnica de gradientes discontinuos de Percoll al 60 y 70% permitió su aislamiento.

Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre y calostro

En 28 casos, se estudiaron en paralelo las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ presentes en el calostro y en la sangre periférica autóloga. La proporción de linfocitos T totales (CD3+) en calostro (valor medio, 69,96%) fue similar a la hallada en sangre autóloga (valor medio, 70,82%), pero la distribución de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el calostro difería de la hallada en sangre. Como puede verse en la figura 2, la proporción de linfocitos T CD4+ era más alta en la sangre (43,2%) que en el calostro (33,07%), mientras que con la proporción de linfocitos T CD8+ ocurría al revés, es decir, su proporción era más baja en la sangre (31,7%) que en el calostro (45,07%) tal como puede verse en la figura 3, el cociente CD4/CD8 para sangre periférica autóloga fue de $1,43 \pm 0,40$ mientras que para el calostro fue de $0,80 \pm 0,40$; estas diferencias fueron estadísticamente significativas utilizando la prueba de la t de Student ($p = 0,05$). Empleando la prueba de la U de Mann-Whitney, la diferencia entre linfocitos T CD8+ en la sangre y el calostro fue de $p = 0,0001$. El presente hallazgo de un incremento de la proporción de linfocitos T CD8+ en el calostro respecto a la presente en sangre periférica y un cociente CD4/CD8 en el calostro reducido respecto al cociente CD4/CD8 en sangre periférica autóloga en una muestra de mujeres mexicanas, es consistente con los resultados obtenidos en mujeres de otros ambientes sociogeográficos, si bien en la presente serie dichas alteraciones son más marcadas (fig. 3). Sin embargo, otros autores que estudiaron el calostro de mujeres de ambientes sociogeográficos también distintos a los del presente estudio no hallaron incrementos en la proporción de linfocitos T CD8+ en el calostro; ello podría deberse a una mayor frecuencia de mujeres multiparas en la presente serie y/o a una mayor estimulación antigénica^{7,8}. También podría influir un distinto período de tiempo posparto en la obtención de la muestra del calostro. Hay que subrayar que en el presente estudio las muestras del calostro se obtuvieron dentro de las 36-48 h, mientras que en los otros estudios aludidos, el período de tiempo fue más largo. El posible significado de la proporción incrementada de linfocitos T CD8+ en el calostro queda por investigar. Parece plausible postular que tal incremento pueda traducir una reactividad contra antígenos ambientales presentes en la secreción mamaria, lo que podría actuar concediendo al lactante protección local en la mucosa gastrointestinal frente a dichos antígenos ambientales. El hallazgo de que entre los linfocitos T de la leche materna predominan los linfocitos T memoria ha sido también interpretado como un dato que favorece esta hipótesis⁹.

Bibliografía

1. Rocha RLM, Cruz RAL, García MMR. Inmunología del calostro y leche humana. En: Acosta G, Cruz M, editores. *Inmunología de las mucosas*. México: Demsa, 1992; 135-148.
2. Acosta G, Cote V, Isibasi A, Kumate J. Anticuerpos anti-Entamoeba histolytica de la clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. *Inmunología* 1985; 4: 24-27.
3. Acosta AG, Rocha LM, Reyes MR, Santos JI. Antiamoebic-properties of human colostrum. *Adv Exp Med Biol* 216 B. Nueva York: Plenum Press, 1987; 1.347-1.352.
4. Richie ER, Bass R, Meistrich ML, Dennison DK. Distribution of "T" Lymphocyte Subsets in human colostrum. *J Immunol* 1982; 129: 1.116-1.119.
5. Jain N, Mathur NB, Sharma VK, Dwarkadis AM. Cellular composition including lymphocyte subsets in preterm and fullterm human colostrum and milk: *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 395-399.
6. Ellis WM, Georgiou GM, Doberton DM, Johnson GR. The use discontinuous percoll gradients to separate populations of cell from human bone marrow and peripheral blood. *J Immunol Meth* 1984; 66: 9-16.
7. Bertotto A, Gerli R, Fabretti G, Crupi S, Arcangeli C, Scalise F et al. Human breast milk "T" lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory "T" cells. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1.877-1.880.
8. Castelucci G, Fabretti G, Scalise F, Vaccaro R. Lymphocytes bearing the "T" cell receptor gamma delta in human breast milk. *Arch Dis Child* 1990; 65: 1.274-1.275.