

Rev. Chil. Pediatr. 58(1): 39-43, 1987

## Subpoblaciones de linfocitos T determinadas mediante anticuerpos (AC) Monoclonales en población infantil: variable dependiente de la edad\*

Dra. Mónica Cornejo de L.<sup>1</sup>; Dr. Jaime Goya G.<sup>2</sup>;  
Dra. Ingrid Olsen C.<sup>2</sup>

### T-lymphocyte subpopulations: identification by monoclonal antibodies

The normal range for T lymphocyte subsets in peripheral venous blood, from a Chilean population was defined using monoclonal antibodies. Results in 25 healthy children indicated that the percentage of OKT4 cells was higher in infants (1-24 months), whereas the percentage of OKT8 cells was significantly lower as compared with older children (61-157 months). The ratio of OKT4 to OKT8 cells decreased with age and reached near adult levels around 5 years of life. These results suggest that interpretation of T cell subsets in children, should take age into consideration.

(Key words: T lymphocyte subsets, identification, monoclonal antibodies, in infants and children, OKT4, OKT8, markers, cell subpopulations).

El sistema inmune humano contiene subpoblaciones de linfocitos T (LT) reguladoras que son necesarias para la homeostasis<sup>1,2,3</sup>. La subpoblación de ayuda ("helper") es crítica para permitir la diferenciación de las células B y la producción de Ig, como también de activar otras células T tanto inductoras como citotóxicas<sup>4</sup>. El linfocito T ayudante es responsable además de la producción de linfoquinas. Esta influencia inductora es regulada por la presencia de una subpoblación supresora que actúa sobre los LT ayudantes o células plasmáticas activas<sup>5</sup>.

La separación de LT en subpoblaciones se ha llevado a cabo con métodos de rosetas<sup>6</sup> y recientemente mediante el uso de anticuerpos (AC) monoclonales<sup>7</sup>. El análisis de estas subpoblaciones en diversas enfermedades podría tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas<sup>8-15</sup>.

En este estudio se evaluó la distribución de subpoblaciones de LT en niños chilenos sanos, estableciendo rangos de normalidad para ellos, con el fin de aplicar esta nueva metodología a la investigación de diversas enfermedades pediátricas.

### MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 25 niños, 11 hombres y 14 mujeres, entre 1 mes y 13 años 6 meses (promedio 48 meses) provenientes del consultorio Cordillera de Valparaíso.

Los niños fueron seleccionados por un médico pediatra de acuerdo a un protocolo previamente establecido. Para los efectos del estudio, se consideró sanos en el momento del examen, a los niños cuyo peso y estatura fueran adecuados a la edad y no tuviesen antecedentes de enfermedades renales, hepáticas, hematológicas, neoplásicas o autoinmunes. Se excluyeron del estudio pacientes con antecedentes de alergias, asma y enfermedades virales (rubéola, varicela, mononucleosis infecciosa) incluido el resfrío común ocurridas en el mes precedente a la toma de las muestras. Ningún paciente se encontraba recibiendo medicamentos que afecten reconocidamente al sistema inmune.

Prevía autorización de un familiar directo de cada niño, se procedió a tomar una muestra de 6 a 7 ml de sangre fresca, que fue desfibrinada y enviada directamente al laboratorio de inmunología. Simultáneamente se efectuó un hemograma completo. El aislamiento de células mononucleares se efectuó por centrifugación en

1. Laboratorio de Inmunología, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

2. Hospital Enrique Deformes. Valparaíso.

\* Proyecto U.V. 43/83. Financiado por la Dirección de Investigación Científica y Tecnológica. Universidad de Valparaíso.

un gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, SIGMA). Las células aisladas se lavaron dos veces en solución salina balanceada y se suspendieron a una concentración final de  $5 \times 10^6$  células x 1 ml en tampón fosfato salino 0,01 M pH 7,3, suplementado con 1% de suero humano AB inactivado por calor y 0,1% AZIDA de Na. Se determinó la vitalidad de las células con azul tripano. Se emplearon tres anticuerpos (AC) monoclonales (OKT3, OKT4, OKT8: Ortho Pharmaceutical Corp. Raritan, NJ) en este estudio: OKT3, identifica linfocitos T humanos que expresan un antígeno (Ag) de superficie de 19.000 dalton; OKT4 identifica una subpoblación de LT que expresan un Ag de superficie de 60.000 dalton e incluye células con función ayudante/inductor; OKT8 define una subpoblación que expresa un Ag de superficie de 31.000 dalton e incluye células con función supresora/citotóxica.

La preparación, caracterización y especialidad de los anticuerpos usados ha sido descrita por otros<sup>3,4,5</sup>. En breve síntesis: se incubaron  $1 \times 10^6$  células en 200 µl de medio de suspensión durante 30 min a 4°C con 10 µl del respectivo Ac monoclonal. Se utilizó suero de rata N como control. Luego de 2 lavados se agregó 100 µl de una dilución adecuada de Ig "anti ratón" marcada con fluoresceína (Ortho Ph. Corp.). Después de 30 min a 4°C, se lavó nuevamente las células por 2 veces y se montaron en un portaobjetos. Inmediatamente después se evaluaron 200 células mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus - Modelo BH-RFL). Los recuentos absolutos de células que reaccionaron con cada Ac monoclonal, se calcularon como el producto del recuento total de linfocitos y la proporción (%) de células positivas identificadas por microscopía de fluorescencia.

Los valores promedios ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar (DE) y la prueba t de Student, fueron calculados

mediante un computador TRS-80, Modelo I de Radio Shack y aplicados a los resultados.

## RESULTADOS

La relación peso talla según sexo en los niños estudiados fue normal de acuerdo con patrones establecidos por el Ministerio de Salud para la población infantil chilena<sup>16</sup>.

Los valores hemáticos promedio según la edad, incluida la linfocitosis relativa, estaban dentro de límites normales<sup>17</sup> (Tabla 1).

La proporción de LT totales (OKT3) en la sangre periférica fue de  $66,8 \pm 11,8\%$ ; En  $48,4 \pm 10,7\%$  de las células se expresó el fenotipo OKT4, que incluye células ayudantes/inductoras y  $18,8 \pm 6,81\%$  reaccionaron con Ac monoclonal OKT8 que incluye a la subpoblación citotóxica/supresora. La relación OKT4/OKT8 en el total de niños estudiados fue de  $2,9 \pm 1,29$ . No hubo diferencias entre niños de sexo femenino ( $n = 14$ ) y masculino ( $n = 11$ ) (Tabla 2).

Analizando los marcadores según la edad de los sujetos, no se encontraron diferencias en la proporción de linfocitos T totales (Tabla 3). Sin embargo, se detectó cierta tendencia a disminuir las células OKT4 y aumentar las OKT8, al aumentar la edad. Esta diferencia, es significativa al comparar el grupo de niños menores de 2

Tabla 1.  
Valores hemáticos medios  $\pm 1$  de en población estudiada según edad

Edad	n	Hb g%	Htc	Gb xmm <sup>3</sup>	Linf %	Linf x mm <sup>3</sup>
1 - 24 m	10	11,3 $\pm 1,1$	35,3 $\pm 3,4$	11.855 $\pm 2.862$	66,3 $\pm 14,2$	7.626 $\pm 3.028$
25 - 60 m	7	12,6 $\pm 0,9$	38,3 $\pm 2,2$	9.700 $\pm 4.003$	49,4 $\pm 1,0$	4.492 $\pm 1.194$
61 - 157 m	8	12,9 $\pm 0,5$	38,2 $\pm 0,9$	7.875 $\pm 1.788$	48,6 $\pm 1,5$	3.784 $\pm 1.468$

n = número de pacientes Hb = hemoglobina Htc = hematocrito Gb = Glóbulos blancos  
Linf = linfocitos

Tabla 2.  
Subpoblaciones de LT. en población infantil chilena según sexo

Sexo	n	OKT3	OKT4	OKT8	OKT4/OKT8
M	11	66,7 $\pm$ 10,35	48,5 $\pm$ 11,7	19,0 $\pm$ 7,8	2,9 $\pm$ 1,3
F	14	66,9 $\pm$ 13,1	48,2 $\pm$ 10,2	18,6 $\pm$ 6,3	2,9 $\pm$ 1,3
Total	25	66,8 $\pm$ 11,8	48,4 $\pm$ 10,7	18,8 $\pm$ 6,8	2,9 $\pm$ 1,3

Valor promedio  $\pm 1$  DE

años, con el grupo que incluye mayores de 5 años, para OKT4:  $51,3 \pm 10,8\%$  y  $43 \pm 5,6\%$  respectivamente ( $p < 0,05$ ) y OKT8:  $15,8 \pm 5,2\%$  y  $23,6 \pm 8,6\%$  ( $p < 0,05$ ). La variación individual, en cada grupo es importante (Figura 1).

La relación OKT4/OKT8 disminuye progresivamente hasta valores similares a los obtenidos en adultos, en los niños mayores de 5 años. La diferencia entre niños menores de 2 años y mayores de 5 años es altamente significativa (Tabla 3).

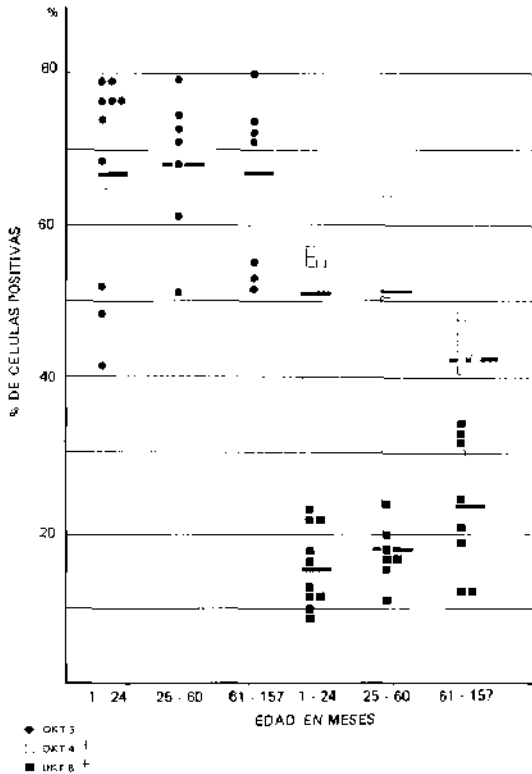


Fig. 1. Linfocitos OKT+ (%) en población infantil chilena según edad.

## DISCUSION

Es conocido que en edades extremas de la vida hay cambios en relación a la inmunocompetencia. Así en RN normales, a pesar de existir un adecuado desarrollo del sistema linfático, existe una mayor susceptibilidad a diversas infecciones. Una situación similar se presenta en la población de edad avanzada, sin embargo los mecanismos responsables de ello no están totalmente dilucidados.

En población adulta se ha demostrado que la cifra de LT es una variable dependiente de la edad<sup>18,19</sup>. Nagel<sup>20</sup> utilizando anticuerpos monoclonales, demostró que en población anciana ( $\bar{x}$ : 72a.) existía una disminución del número absoluto y relativo de células OKT8.

El análisis de las poblaciones de LT en la infancia ha sido, en general, realizado en RN utilizando sangre de cordón. En algunos el resultado ha sido contradictorio según el método que se utilice<sup>18</sup>. En el presente estudio hemos analizado la evolución de los LT totales, subpoblaciones ayudantes inductoras y supresoras/citotóxicas en sangre venosa periférica, en una población chilena entre 1 mes y 13 años 6 meses, mediante el uso de AC. monoclonales (OKT3, OKT4, OKT8). Hemos demostrado que el porcentaje de linfocitos OKT4 y OKT8 varía con la edad, lo que no sucede con la cifra total de LT determinada por el AC. monoclonal OKT3.

En niños sanos entre 1 y 24 meses la relación OKT4/OKT8 es significativamente superior a la correspondiente a niños mayores de 5 años. Este aumento de la relación OKT4/OKT8 resulta de una elevación en el % de células OKT4 y un descenso concomitante de los linfocitos OKT8.

Estos resultados para la población de menor edad concuerdan con otros estudios efectuados en sangre de cordón<sup>21,22</sup> y sangre venosa periférica de RN normal<sup>23</sup> y RN de alto riesgo<sup>24</sup>. Solamente un autor<sup>25</sup> presenta resultados discre-

Tabla 3.  
Subpoblaciones de linfocitos T en población infantil chilena según edad

Edad	n	OKT3		OKT4		OKT8		OKT4/OKT8
		%	cel x mm <sup>3</sup>	%	cel x mm <sup>3</sup>	%	cel x mm <sup>3</sup>	
1 - 24 m	10	67,0 ± 14,3	4524,6 ± 612,2	51,3* ± 10,8	3354,2 ± 740,6	15,8* ± 5,2	1075,2 ± 362,2	3,5* ± 1,3
25 - 60 m	7	68,1 ± 9,3	3084,2 ± 1079,0	50,4 ± 13,7	2288,0 ± 967,8	17,7 ± 3,6	799,4 ± 283,6	2,9 ± 1,2
61 - 157 m	8	65,2 ± 11,5	2507,7 ± 1317,6	43,0* ± 5,6	1659,2 ± 729,2	23,6* ± 8,6	968,1 ± 634,3	2,0 ± 0,7

\* Diferencias significativas entre grupo 1 - 24 y 61-157 m ( $p < 0,05$ )  
Cel x mm<sup>3</sup> = número de células por mm<sup>3</sup>

pantes (células OKT8 elevadas y OKT4 normales en sangre de cordón).

No hemos encontrado estudios precisos en relación a la evolución de estas variables a distintas edades (1 a 13 años).

En nuestra población la relación OKT4/OKT8 alcanzaría valores cercanos a la población adulta alrededor de los 5 años. En población japonesa Yachie<sup>21</sup> estima que este valor se alcanzaría a partir de los 3 años. Pahwa<sup>24</sup> en RN de alto riesgo (edad gestacional 27-43 semanas) encuentra una tendencia a alcanzar valores similares a adultos, a los 7 meses de edad, sin embargo la población estudiada por estos autores había sufrido diversos cuadros infecciosos previos y además había recibido múltiples transfusiones. Está ampliamente demostrado el aumento transitorio de los LT supresores en relación con virus de Epstein Barr<sup>12</sup>, citomegalovirus<sup>26</sup> y otros como virus Hepatitis B, lo que podría explicar estos resultados. El efecto de la transfusión sanguínea es analizado por los mismos autores<sup>24</sup>.

Nuestros valores fueron obtenidos en una población rigurosamente seleccionada, en que se excluyó además de cualquier patología mayor, el uso de drogas, desnutrición y especialmente enfermedades virales recientes (incluido resfriado común). Ningún niño estudiado había recibido transfusiones. No podemos excluir un factor ambiental o racial que explique estas diferencias.

La interpretación de las subpoblaciones de LT en la infancia debe efectuarse tomando en consideración las fluctuaciones individuales y las variaciones normales de acuerdo a la edad. Los valores obtenidos en este estudio podrían servir de referencia para la población infantil chilena.

## RESUMEN

Se determinó, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, el rango normal de subpoblaciones de linfocitos T, en sangre venosa periférica de una población infantil chilena (1 mes a 13 años). Los resultados obtenidos en el estudio de 25 niños sanos demuestran que el porcentaje de células OKT4 fue más elevado en niños entre 1 y 24 meses de edad, y el OKT8 significativamente inferior al comparar con niños de mayor edad (61 a 157 meses). La relación de células OKT4/OKT8 disminuye al aumentar la edad alcanzando valores cercanos al adulto alrededor de los 5 años de vida. Estos resultados sugieren que la interpretación de las subpoblaciones de LT en niños debe tomar en consideración la edad.

## AGRADECIMIENTOS

Al señor Danny Casanova por su valiosa contribución en el análisis estadístico de los resultados.

## REFERENCIAS

1. Reinherz, E.L., Schlossman, S.F.: The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell*, 19: 821, 1980.
2. Reinherz, E.L., Schlossman, S.F.: Regulation of the immune response—inducer and suppressor T lymphocyte subsets in human beings. *N. Engl. J. Med.* 303: 370, 1980.
3. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 76: 4061, 1979.
4. Kung, P.C., Goldstein, G., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F.: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, 206: 347, 1979.
5. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2. *J. Immunol.* 124: 1301, 1980.
6. Pichler, W.: Bedeutung von Fc IgG und Fc IgM receptoren auf menschlichen T lymphozyten. *Klin. Wochenschr.* 59: 99, 1981.
7. Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495, 1975.
8. Phylky, R., Li Ch., Yam, L.: T-Cell chronic lymphocytic leukemia with morphologic and immunologic characteristics of cytotoxic/suppressor phenotype. *Mayo Clin. Proc.* 58: 709, 1983.
9. Cosimi, A., Colvin, R., Burton, R., Rubin, R., Goldstein, G., Kung, P., Hansen, W., Delmonico, F., Russell, P.: Use of monoclonal antibodies to T Cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N. Engl. J. Med.* 305: 3808, 1981.
10. Shoenfeld, Y., Schwartz, R.: Immunologic and genetic factors in autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 311: 1019, 1984.
11. Reinherz, E., Cooper, M., Schlossman, S., Rosen, F.: Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency disorders. *J. Clin. Invest.* 68: 699, 1981.
12. Reinherz, E., O'Brien, C., Rosenthal, P., Schlossman, S.: The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 125: 1270, 1980.
13. Reinherz, E.L., Goh, R., Wohl, M.E., Morimoto, C., Rosen, F., Schlossman, S.: Immunodeficiency associated with loss of T4<sup>+</sup> inducer T-cell function. *N. Engl. J. Med.* 304: 811, 1981.
14. Tsuchiya, S., Minegishi, M., Imaizumi, M., Nakae, S., Tamura, S., Konno, T., Tada, K.: Selective defect of OKT4<sup>+</sup> T lymphocytes in severe immunodeficiency. *J. Pediatr.* 103: 588, 1983.
15. Krensky, A., Clayberger, C.: Diagnostic and therapeutic implications of T cell surface antigens. *Transplantation*, 39: 339, 1985.
16. *Clasificación estado nutricional según edad, peso y sexo* Ministerio de Salud, Sub. Depto. Fomento de la Salud, 25 3 75.
17. *Normas de atención Pediátrica*. Hospital Roberto del Río 2ª Edición, 1984.
18. Díaz Joanen, E., Strickland, R., Williams, R.: Studies of lymphocytes in the newborn and the Aged. *Am. J. Med.* 58: 620, 1975.
19. Alexopoulos, C., Babbitt, P.: Age dependence of T lymphocytes. *Lancet*, 21: 426, 1976.

20. Nagel, J., Chrest, F., Adler, W.: Enumeration of T lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans. *J. Immunol.* 127: 2086, 1981.
21. Yachie, A., Miyawaki, T., Nagaoki, T., Yokoi, T., Mukai, M., Uwadana, N., Taniguchi, N.: Regulation of B cell Differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. *J. Immunol.* 127: 1314, 1981.
22. Jacoby David, R., Oldstone, M.B.: Delineation of suppressor and helper activity within the OKT4- defined T lymphocyte subset in human newborns. *J. Immunol.* 131: 1765, 1983.
23. Thomas, R., Lynch, D.: Identification of lymphocyte subsets in the newborn using a variety of monoclonal antibodies. *Arch. Dis Child.* 58: 34, 1983.
24. Pahwa, S., Sia, C., Harper, R., Pahwa, R.: T lymphocyte subpopulations in high risk Infants: Influence of age and blood transfusions. *Pediatrics.* 76: 914, 1985.
25. Maccario, R., Nespoli, L., Mingrat, G., Vitiello, A., Ugazio, A., Burgio, R.: Lymphocytes subpopulations in the neonate: Identification of an immature subset of OKT8-Positive, OKT3-Negative cells. *J. Immunol.* 130: 1129, 1983.
26. Carney, W.P., Rubin, R.H., Hoffman, R.A., Hensen, W.P., Healey, K., Hirsch, M.S.: Analysis of T-lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Immunol.* 126: 1224, 1981.