

# LA BETAGLUCURONIDASA EN EL RECONOCIMIENTO DE LINFOCITOS T Y B

---

## RESUMEN

Dra. Imelda Campo-Aasen (\*)

*Se obtienen linfocitos T y B por gradientes de densidad en Ficoll-Hypaque. Se trató de demostrar a nivel óptico y ultrafino la presencia de la enzima betaglucuronidasa en el linfocito T. Nuestros resultados demuestran que tanto el linfocito T como el B, tienen abundante betaglucuronidasa y que ésta se manifiesta primero en el retículo-endoplasma y luego se concentra en el sistema de Golgi, y se extiende por todo el citoplasma celular.*

*Se establece que la enzima betaglucuronidasa puede ser evidenciada en el reconocimiento de linfocitos T y B y así diferenciarlos de los monocitos, los cuales se manifiestan ricos en esterases lo que se pone en evidencia por el sustrato alpha-naph thyl-acetato.*

*Se ha demostrado que las enzimas pueden ser utilizadas en el reconocimiento y diferenciación de células mononucleares de la sangre periférica humana*

---

## INTRODUCCION

Los linfocitos que se estudian a continuación provienen de voluntarios donantes de sangre del Banco de Sangre de Caracas, aislados por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las suspensiones celulares fueron estudiadas a nivel óptico y ultrafino, utilizando el método de Hayashi, Shirahama y Cohen.

Hay evidencia amplia que la capacidad de emitir respuestas inmunes reside principalmente en dos poblaciones diferentes de células:

- 1o. Linfocitos, que exhiben una gran heterogenicidad.
- 2o. Células que pertenecen o están relacionadas al sistema fagocítico mononuclear.

---

(\*) Instituto Nacional de Dermatología.

A los defectos del sistema inmune se les atribuye cada vez más importancia en la patogenia de gran variedad de enfermedades, algunas de ellas dermatológicas. Por lo tanto el reconocimiento cualitativo y cuantitativo de estas células se hace cada vez más importante.

En este estudio se trata de identificar a estas subpoblaciones de células por la vía enzimática y a nivel óptico y ultrafino.

## **MATERIALES Y METODOS**

Los linfocitos fueron obtenidos de voluntarios del Banco de Sangre de Caracas y aislados por gradientes de densidad en FicollHypaque (1).

Se hizo primero la microscopía óptica siguiendo la metodología de Hayashi, Shirahama y Cohen (2) por una hora de incubación, previa fijación en formol-calcio al 1 % , sobre frotis de los linfocitos aislados, tanto T como B. Se contrastó con verde metilo y se montó en jalea de glicerina. Luego se siguió el procedimiento siguiente para estudio ultrafino: se hizo fijación del pellet de linfocitos durante 16 horas, a 40°C, en 4% formaldehido más 7,5% sucrosa, en tampón cacodilato pH 7,4; se lavó en tampón cacodilato por tres veces consecutivas a pH 7,4 más sucrosa 7,5% por dos horas. Se usó el mismo medio de incubación de Hayashi et al., por 5 horas, se lavó en agua destilada y se post-fijó en osmio al 1 % ; luego se procesó el pellet siguiendo la metodología normal. Se procesaron cortes sin tinción con uranilo y plomo y las observaciones se hicieron en microscopio Hitachi, H-500.

Los controles se hicieron utilizando el medio de incubación sin el sustrato tanto para microscopía óptica como electrónica.

## **RESULTADOS**

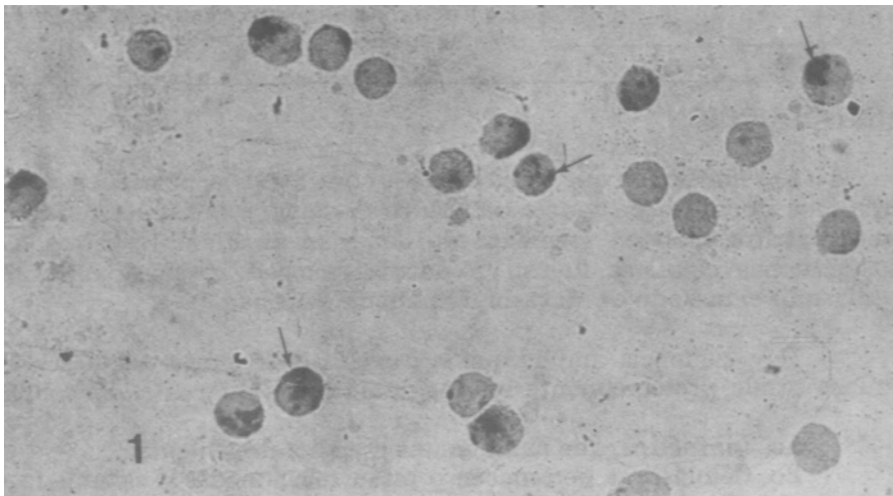


Fig- 1. Linfocitos I. Se observa precipitado rojo ladrillo en todo el citoplasma celular en forma granular gruesa. El núcleo se observa contrastado por el verde metilo. 425 X.\*

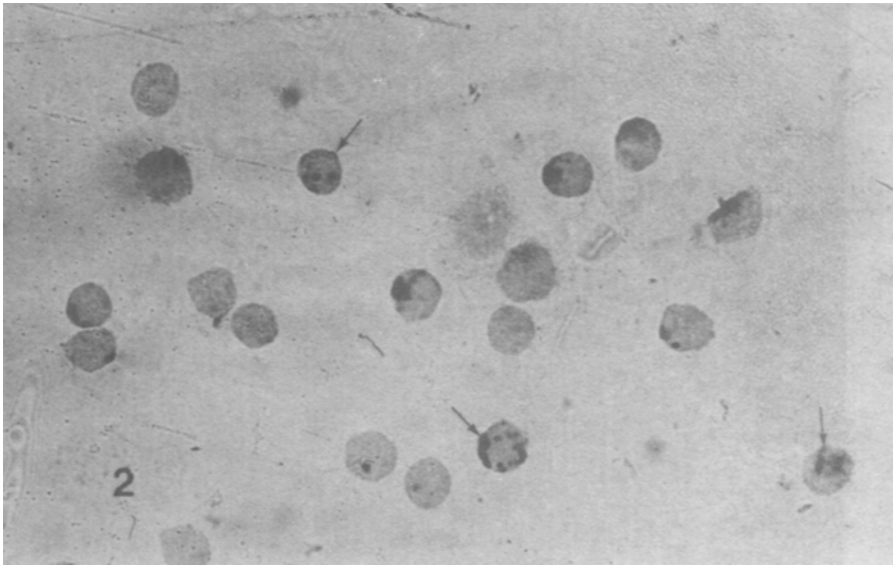


Fig.- 2. Linfocitos B. Se observa precipitado rojo en el citoplasma celular y contraste nuclear, verde, por el verde metilo. 425 X.\*

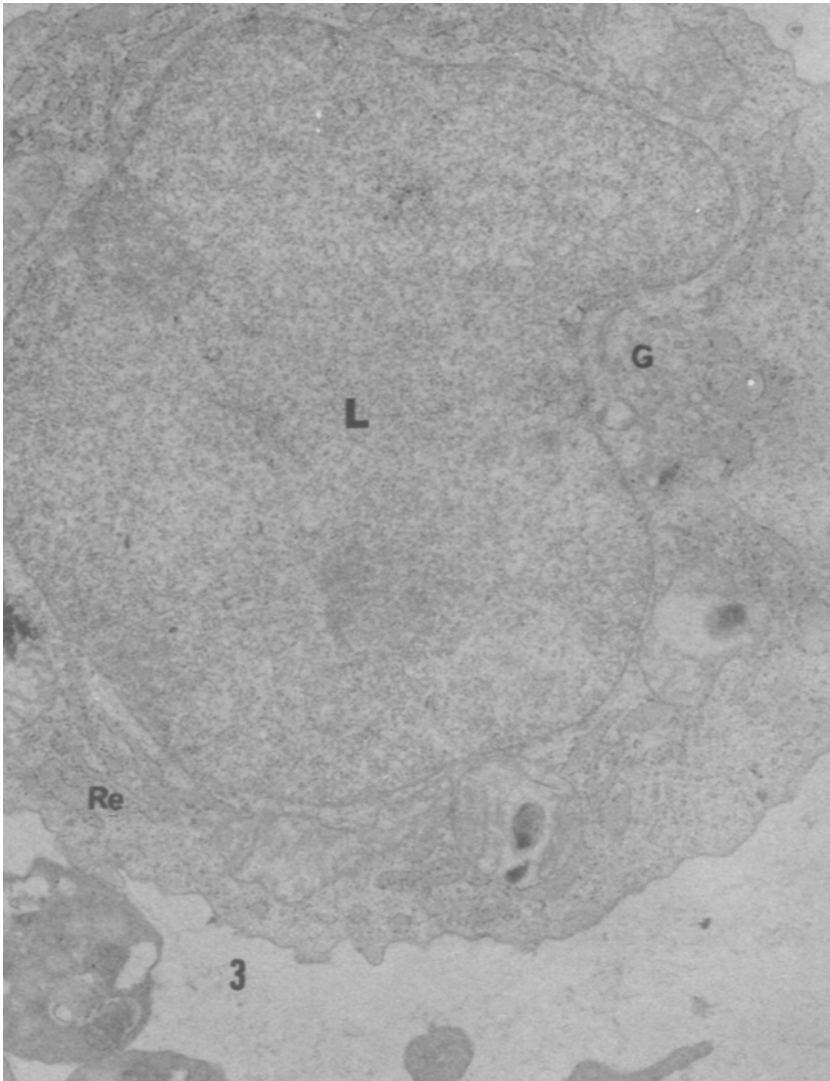


Fig. 3. Se observa linfocito T (L) con depósito granular fino en todo el citoplasma del linfocito, más evidente a nivel del retículo-endoplasma (Re) y a nivel del sistema de Golgi (G), 8.000 X.

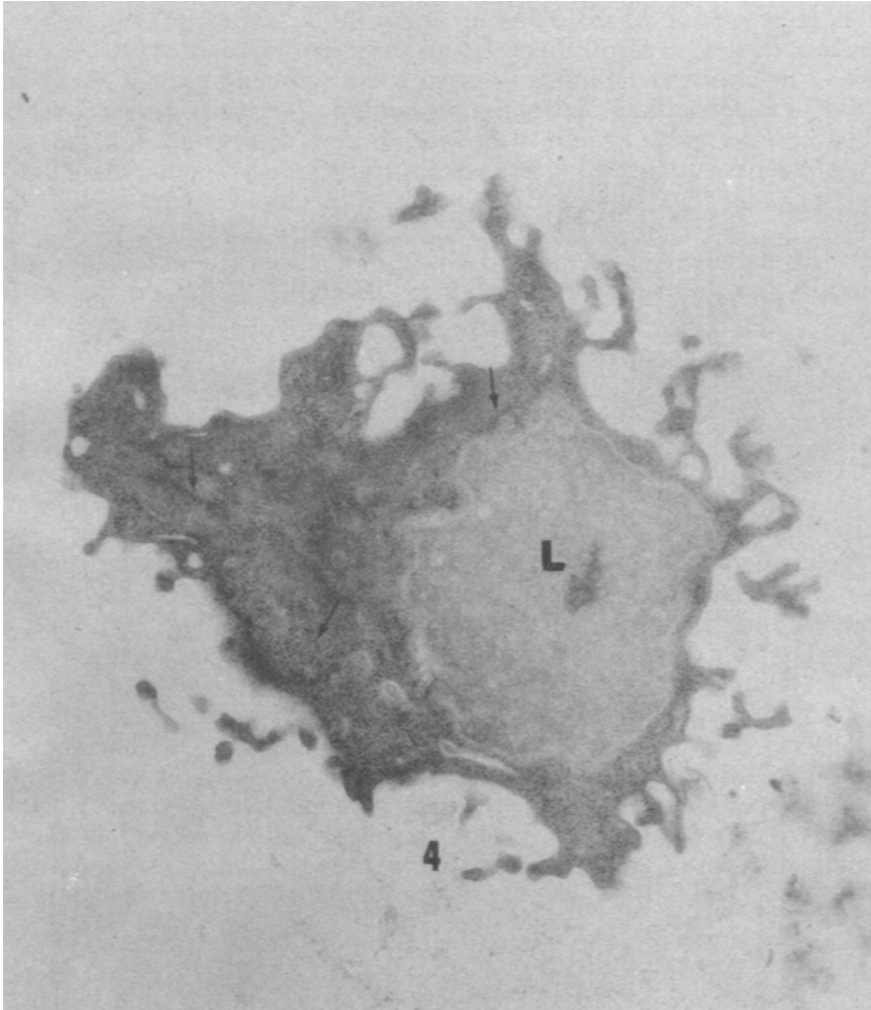


Fig. 4. Linfocito T (L). Se observa todo el citoplasma del linfocito cubierto con depósito granular fino más evidente a nivel del retículo-endoplasma (flechas). 5.000 X.

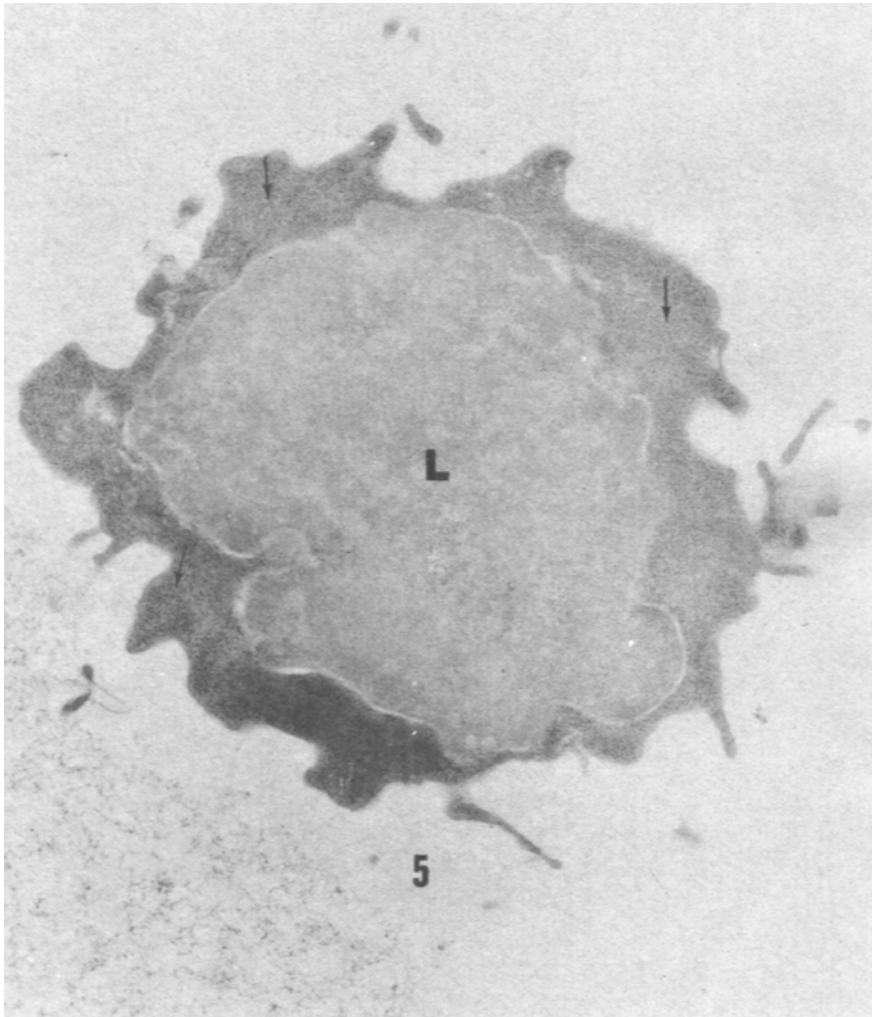


Fig. 5. Linfocitos B (L), Se observa depósito granular tipo diseminado por todo el citoplasma del linfocito, (Flechas). 5.000 X.

## DISCUSION

Se ha establecido que los linfocitos pueden dividirse en dos grupos ontogénica y funcionalmente diferentes; el primer grupo se diferencia bajo la influencia del timo y comprende los linfocitos T o timo derivados. El 2o. grupo se compone de linfocitos B, derivados de la médula ósea, y son los precursores de las células que producen anticuerpos, pasando directamente a los órganos linfoides periféricos. Los linfocitos B llevan inmunoglobulinas de superficie fácilmente detectables. El tercer tipo de células importantes en la génesis de la inmunidad humoral y celular pertenece a la serie fagocítica, e incluye a los monocitos.

Estos tres tipos de células mononucleares se pueden distinguir una de la otra por la diferencia en receptores de membranas, por antígenos diferentes y por diferencias enzimáticas.

Los linfocitos T y B se aislaron de sangre periférica por rosetas con eritrocitos de carnero seguido por centrifugación en Ficoll-Hypaque. Los linfocitos T se demostraron por la formación de rosetas, los B por receptores de membranas y los monocitos por la enzima  $\alpha$ -naphthylacetato esterasa.

En este trabajo se buscó demostrar que la enzima betaglucuronidasa está en el linfocito T pero nuestras observaciones demuestran que los depósitos enzimáticos pueden observarse tanto en linfocitos T como en B. Que la actividad enzimática se observa primero a nivel del retículo-endoplasma (Re) y que luego se concentra en el sistema de Golgi (G) (Fig. 3) y en toda la superficie del linfocito observándose cómo la enzima es producida a nivel del retículo-endoplasma a nivel subcelular, se concentra en el sistema de Golgi y se extiende luego por el citoplasma celular (Figs. 4 y 5). Así contamos con otra posibilidad de reconocimiento celular en células de importancia inmunológica y diferenciarlas del monocito el cual se reconoce por su riqueza en esterasa demostrable por el sustrato  $\alpha$ -naphthyl-acetato esterasa (1).

## SUMMARY

We obtained T and B lymphocytes by density gradients of Ficoll-Hypaque. We tried to demonstrate the enzyme betaglucuronidase in lymphocytes T, but our observations have shown; that this enzyme is very rich in B lymphocytes also. This differentiates the lymphocytes T and B from the monocytes which are demonstrated by the esterase  $\alpha$ -naphthyl-acetate esterase. Then enzymatically the mononuclear cells of human blood can be recognized by the enzyme betaglucuronidase.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Richard E. Edelson.: Identification of subpopulation of mononuclear cells in cutaneous infiltrates. Differentiation between B cells T cells and Histiocytes. J. Invest. Derm. 61: 82-88, 1973.
- 2.- Hayashi, M., Shirahama, T. y Cohen, A.S.: Combined cytochemical and electron microscopic demonstration of B-glucuronidase activity in rat liver with the use of simultaneous coupling azo-dye technique, J. Cell, Biol. 26: 289-297, 1968.

## **AGRADECIMIENTO**

*Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto SI-1162 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).*