UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

# FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN DISTINTOS GRUPOS DE AMIGDALAS PALATINAS

JOSE ANTONIO SANCHEZ ROZAS

GRANADA, Febrero 1.986

# FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN DISTINTOS GRUPOS DE AMIGDALAS PALATINAS.

Tesis presentada por D. JOSE ANTONIO SANCHEZ ROZAS para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Granada.

D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ, CATEDRATICO DE HISTOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL, CATEDRATICO DE FISIOLOGIA GENERAL Y ESPECIAL Y JEFE DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICAN: Que la Tésis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada, D. JOSE ANTONIO SANCHEZ ROZAS sobre el tema: FRACCIONAMIENTO Y ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN DISTINTOS GRUPOS DE AMIGDALAS PALATINAS, ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los cursos académicos 1983-84 y 1984-85, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del grado de Doctor siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Prof. A. Campos Muñoz

Fdo. Prof. F. Garrido Torres-Puchol

Granada, 27 de Febrero de 1986

Quiero agradecer a D. Federico Garrido Torres-Puchol, a D. Miguel Ciges Juan y a D. Antonio Campos Muñoz la confianza que han depositado en mí.

A D. Francisco Ruiz-Cabello Osuna su paciencia e inapreciable ayuda que ha sido decisiva para la realización de esta tésis doctoral a lo largo de todas las fases de elaboración.

A D. Miguel Angel Löpez Nevót y a Dª. Maria Antonia De Andrés por enseñarme las técnicas que han permitido la realización de este trabajo.

A Dª. Antonia Collado del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina sin cuya colaboración no se hubieran podido prácticar los estudios histológicos.

A D. José Manuel Baeyens del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina por las sugerencias y correcciones en el tratamiento estadístico de los resultados.

A todos los miembros del Laboratorio de Análisis Clínicos de la C. S. Virgen de las Nieves por haber soportado amablemente las contínuas molestias que les he provocado.

Por último, quiero agradecer a D. Francisco Esteban Lasala el gran estímulo y apoyo moral que me ha infundido desde el principio de la tésis; y a D. José Manuel Amador García su estímulo, así como la ayuda prestada en la elaboración de determinadas figuras gráficas.

A mi esposa e hijos.

A mis padres.

## OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de esta tesis, se centró en el estudio de subpoblaciones linfocitarias en amigdala. Para ello, se ha utilizado un amplio panel de anticuerpos monoclonales de especificidades conocidas, que definen distintas poblaciones celulares ( T, B, monocitos etc.). Por otra parte se han utilizado diversos marcadores que nos han permitido investigar la posible existencia de linfocitos inmaduros en amigdala, y al mismo tiempo comparar si la existencia de tales marcadores podían tener relación con los distintos cuadros clínicos de amigdalitis o con grupos de pacientes de diferentes edades.

Con este objetivo, por diversas técnicas se han aislado subpoblaciones linfoides de amigdala de cuatro grupos de enfermos, con la finalidad de estudiar sus características fenotípicas mediante los marcadores inmunológicos citados, y las posibles diferencias en su expresión entre los distintos grupos. Estos grupos han sido:

1.- Amigdalitis recurrente con hipertrófia amigdalar.

2.- Amigdalitis recurrente sin hipertrófia amigdalar.

3.- Amigdalitis focal.

4.- Hiperplásia amigdalar simple.

# INDICE

# INTRODUCCION


1.- PREAMBULO

2.- RECUERDO HISTOLOGICO DEL TEJIDO LINFOIDE

2.1.- Tejido linfoide difuso

2.2.- Tejido linfoide nodular

3.- DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL DE LA AMIGDALA PALATINA

4.- MARCADORES CELULARES; ANTICUERPOS MONOCLONALES

4.1.- Generalidades

4.1.1.- Limitaciones de los marcadores de superficie

4.1.2.- Ventajas e inconvenientes de los anticuerpos monoclonales.

4.2.- Marcadores de linfocitos B

4.2.1.- Inmunoglobulinas

4.2.2.- Antígenos HLA-DR

4.2.3.- Receptores Fc

4.2.4.- Receptores del complemento

4.2.5.- Receptores para eritrocitos de ratón

4.2.6.- Otros marcadores

4.2.7.- Marcadores de diferenciación celular B

4.3.- Marcadores de linfocitos T

4.3.1.- Rosetas E

4.3.2.- Marcadores de linfocitos T (maduros)

4.3.3.- Marcadores expresados por células T activadas

4.3.4.- Marcadores de diferenciación celular T

4.4.- Marcadores de superficie de células nulas (no T no B).

4.5. Marcadores enzimaticos.

5.- Componentes celulares; ARQUITECTURA DE LA AMIGDALA

5.1.- Estudios citológicos cuantitativos y comparativos.

5.2.- Bases estructurales

6.- FISIOLOGIA DE LA AMIGDALA

6.1.- Capacidad funcional a nivel celular y su significación biológica.

6.2.- Capacidad funcional a nivel molecular y su significación biológica.

6.3.- Hipótesis funcional de la amigdala

6.4.- Involución de la amigdala.

7.- MECANISMOS PATOGENICOS

# MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL

1.1.- Amigdalas palatinas.

1.2.- Muestras de sangre periférica.

1.3.- Marcadores inmunológicos utilizados.

2.- METODOS

2.1.- Separación celular de las piezas.

2.2.- Separación de células mononucleares de la suspensión celular.

2.3.- Separación de celulas mononucleares de sangre periférica.

2.4.- Separación de linfocitos T y B.

2.5.- Fraccionamiento por citotoxicidad mediada por complemento.

2.6.- Separación celular por centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll.

2.7.- Técnica de congelación en nitrógeno líquido.

3.- TECNICAS DE CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

3.1.- Formación de rosetas con hematíes de carnero.

3.2.- Formación de rosetas con hematíes de ratón.

3.3.- TdT inmunoperóxidasa.

3.4.- Técnica de inmunofluorescencia directa.

3.5.- Técnica de inmunofluorescencia indirecta.

4.- TECNICA HISTOLOGICA

4.1.- Cortes en parafina para tinción de Hematoxilina-Eosina.

4.2.- Cortes en criostáto para inmunofluorescencia indirecta.

## RESULTADOS

1.- Expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdala y sangre periférica de niños.

2.- Expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdala en niños y adultos.

3.- Expresión de marcadores en los linfocitos de diferentes grupos clínicos de amigdalas de niños.

4.- Expresión de marcadores en linfocitos de amigdala separados por adherencia a fibra de nylon.

5.- Fraccionamiento de linfocitos amigdalares por citotoxicidad mediada por complemento.

5.1.- Lisis con el Ac Mo T3 mas complemento (expresión de marcadores en la poblacion superviviente).

5.2.- Lísis con el Ac Mo OKIa mas complemento (expresión de marcadores en la población superviviente).

6.- Ensayos de fraccionamiento y caracterización de linfocitos totales de amigdala por el método de Percoll.

6.1.- Cuantificación celular en los halos obtenidos.

6.2.- Caracterización fenotípica de las fracciones celulares separadas.

7.- Resultados de los estudios histológicos.

## D I S C U S I O N

I.- Sobre la expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdala.

II.- Sobre los estudios comparativos en la expresión de marcadores en los distintos grupos clínicos de amigdalas.

III.- Sobre los fraccionamientos con fibra de nylon y con anticuerpos monoclonales mas complemento.

IV.- Sobre el fraccionamiento con Percoll, estudio fenotípico y distribución de las fracciones celulares aisladas en los distintos grupos clínicos.

## C O N C L U S I O N E S

## B I B L I O G R A F I A

# INTRODUCCION

## 1.- PREAMBULO

El presente trabajo es el estudio de la amigdala palatina humana desde el punto do vista inmunológico. Para ello, investiga la existencia de distintas subpoblaciones celulares linfoides, debido a la expresión en éstas de distintos antígenos que se identifican sobre todo, por medio de anticuerpos monoclonales; y se comparan las diferencias inmunológicas habidas entre distintos grupos de amigdalas.

La introducción consta de tres partes:

La primera trata de la ontogénia de la amigdala, exponiendo previamente un recuerdo histológico del tejido linfoide.

En la segunda se tratará sobre el concepto y el significado de los anticuerpos monoclonales y otros marcadores, así como los distintos antígenos que estos reconocen.

La tercera recopila las bases estructurales y estudios inmunológicos habidos en amigdala que permiten esbozar la fisiología de ésta y en consecuencia los mecanismos patogénicos de la amigdalitis.

## 2.- RECUERDO HISTOLOGICO DEL TEJIDO LINFOIDE

Bloom y Fawcet (Tratado de histologia VII edición de 1978) describen la estructura del tejido linfoide estableciendo dos tipos de tejido:

A) El que forma parte del timo y la médula de la bolsa de Fabricio en las aves, que consta de linfocitos y un corto número de macrofagos, contenidos en las mallas de una red tridimensional de células estrelladas unidas por desmosomas. A estas células las denominan células reticulares por su forma de red y se originan de una proliferación epitelial del endodermo, el cual es invadido secundariamente por células germinales linfopoyéticas. Las fibras reticulares son escasas en esta variedad de tejido linfoide.

B) Aquel tejido linfoide que constituye la parte principal de los ganglios linfáticos, la pulpa blanca del bazo y las amigdalas, y que forman masas mas o menos conspicuas esparcidas por los tejidos conjuntivos del organismo. Estos autores distinguen con fines descriptivos dentro de este tipo de tejido linfoide dos variedades por su organización estructural dentro del organo que son las llamadas "Difusa" y "Nodular".

### 2.1.- Tejido linfoide difuso.

A nivel amigdalar este tejido comprende las regiones

internodulares o interfoliculares. Consta de un estroma esponjoso con linfocitos en sus mallas, el cual está compuesto a su vez por fibras y células reticulares de origen mesenquimatoso. Las fibras reticulares están intimamente asociadas a las células reticulares y a menudo, ocupan recovecos profundos o surcos en su superficie. Debido a sus apetencias cromáticas cuando se las tiñe con diversos colorantes, algunas de estas células reticulares pueden ser consideradas como macrófagos. Mas adelante, veremos que estas células son llamadas en la literatura anglosajona "células interdigitantes" (CID) y ya se aprecian en el desarrollo embrionario de la amigdala (Von Gaudeker y cols, 1982). A nivel ultraestructural, algunas de estas células reticulares son macrófagos fijos, en tanto que otras se diferencian muy poco de los fibroblastos del tejido conjuntivo. En los ganglios linfáticos cuya estructura es similar a la amigdala, experimentos que comprenden el marcaje con timidina tritiada H3, han demostrado que las células reticulares tienen una gran lentitud de desplazamiento; y en la regeneración del ganglio tras su irradiación, no se observa transformación de las células reticulares marcadas a elementos libres del parénquima linfoide, por lo que parece improbable que estas células puedan originar otros tipos celulares. Tampoco hay pruebas de que las células reticu

lares sean elementos primitivos o indiferenciados, Parecen mas bien fibroblastos implicados en la sintesis y mantenimiento de las fibras reticulares, o fagocitos ocasionalmente fijos, pertenecientes al sistema monocito-macrófago. — Las células libres de este tejido linfoide difuso, son linfocitos de varios tamaños, macrófagos y un número variable de células plasmáticas.

2.2.- Tejido linfoide nodular.

Los nódulos linfáticos son agrupaciones compactas y circunscritas de células dentro del tejido linfoide difuso. En la amigdala son muy numerosos. Aunque estos autores refieren que existen diversidad de opiniones respecto a su nomenclatura, actualmente parece aceptado su denominación en foliculos o nódulos primarios a aquellas colecciones redondeadas de pequeños linfocitos estrechamente agrupados y foliculos o nódulos secundarios aquellas estructuras deforma ovoide que constan de acumulos esféricos de células de mayor tamaño llamado centro germinal, revestidos de un casquete o manto de pequeños linfocitos. Se desconoce la organización precisa de los nódulos primarios y estos mismos autores (Bloom y Fawcet) dudan de su existencia ya que pueden ser simplemente secciones tangenciales del casquete linfocitario de los foliculos secundarios. Mas adelante ve

remos como, en general, la mayoria de los autores aceptan la existencia de foliculo primario y secundario.

Los nódulos secundarios están altamente organizados y faltan unicamente en el timo normal. En su forma plenamente desarrollada, los centros germinales aparecen como masas esféricas con un polo oscuro o densamente poblado y otro claro o de menor densidad de población celular. Se encuentran rodeados por una capsula de células alargadas, la cual, a su vez se encuentra parcialmente revestida por un casquete, en forma decreciente, de pequeños linfocitos. Estos centros muestran una polaridad bien delimitada morfologicamente, tanto mas cuanto que el casquete linfocitario es mas grueso sobre la región clara, tornandose gradualmente mas delgado hacia el polo oscuro, mostrando ademas una orientación constante respecto a las estructuras vecinas, de tal forma que la región clara y el casquete linfocitario se encuentrar dirigidos hacia la superficie epitelial mas próxima. Al casquete linfocitario tambien se le llama manto o corona ya que cuando el plano del corte histológico pasa a través de un centro germinal en una dirección perpendicular a su eje de simetría, no se observa la polaridad descrita, apareciendo el casquete linfocitario como un borde circular de anchura uniforme al que llamamos zona

del manto o corona.

La región oscura del centro germinal se tiñe intensamente como consecuencia de los núcleos y citoplasmas basófilos de numerosos elementos linfoides estrechamente agrupados (linfoblastos, linfocitos de mediano y gran tamaño y células en transición a la linea de células plasmáticas). Todas estas células se encuentran en proliferación activa. Tambien existen en esta zona oscura macrófagos cargados con detritus de linfocitos fagocitados. Las células libres se encuentran contenidas en las mallas de una red celular compuesta de elementos estrellados unidos por desmosomas, reciben el nombre de células dendriticas debido a sus numerosas prolongaciones radiales. La transición entre la zona clara y oscura es gradual; las grandes células basófilas de la linea linfoide dan paso progresivamente a linfocitos pequeños, desaparecen las imagenes de mitosis y disminuye número de macrófagos.

La capsula del centro germinal consta de un corto número de capas de células aplanadas reticulares unidas por desmosomas. El revestimiento se encuentra desorganizado a nivel del polo claro debido a la presencia de numerosos linfocitos pequeños muy deformados, que se supone han sido fijados en el curso de su emigración hacia o desde el casquete linfocitario suprayacente. Las fibras reticulares se encuentran esparcidas dentro del centro germinal y forman

una envoltura concentrica en torno a su periferia.

Los centros germinales pasan según opinión generalizada por una secuencia de cambios evolutivos, terminando, finalmente por involucionar y desaparecer. Su plazo vital y los acontecimientos que conducen a su desaparición, se desconocen. Tambien se sabe muy poco acerca de la función de tales centros germinales. Aunque esta y otras cuestiones se tratarán mas ampliamente mas adelante. Adelantemos aquí, que estudios autoradiográficos de las amigdalas despues de la inyección de timidina H3 parecen indicar que los linfocitos se originan en el centro germinal y se desplazan hacia fuera entrando en el casquete de pequeños linfocitos emigrando finalmente al epitelio suprayacente.

La significación funcional de las células dendriticas y sus interrelaciones con las células reticulares del tejido linfoide difuso, no son nada claras. No parecen ser capaces de fagocitosis por lo que el término de macrófagos dendríticos es inadecuado o inapropiado. Si se ha demostrado que fijan antigeno en presencia de Ac. y que retienen el complejo Ag-Ac por periodos largos de tiempo.

Los centros germinales se desarrollan asimismo en ratones timectomizados al nacer y en pacientes con aplasia congénita de timo. En los pájaros se evita su aparición con

la bursectomia y faltan en los humanos con agammaglobulinemia congénita.

Los linfocitos B inyectados intravenosamente se localizan tanto en los centros germinales en su casquete de pequeños linfocitos. Es lógico pensar por tanto, que se encuentran implicados en algún estadío del desarrollo o de la diferenciación funcional de los linfocitos B.

La aparición de los centros germinales está en estrecha relación con la evolución de las respuestas inmunologicas humorales. Se forman durante la respuesta primaria al antígeno y aumentan en número de manera explosiva durante la respuesta secundaria, en tanto que son muy escasos en los animales criados en medio libre de gérmenes. Cada centro germinal parece producir Ac monoespecificos de la clase IgG, si bien no se diferencian en células plasmáticas o lo hacen unicamente en una proporción muy corta. Se ha especulado con la posibilidad de que los centros germinales se desarrollen como consecuencia de contactos repetidos con antigenos desencadenantes de la secreción de anticuerpos y que, por tanto dichos centros pueden estar implicados en la memoria a largo plazo de la respuesta IgG.

## 3.- DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL DE LA AMIGDALA PALATINA

Orts LLorca (Tratado de Anatomia Humana IV edición de 1972) refiere que la amigdala palatina proviene de un esbozo endodérmico y mesodérmico situado en el segmento ventral de la 2ª hendidura branquial entoblástica. Cita que en el curso de la 4º-5º semanas del desarrollo, el intestino faringeo emite un cierto número de invaginaciones, las bolsas branquiales entoblasticas. Estas aparecen a lo largo de las paredes laterales del intestino faringeo y penetran poco a poco en el mesénquima que les rodea. El embrión humano posee, cinco pares de bolsas endobranquiales. La 2ª bolsa endobranquial se oblitera casi en su totalidad, y es en la parte restante no obliterada donde aparece una proliferación epitelial, que será invadida secundariamente, por el tejido mesoblástico, para formar el esbozo de la amigdala. Morag y cola, (1975) también hablan del desarrollo de la amigdala procedente de la 2º bolsa faringea en completa proximidad al desarrollo embrionario del timo. Continúa Orts LLorca en la misma cita afirmando que del 3º al 5º mes aparece a nivel de la amigdala una infiltración progresiva de tejido linfoide, cuyas células linfoides aparecen cerca de la superficie epitelial y se organiza en foliculos después del 6º mes.

Recientemente, en 1982, Von Gaudeker y cols, investigando en amigdalas de cincuenta fetos humanos de 8-28 semanas de gestación por microscopía electrónica, estudios enzimáticos e inmunohistoquimicos sobre secciones de criostato, el desarrollo de células estacionarias y de estas células migratorias mononucleares durante este periodo de la morfogénesis de la amigdala palatina humana fetal, observaron que el desarrollo de la amigdala comienza en la 14ª semana de gestación cuando el mesénquima subyacente a la membrana mucosa de la cavidad amigdalar es invadido por células errantes mononucleares originarias principalmente del higado y representan células pre-B. Al mismo tiempo se pueden observar células linfoides que por sus criterios morfologicos pertenecen a la linea celular T y probablemente son originarias del timo. Leene (1971) sugirió el origen hepático pre-B de las células migratorias mononucleares en estudios sobre el desarrollo amigdalar en fetos de rata . Von Gaudeker y cols, (1982) observan que hacia la 15ª semana de gestación, criptas epiteliales crecen hacia el interior del tejido conectivo. Al mismo tiempo se desarrollan las típicas estructuras linfoides observando acumulaciones nodulares de células linfoides. También en esta etapa utilizando esterasa no específica, un marcador enzimático de las células foliculares

dendríticas CFD, fue posible demostrar estos foliculos primarios antes de la 16ª semana de gestación y con microscopio electrónico se observó dentro de estos folículos, los precursores de las células foliculares dendríticas CFD. Las células linfoides en los folículos no mostraron criterios morfológicos de células T, sino que mas bien recordaban mas fielmente a las células B. Por consiguiente, estos folículos primarios en la amigdala palatina pueden ser considerados como el primer ensamblaje de regiones celulares B en el tejido linfoide humano fetal, ya que con anterioridad, en 1980, Muller Hermelink y cols, demostraron que los foliculos primarios en los ganglios linfáticos no aparecen antes de la 22ª semana de gestación y en el bazo fetal no lo hicieron antes de la 26ª semanas.

En la misma etapa que observan el crecimiento criptico (entre la 15ª y 16ª semanas), encuentran células estacionarias con criterios morfológicos de células interdigitantes CID o sus precursores, dentro del epitelio mucoso de las criptas, en el tejido conectivo que las rodea, y en el tejido linfoide parafolicular. A estas células estacionarias precursoras, así como a las encontradas en los folículos, las denominan utilizando la terminología anglosajona CID "like cells". Asímismo, en esta etapa, encuentran frecuen-

temente que un buen número de células linfoides en estas áreas previamente descritas, están en íntimo contacto con las células estacionarias identificadas como precursoras de las CID. Esta unión íntima ya había sido observada por Leene — (1971) en fetos de rata. En estudios similares, Stutte y — cols, (1976) y Grossi y cols,(1978) habían identificado a - las células linfoides de estas áreas amigdalares, incluido el epitelio criptico, como células pertenecientes a la po— blación celular T. Von Gaudeker y cols, (1982) encuentran - dentro de estas células linfoides algunas con núcleos irregularmente contorneados y numerosos gránulos de forma heterogénea cerca del aparato de Golgi, algunos de los cuales muestran una matriz cristalina. Similares células linfáti— cas han sido identificadas en amigdalas de niños por Grossi y cols, (1978) como las llamadas células T "gamma". Estos - linfocitos T contenía gránulos azurófilos tras la tinción de May-Grünwald. A estas células T, Grossi y cols, (1978) sugieren que pertenecen a la población de células T supresoras. Sin embargo en amigdalas fetales humanas, no se observó un estrecho contacto de esta subpoblación celular T a las células CID-like. Previamente, Janossi y cols, (1980) en amigdalas de niños de 5-15 años investigadas inmunohistoquimicamente por el uso de los anticuerpos monoclonales

Ac Mo OKT4 y OKT8, mostraron que también en amigdalas postnatales humanas, las células T helper (colaboradoras) frecuentemente tienen un íntimo contacto con las CID, mientras que las células T supresoras se localizan lejos de estas células estacionarias. Sin embargo Von Gaudeker y cols, (1982) no pudieron diferenciar en amigdalas fetales humanas, las subpoblaciones celulares T helper de las supresoras por el uso de criterios ultraestructurales, lo cual ha sido corroborado posteriormente por Kochman y cols, (1984), quienes demuestran el fracaso para distinguir ultraestructuralmente estas dos subpoblaciones celulares T.

Markgraf y cols,(1983) encuentran que las células llamadas CID-like aparecen simultaneamente al desarrollo de las regiones celulares T en nódulos linfáticos humanos fetales, y observan que tiene lugar el mismo contacto caracteristico, entre las células CID-like y las células T helper, a nivel del epitelio de la cripta amigdalar como en las regiones celulares T de los organos linfáticos secundarios, tanto en etapas fetales como postnatales. Por lo que consideran que el epitelio criptico amigdalar puede representar una región celular T intraepitelial.

El hallazgo de las diferentes células estacionarias durante el desarrollo de las regiones celulares B y T lo consideran los autores citados como un importante factor

para la maduración de diferentes subpoblaciones de células linfoides inmunocompetentes.

En la actualidad existe una gran controversia acerca de la significación de estas uniones entre células linfoides y no linfoides, tanto en áreas T como B en todo el proceso de la respuesta inmunitaria. En otros apartados de esta introducción se citarán los distintos autores que con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales y otras técnicas están tratando de esclarecer este campo hasta ahora desconocido.

## 4.- MARCADORES CELULARES; ANTICUERPOS MONOCLONALES

### 4.1.- Generalidades.

Antes de entrar a describir los componentes celulares y la arquitectura de la amigdala, es obligado señalar los principales marcadores de superficie conocidos, a través de los cuales se ha conseguido establecer un gran número de poblaciones y subpoblaciones linfoides y no linfoides. Gracias a la tecnología del hibridoma (Köehler y Milstein, 1975) se han podido producir, y se siguen produciendo, un gran número de anticuerpos monoclonales que contribuyen a identificar determinados antigenos, específicos de ciertos tipos de células. A pesar de que con antisueros heteróloogos tambien se había conseguido establecer determinadas poblaciones celulares (Raff, 1970; Jondal y cols, 1973; etc), y de que bajo determinadas circunstancias pueden distinguirse poblaciones celulares linfoides por otros criterios tanto morfológicos como enzimáticos, (Vogler y cols, 1979; Grossi y cols, 1978) es a partir del desarrollo de la tecnología referida de Köehler y Milstein, cuando mas se ha podido avanzar en la identificación de multiples conjuntos de células que expresan distintas capacidades funcionales, muchas veces coincidentes y otras parcialmente variantes -

dentro del sistema inmunitario.

En este apartado se describen los principales marcadores o antígenos de superficie, los cuales pueden ser divididos en dos categorías: receptores y antígenos. Receptores son estructuras de superficie responsables para la unión a particulas definidas, tales como eritrocitos, v g, receptores E, EA, EAC que son detectados por la formación de rosetas. Los antígenos de superficie, tales como Ig de superficie, antígenos celulares T, u otros antígenos de diferenciación, son detectados como xenoantígenos con anticuerpos heterólogos específicos o anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellos. Asímismo se apuntan algunas limitaciones en la interpretación de los marcadores de superficie y las ventajas e inconvenientes de los Ac Mo.

4.1.1.- Limitaciones de los marcadores de superficie.

Siguiendo las observaciones de Moretta y cols, (1982), y Thiel (1984), se puede afirmar, que a pesar de la utilidad de los marcadores de superficie en la identificación de diferentes poblaciones de linfocitos y en la comprensión de las interacciones celulares que ocurren en las respuestas inmunes, existen varias limitaciones en su aplicación que deberían esclarecerse:

A) La definición de poblaciones linfocitarias por el uso de

marcadores de superficie, es principalmente operacional. Así, en el estudio de linfocitos T derivados del timo, nosotros asumimos que cada célula formadora de rosetas con eritrocitos de carnero, es una célula T. Esta asunción, sin embargo, puede no ser completamente correcta.

B) La identificación de "subpoblaciones funcionales" por el uso de marcadores de superficie, no significa que el mismo marcador esté directamente relacionado a la capacidad funcional ya definida.

C) La asunción de que las capacidades funcionales adscritas a una determinada subpoblación de células in vitro, sean también factibles in vivo, puede ser irreal o falso.

D) Muy frecuentemente, sólo una fracción de células que expresan un cierto marcador, manifiesta la función que generalmente es atribuida incorrectamente, al total de la fracción celular.

E) La expresión de marcadores puede cambiar como una consecuencia de la activación celular o diferenciación última.

F) Los métodos empleados para el fraccionamiento celular puede afectar a la expresión de algunos marcadores, (por ej.,— la interacción con complejos inmunes pueden modular la expresión del receptor Fc de ciertos tipos celulares).

4.1.2.- Ventajas e inconvenientes de los anticuerpos monoclonales (Ac Mo).

Muchos de los problemas asociados con los clásicos heteroantisueros, han sido solventados con la introducción de la producción de anticuerpos con la tecnología del hibridoma de Köehler y Milstein (1977). Con esta tecnica, linfocitos B inmunes de ratón se fusionan con células de mieloma. El resultado son células hibridas que retienen tanto la capacidad de producir anticuerpos de los linfocitos B como la de crecimiento indefinido de la linea mielomatosa; así que tras la clonación, podía haber una linea celular inmortal produciendo altas concentraciones de anticuerpo de una única especie molecular. Además de las ventajas de uniformidad, precisión, y oferta ilimitada, un segundo mérito de la tecnica es evidente: la producción de anticuerpos contra determinantes menores, que los antisueros policlonales convencionales no pueden detectar. De esta manera, se ha renovado el interés en conseguir la caracterización de los antígenos de diferenciación en la linfopoyesis humana y en las enfermedades malignas.

El uso de Ac Mo en estudios de linfocitos humanos, leucemia, y linfoma se ha extendido rápidamente, y son ya muchos los Ac Mo producidos que están disponibles en el mercado.

Por otra parte, los principales inconvenientes de los Ac Mo, surgen del hecho, de que pueden estar dirigidos contra un determinante/s o epitopo/s restringido de una macromolécula antigénica, y esta reacción puede ser influenciada por varios caminos .

Reacciones cruzadas por idéntico epítopo pueden ocurrir mas frecuentemente de lo esperado, y llevar a interpretaciones erróneas. Un ejemplo que refieren muchos autores, es la reacción cruzada de Ac Mo contra células T, con neuronas de Purkinje de varias especies (Garson y — cols, 1982). El polimorfismo genético, puede explicar algunas reacciones negativas, como evidencia en casos raros el polimorfismo del antígeno OKT4 en las células T inductoras humanas (Poch, 1981). La expresión de epítopo críptico o la pérdida de epítopo debe también ser tomada en consideración para reacciones negativas, especialmente en las enfermedades malignas (Thiel, 1984). También, algunos problemas tecnicos se deben considerar: los Ac Mo suelen plantear problemas en la clásica reacción de inmunoprecipitación del antígeno y anticuerpo. Los antisueros clásicos fijan complemento mas facilmente que los Ac Mo, porque el complemento requiere al menos dos moléculas de anticuerpo ligadas sobre determinantes vecinos (Howard y —

cols, 1983). Una vía de solventar estos problemas es el conveniente uso de combinaciones de Ac Mo, pues, según este último autor, para la precipitación y citotoxicidad se ha demostrado que la mezcla de dos Ac Mo es suficiente. Algunos Ac Mo, sin embargo, no fijan complemento, tales como el OKT5, que es una IgG1, mientras que el OKT3, OKT4 y OKT8 pertenecen a la subclase IgG2 y fijan complemento (Reinhertz y cols, 1979 y 1980).

4.2.- MARCADORES DE LINFOCITOS B

4.2.1.- Inmunoglobulinas.

Se ha mostrado por estudios en modelos animales y confirmado en una variedad de sistemas experimentales (Pernis y cols, 1970; Jondal y cols, 1973) que la presencia de inmunoglobulinas de superficie IgS, representa el mejor marcador para la identificación de linfocitos B. Aiuti y cols, (1974) realizaron estudios con doble marcador y demostraron que los marcadores exclusivos para células T, tales como el receptor para el eritrocito de carnero, están presentes en diferentes células que portan IgS. Además, observaron, que la eliminación de células IgS (+) tenía como resultado la falta de producción de inmunoglobulinas por las poblaciones celulares restantes tras la estimulación con antígeno o ac-

tivadores policlonales. Estas mismas poblaciones restantes, aún eran capaces de llevar a cabo las distintas actividades funcionales caracteristicas de las células T.

Preud'homme (1974) estudiando las clases de inmunoglobulinas en las células linfoides humanas, observó que los linfocitos B generalmente expresan moléculas, IgM e IgD. Células portadoras de IgG o IgA de superficie, también fueron detectadas en individuos normales y pacientes con desordenes linfoproliferativos, por dicho autor.

Mc Cune y cols (1980) purificaron las distintas clases de inmunoglobulinas de la membrana linfocitaria y observaron que la IgM y la IgA se expresan en la membrana celular en su forma monomérica; encontrando interesantes diferencias entre el tamaño de la Ig de membrana y su pareja secretada. Así vieron que la IgM de superficie difiere de la IgM secretada, en la estructura primaria del final de la porción C terminal.

Según Gathings y cols (1977), las células pertenecientes a la línea celular B, no siempre expresan IgS: Por ej. en células B precoces (designadas como células pre-B) se detecta IgM intracitoplasmática, detectandose dificilmente IgM de superficie. De igual forma que la Ig citoplasmática se encuentra en linfocitos pre-B, también está presente en

células plasmáticas y células linfoplasmocitoides incluyendo cadenas ligeras y pesadas. Moretta y cols (1982), observan que algunas células B aparentemente maduras tienen muy poca Ig de superficie para ser detectadas por técnicas de inmunofluorescencia y postulan que la naturaleza celular B puede ser detectada por aplicación adicional de marcadores de superficie, y aunque la mayoría de ellos no son especificos de células B, se deben usar en combinación para permitir una definición precisa de la célula dada.

4.2.2.- Antígenos HLA-DR

Estos aloantígenos están codificados por la región - HLA-D/DR y son el equivalente de moléculas codificadas — por la región I del complejo H-2 en el ratón (antígenos Ia). Estos antigenos de superficie parecen estar directamente - envueltos en varias interacciones que tienen lugar entre células inmunocompetentes. Pueden ser detectados en ensayos citotóxicos o fluorescentes por heteroantisueros o por anticuerpos monoclonales anti-DR obtenidos de hibridoma.

Las moléculas DR según Humphreys y cols (1976) están constituidas de dos cadenas polipeptídicas no covalentes - enlazadas, de 33.000 dalton (cadena alfa) y 29.000 dalton (cadena beta) respectivamente. Desde que se sabe que su és-

tructura se parece a los antigenos Ia del ratón, a menudo - son llamados antígenos Ia-like, o simplemente antígenos Ia. Estos antígenos Ia están expresados por una variedad de células entre las células mononucleares circulantes, siendo expresados por monocitos y linfocitos B (Wernet, 1976). Adelantemos aquí que estos antígenos se encuadran dentro de los llamados antígenos de clase II, estando presentes en una gran cantidad de células del organismo; a nivel de amigdala palatina, además de en las células linfoides que mas tarde se especificarán, también estan presentes en las células foliculares dendríticas CFD, células interdigitantes CID, y las cuestionadas células de Langerhans en el epitelio críptico amigdalar (Van der Valk,1984; Simar y cols, - 1984; etc).

Ebans, (1978) y Yu y cols, (1980) han mostrado que también las células T en activación por una variedad de estímulos expresan antígenos Ia en cantidades relativamente grandes. Previamente, Wuinchester (1977) observó que otros tipos celulares sanguineos tales como precursores mieloides y eritroides también expresan Ag Ia en etapas tempranas de maduración por lo que es evidente que estos marcadores no pueden ser usados de forma absoluta para la identificación de células B, sino en combinación con otros marcadores.

4.2.3.- Receptores Fc.

Los receptores para las porciones Fc de la molécula IgG, están presentes en la mayoría de células hematopoyéticas, incluyendo granulocitos, monocitos y linfocitos (Huber y cols, 1976; Hensen, 1976). Por consiguiente, este marcador no es específico de linaje celular, y además tiene valor limitado para el inmunodiagnostico de tipo celular. Es mas pronunciada su expresión en linfocitos B, y por ello fueron utilizados en los primeros trabajos para discriminarlos de las células T. Posteriormente, Ferrarini y cols, (1977); Pichler y cols, (1977), mostraron que las células B tienen receptores no sólo para las porciones Fc de la IgG, sino también para los de la IgM, IgA, e IgE. Estos receptores se detectan usualmente por la formación de rosetas con hematies cubiertos con anticuerpos de una clase de Ig dada (rosetas EA) o con anticuerpos - monoclonales. La función de los receptores Fc en la superficie celular B permanece desconocida, a pesar de que varios modelos teóricos funcionales han sido propuestos como los elaborados por Moretta y cols (1978, 1981). Aunque como afirma también este mismo autor en 1982, si bien los receptores Fc para diferentes clases de Ig, están expresados en otros tipos celulares, algunos de ellos; tales como

el receptor Fc para la IgM y para la IgA, pueden ser usados en combinación con otros marcadores para asignar un determinado tipo celular a la linea celular B, distinguiendola así de las lineas granulocítica o monocítica.

4.2.4.- Receptores del complemento.

Desde Bianco y cols,(1970), y posteriormente Ross y cols, (1975) se sabe que receptores para diferentes componentes del complemento, tales como C1q, C3, C4, C8 y - C2-inhibidor, están presentes en la superficie de las células B. Sin embargo, entre este grupo, los receptores - para la porción C3 se han utilizado muy a menudo como marcadores. Desde Huber y cols, (1975) son nomunmente detectados por formación de rosetas con hematies cubiertos con anticuerpo y complemento -rosetas EAC-. Se han detectado dos tipos de receptores C3: el receptor C3b, también llamado (CR1) y el receptor C3d (o CR2). Los linfocitos C3d positivos constituyen una subpoblación de células C3b positivas, los cuales representan a la mayoría de células B maduras. Según Moretta y cols, (1982), el receptor C3b por sí sólo es detectable en células B en etapas tempranas de maduración. Por otra parte, los receptores C3 no son exclusivos de células B, ya que los granulocitos expresan C3b o C3d dependiendo de su etapa de maduración,

mientras que los monocitos expresan ambos. Para Daha y - cols, (1982) el CR1 se encuentra en macrófagos, células foliculares dendríticas CFD y la mayoría de linfocitos B. A nivel amigdalar, Van der Valk y cols, (1984) encuentran células portadoras de C3b en la zona del manto de los centros germinales, en éstos, en los folículos primarios y - en las células foliculares dendríticas CFD. Heinen E y - cols, (1984) al aislar las células foliculares dendríticas de los folículos de las amigdalas, encuentran que son estas las que se tiñen intensamente para el CR1, aunque en su caso, utilizan el Ac Mo To5 (antireceptor C3b), observando una tinción intensa para las células foliculares - dendríticas, aunque también se tiñen algunos linfocitos y macrófagos de esta zona, pero menos intensamente.

4.2.5.- Receptores para eritrocitos de ratón.

Stathopoulos y cols,(1974) descubrieron que los eritrocitos de ratón se unen selectivamente a las células B Desde entonces están generalmente considerados como marcadores para células B maduras, aunque posteriormente Bertoglio y cols, (1977) vieron que no se unían a la totalidad de células B y además; algunos linfocitos IgS negativos aparentemente, forman rosetas con estas células indicadoras (rosetas M). Estos mismos autores, señalaron que

sólo una subolase de linfocitos B (5% de los linfocitos de sangre periférica) forman rosetas M y que estas células tienen IgM, y/o IgD en su superficie. La formación de rosetas con eritrocitos de ratón ha sido también utilizada como un marcador válido para la detección de células B malignas (Moretta y cols, 1982).

4.2.6.- Otros marcadores.

Marcadores adicionales han sido utilizados en un intento de obtener una mejor definición de células B y sus subpoblaciones. En algunos casos representan el resultado de observaciones esporádicas sin ulterior desarrollo, mientras que otros marcadores son consistentemente utilizados en un limitado número de laboratorios.

En los últimos años, varios laboratorios han producido anticuerpos monoclonales específicos del linaje B:

- Ac Mo B1 (Stashenko y cols 1980), está presente en apróximadamente el 9% de células mononúcleares de sangre periférica y en mas del 95% de células B de sangre y órganos linfoides, investigado en todos ellos de forma individual.
- Ac Mo BA1 (Abranson y cols, 1981), reconoce los linfocitos B periféricos, células de la leucemia linfática crónica B (LLC-B) y leucemia linfática agu-

da pre-B (LLA-Pre B), además de granulocitos.

- Ac Mo BA2 (Kersey y cols, 1981), reconoce a menos del 1% de linfocitos de sangre periférica, células progenitoras linfohemopoyéticas en médula ósea, y células no T y no B.
- Ac Mo To15 (Stein y cols, 1982), reconoce un antígeno celular anti pan-B.
- Ac Mo B2 (Nadler y cols, 1981), reconoce una subpoblación de linfocitos B de sangre periférica.

Algunos de estos anticuerpos han sido demostrados por estar dirigidos contra determinantes en la membrana de superficie de la célula B, distintos de los marcadores comunmente reconocidos tales como IgS, Ia, Fc y C3. Ellos pueden demostrar el uso en la delimitación, no solo de la población celular B completa, sino varias subpoblaciones funcionales de células dentro de este grupo celular heterogéneo. Además ellos pueden ser utiles en la definición de varios estadios de diferenciación, activación y en ciertos casos de transformación maligna de células B. En este sentido, el antígeno de la leucemia linfática común (CALLA), descubierto por Greaves y cols, (1975) en células de LLA, y confirmado por varios grupos de investigadores (Rod y cols, 1977; Billing y cols, 1978), no -

está presente en células sanguineas ni en ningún otro tipo de leucemias, excepto en la leucemia linfática aguda común (que no expresa marcadores de T ni de B) y en las crisis - blásticas de la leucemia mieloide crónica. Mas adelante, - Greaves y cols (1978)vieron una débil expresión en algunas células fetales de médula ósea, y en células en regeneración de médula ósea y también fue observado mas tarde, indicando, que ello puede ser un antígeno de diferenciación normal de los progenitores linfoides de médula ósea. Este antígeno CALLA que no es detectable en sangre, ni en gran — cantidad en médula ósea, sin embargo, está asociado a la - leucemia y tiene un alto valor diagnostico. Greaves (1978), lo ha caracterizado y se trata de una glicoproteina con un peso molecular de 100.000 dalton que es reconocido por el Ac Mo J-5. Por medio de éste y otros anticuerpos monoclonales, Greaves (1983) ha demostrado la presencia de este antígeno en células linfoides inmaduras normales, que correspondían a linfocitos pre-B de médula ósea. Braun y — cols, (1983) han señalado la expresión de antígeno CALLA en granulocitos y fibroblastos de piel, aunque en menor - cantidad que en médula ósea.

Por último, el Ac Mo GR2110 (Morales, 1985), similar al BA2 ya descrito, reconoce una molécula de 24.000 dalton

de peso molecular presente en leucemia linfoblastica humana, linfocitos pre-pre-B y pre-B, plaquetas y granulocitos.

4.2.7.- Marcadores de diferenciación celular B.

La célula linfoide B, al igual que todas las series celulares sanguineas, procede de una célula pluripotencial -- "Stem cell" (Daliwal y cols, 1978). La primera célula de estirpe B identificable por técnicas inmunológicas es la célula pre-B presente en médula ósea y caracterizada por presentar cadenas M citoplasmáticas (Pearl y cols, 1978). Pero los diversos estudios en el fenotipo celular permiten identificar precursores B incluso antes de la detección de la cadena M intracitoplasmática; seria la célula pre-pre-B (Korsmeyer y cols, 1981). Existe otro marcador de línea B presente ya desde el estadío pre-B (pieza J) que además de intervenir en la polimerización de la IgM e IgA, juega un papel fundamental en la biosintesis de las inmunoglobulinas.

La célula pre-B dará lugar a otra célula que ya presenta inmunoglobulinas en la superficie (IgM de superficie); esta es considerada como la primera célula inmunológicamente competente, que abandonará la médula ósea para poblar los organos linfoides periféricos. Según Galton y cols, (1982), en sangre periférica distinguen dos tipos de linfocitos.

a) Linfocitos en circulación, que constituyen el 95% -

de las células de los folículos linfoides, y funcionalmente son células B "virgenes" que no han tenido contacto con el antígeno. En su superficie expresan en su mayoría IgM + IgD o sólo IgD.

b) Células histicas o estáticas que comprenden el 95% de las células de la zona marginal esplénica así como un 10-15% de los linfocitos de sangre periférica y expresan IgM de superficie.

A partir de este momento, la maduración B dependerá de la existencia de un antígeno que desencadene su diferenciación. La acción del antígeno hará que el linfocito B siga dos posibles vías:

1) Transformación en inmunoblasto, célula de gran tamaño, nucleolo central y cromatina laxa, diferenciación que acontece como fenómeno fundamental de la respuesta inmune primaria y

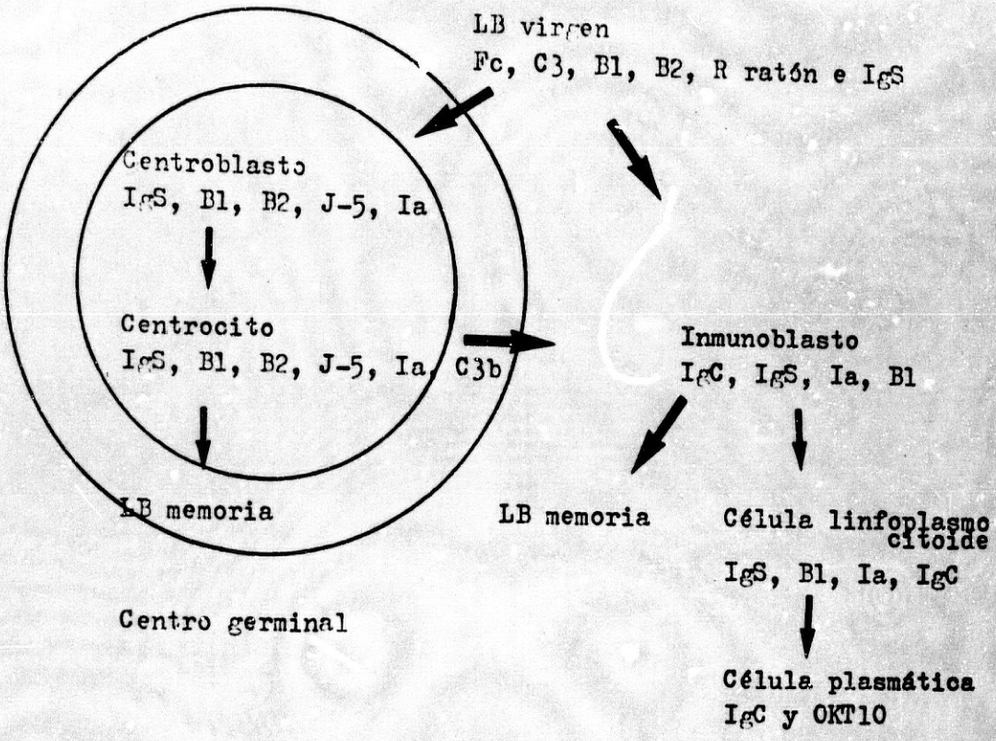
2) Formación de los centros germinales por dichos linfocitos estimulados en los órganos linfoides periféricos, hecho característico de la respuesta inmune secundaria. Las células de los centros germinales (centroblastos y centrocitos) se transforman también en inmunoblastos. La mayoría de los inmunoblastos dará lugar a un espectro de células secretoras de inmunoglobulinas, desde la célula plasmocitoi

de, de pequeño tamaño, hasta la célula plasmática convencional; otra parte se constituirán en células de memoria. Las características fenotípicas de cada uno de los estadíos descritos, se exponen en la siguiente tabla

| marcadores | Stem cell | L pre-preB | L pre-B | LB virgen | LB Inmunoblasto |
|---|---|---|---|---|---|
| TdT | + | + | + | - | - |
| Ia | + | + | + | + | + |
| CALLA | - | + | + | (+ -) | - |
| IgC | - | - | IgM | - | - |
| IgS | - | - | - | IgM | IgS |
| B1 | ? | + | + | + | + |
| B2 | - | - | + | + | + |
| BA1 | ? | + | + | + | + |
| Fc | - | - | - | + | + |
| C3 | - | - | - | + | + |

Las células de los cuatro primeros estadíos descritos, se encuentran en médula ósea y el último o "LB inmunoblasto" en sangre periférica.

A nivel tisular, que corresponde también a la amigdala, el esquema podría ser según Gonzalez, (1983):




Otros estudios de los estadíos de diferenciación B en amigdala, fueron los llevados a cabo por Atul y cols (1981) que en cortes congelados de amigdala con la técnica de inmunoperóxidasa, estudiaron las etapas de diferenciación celular B y demostraron que es en los folículos linfoides — (el mayor compartimento anatómico de células B) donde aparecen expresiones celulares antigénicas que reflejan diferenciación celular B. Así la mayoría de células en los fo-

líoulos primarios y en las zonas del manto de los folículos secundarios, expresaron similares antígenos de superficie a los de las células B circulantes, normalmente IgM, IgD, Ia, B1 y B2. En contraste las células de los centros germinales de los folículos secundarios reaccionaban con IgM, IgG, B1, B2 e Ia, pero no con IgD, y además adquirían el antígeno - T10. Los centros germinales se tiñen mas intensamente que - la zona del manto con el Ac Mo B2 mientras que no hubo diferencias en la intensidad de reacción con el B1. Las células plasmáticas que representan el último estadío de diferenciación celular B, muestran intensa reacción citoplasmática con el Ac Mo OKT10. Según estos autores, con esto demuestran, - que la generación de células centrogerminales en los folículos primarios conllevan cambios fenotípicos, que corresponden en gran parte a los previamente observados tras la activación mitogénica o antigénica de LB.

4.3.- MARCADORES DE LINFOCITOS T

Los linfocitos T, constituyen un grupo heterogéneo de células que son responsables de una variedad de fenómenos inmunológicos, tales como la hipersensibilidad retardada, la respuesta proliferativa a células alogénicas, la citotóxicidad mediada por células, y la resistencia a agentes infecciosos mediada por células, Heynes y cols (1980). También juegan un papel central en la regulación de las actividades de otros tipos celulares, no necesariamente limitados a células inmunocompetentes, como mas adelante veremos en amigdala palatina por los hallazgos obtenidos por Yamanaka y cols (1983); Simar (1984); etc.

Desde Raff (1970), que mostró que las células T podían ser reconocidas por un aloantígeno de superficie llamado teta, las células teta + son definidas como "derivadas del timo" o linfocitos T.

4.3.1.- Rosetas E.

En 1970 Brain y cols, y en el mismo año Coombs y cols, mostraron que una fracción de linfocitos de sangre periférica humana era capaz de formar rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero (rosetas E). Las células formadoras de rosetas E fueron detectadas en el timo fetal antes de su aparición en la periferia y carecían de IgS, el marcador exclusivo de células B. A causa de estas observaciones y o

tras llevadas a cabo en determinadas enfermedades inmunológicas, las células formadoras de rosetas E fueron asignadas a la linea celular T; y las rosetas E llegaron a ser el marcador principal para la identificación y enumeración de células T humanas. Desde los trabajos de Woda y cols (1977), se sabe que el test de rosetas E no es específico de células T ya que otros tipos de células como fibroblastos y células parenquimatosas de hígado y pulmón, también forman rosetas E.

4.3.2.- Otros marcadores de linfocitos T.

Actualmente, gracias al uso de los anticuerpos monoclonales, conocemos una gran cantidad de marcadores del linaje celular T. Entre los Ac Mo comercialmente disponibles, el Anti-Leu 1 (Engleman y cols, 1981) se une a un antígeno de superficie presente en apróximadamente el 95% de timocitos humanos y en mas del 95% de células formadoras de rosetas E periféricas. Por tanto, reconoce, tanto células T maduras como inmaduras.

El Ac Mo OKT3 se une a un antígeno de superficie célular ausente en timocitos, pero presente en 85-95% de células formadoras de rosetas E periféricas. Además reconoce células T en la última etapa de maduración (Reinherz y cols, 1980). Hoy en día, sigue siendo especulativo, si

la pequeña fracción de células formadoras de rosetas E, que es negativa para el Ac Mo OKT3, pertenece a la linea celular T. Estos mismos autores (1980) vieron, que el - Ac Mo OKT3 efectivamente, reacciona casi con todas las células T maduras, pero también con una fracción de timocitos.

Otro Ac Mo, el OKT11, reacciona con el receptor para eritrocitos de carnero (Verbi y cols, 1982), se une a todas las células T periféricas, así como a la gran - mayoría de timocitos, pero no reacciona con la fracción de timocitos rosetas E (-), que antes veíamos. Para Tax (1984), esta subpoblación de timocitos, rosetas E (-),- es interesante respecto a la diferenciación y malignidad de timocitos, ya que Janossy y cols,(1980) observaron - que el 10-15% de células de pacientes con leucemia linfática aguda T (LLA-T), no forman rosetas E y esta misma fracción no reacciona con otros anticuerpos de la serie OKT (Greaves, 1981).

Vodinelich y cols, (1983) produce otro Ac Mo, el - WT1, que reacciona con todos los timocitos, incluida esta fracción conflictiva, además de con grandes blastos tímicos de las etapas tempranas de diferenciación, y - con la gran mayoría de células T periféricas activadas

con fitohemaglutinina.

Otro Ac Mo, el 3A1, descrito por Haynes y cols, (1979 y 1981), tiene una distribución similar al WT1, - siendo las uniones a las células T de éste, bloqueadas por el 3A1, por lo que posteriormente se ha postulado, que ambos anticuerpos reconocen el mismo antígeno, presente en células T humanas. Sin embargo, el 3A1 es también reactivo con monocitos (Haynes, 1981) y células de leucemia mieloide aguda (Van der Reigden y cols, 1982); y el WT1 no reacciona con células eritroides y mieloides ni sus precursores, ni con linfocitos B. Además, el WT1 reacciona con linfocitos T de macaco rhesus, a diferencia del 3A1 (Tax, 1984).

Otro de los primeros intentos para aislar subpoblaciones linfocitarias T humanas, se basó, en el uso de - receptores de superficie para la porción Fc de la IgM o de la IgG (R Fcm, o R Fcg) por Ferrarini y cols, (1975) y posteriormente Mengari y cols, (1978). Las técnicas - mas comunmente utilizadas para estos estudios, fueron - el uso de la formación de rosetas con eritrocitos cubiertos con moléculas de Ig purificadas.

Los receptores para las porciones Fc de la IgM y - la IgG, no son fácilmente detectables en los timocitos

sino sólo en células T periféricas (Moretta y cols,1979) indicando que ellos son marcadores para células en las etapas relativamente tardías de su maduración. Desde un principio todos los autores, consideraron que estos dos receptores son expresados por células diferentes, y por ello fue posible purificarlas como fracciones celulares distintas (células Tm y Tg), que han sido subsecuentemente analizadas para una variedad de funciones in vitro, (Grossi y cols, 1978). Ambas fracciones proliferan en respuesta a células alogénicas y mitógenos, aunque a diferentes niveles (Moretta y cols, 1979). Con mayor importancia, las células Tm incluyen células con capacidad estimuladora "Helper" en la proliferación celular B y diferenciación in vitro, mientras que las células Tg, tras el contacto con los complejos inmunes IgG, exhiben capacidades marcadas como supresoras (Moretta y cols, 1978).

Estas fracciones se identificaron , primero con antisueros heterólogos: El TH1 (Evans y cols, 1977) identificó la fracción Tm, y el TH2 la fracción Tg (Evans y cols, 1978). Mas tarde estas subpoblaciones se identificaron con Ac Mo, así:

El OKT4 o Leu-3 (Evans y cols, 1981) para la fracción Tm y el OKT5 u OKT8 (Reinhertz y cols, 1980) o Leu-2a —

(Lebdetter y cols, 1981) para la fracción Tg. No obstante, existen algunas diferencias entre ambos grupos:

El TH1 está presente en todos los timocitos, pero sólo en el 40-60% de células T de sangre periférica. Las células TH1 positivas responden a células alogénicas y a antígenos solubles o aloantígenos, pero contienen precursores de linfocitos T citotóxicos (CTL). Por su parte el OKT5 u OKT8 se une al 20-30% de células T de sangre periférica. Esta subpoblación ha sido señalada como representante de la subpoblación supresora/citotóxica. El OKT4 se une apróximadamente al 60% de las células T periféricas y no reacciona con las células OKT5 positivas. Las células OKT4 positivas colaboran en la diferenciación de las células B por PWM, así como en el desarrollo de células citotóxicas y supresoras OKT5 positivas (Reinhertz y cols, 1983). Los Ac Mo Leu 3a y Leu 2a identifican las mismas poblaciones, respectivamente que el OKT4 y OKT8.

El aislamiento de células T de acuerdo a los marcadores de superficie, es ciertamente útil, asignandose varias funciones a las poblaciones celulares que expresan un marcador dado. Sin embargo, según Moretta y cols, (1982), un problema mayor en la mayoría de éstos estudios es el hecho de que sólo un pequeño porcentaje de células

en una subpoblación dada puede actualmente estar directamente envuelta en la actividad funcional que estamos midiendo. De esta forma, la función precisa de células individuales no puede ser invariablemente extrapolada desde su fenotipo de superficie. Por ej: las células T, que miden actividad helper sobre la diferenciación celular B, han sido identificadas sobre la base de la expresión de receptores Fcm, antígenos OKT4 o Leu3. Si todas las células que expresan este fenotipo fueran efectivamente células helper, podría significar que las células que ayudan a la diferenciación celular B dependiente de PWM podría representar un gran porcentaje de células T periféricas (apróximadamente 60%). Esta frecuencia, sin embargo, no parece ser el caso desde que los experimentos de Corte y cols (1982) indican que las células con actividad helper pueden estar restringidas a una muy pequeña población de células T periféricas (15-20%). De hecho toda la actividad helper está presente y altamente enriquecida en una fracción celular T que reacciona con un anticuerpo monoclonal designado 5/9 (Moretta y cols 1982). Es evidente a partir de este ejemplo, que una mas precisa y exacta identificación de subpoblaciones funcionales T por el uso de los marcadores de superficie, en un futuro próximo disponibles,

podrían estar basados en el análisis combinado de un gran panel de tales marcadores, como es el caso ya descrito de los Ac Mo WT1 y 3A1.

Una más precisa correlación entre los marcadores de superficie y una actividad funcional dada de células T, podría realizarse posiblemente por el análisis de clonos de células T (Moretta y cols,1982). Estudios llevados a cabo por Möller (1980), indican que los clonos celulares T pueden ser generados bajo condiciones limitantes en sistemas de microcultivo, al que se le suministra una fuente apropiada de factor de crecimiento de células T (TGCF) también llamado interleukina 2 (IL-2). Es ahora posible, sin embargo, analizar los marcadores de superficie expresados por clonos de células T individuales expresando una función dada. Así, aunque los estudios que utilizan linfocitos de sangre humana (Reinhertz y cols, 1980), han mostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL) son OKT8 positivos, OKT4 negativos, el análisis fenotípico de los CTL a nivel clonal ha demostrado que hay una expresión heterogénea de fenotipo OKT entre diferentes poblaciones purificadas de CTL. Además, recientes análisis (Mengari y cols, - 1982) de clonos celulares T con actividad helper o supresora en la diferenciación celular B policlonalmente indu-

cida, ha evidenciado claramente la carencia de correlación entre actividad funcional de las células y expresión de antígenos OKT4 y OKT8.

4.3.3.- Marcadores expresados por células T activadas.

Un grupo de marcadores de superficie se expresa sólo en bajas proporciones o está virtualmente ausente en células T en reposo, pero los marcadores están claramente expresados en variadas proporciones en células T activadas. Ya en 1975, Ferrarini y Moretta y cols, observaron que entre estos marcadores, los receptores Fcg están presentes en una pequeña fracción de células T periféricas (células Tg). Sin embargo Moretta y cols, (1981) observaron que la proporción de células T con receptores Fcg se incrementa marcadamente en la activación celular. Se sabe que los antígenos Ia-like están expresados en una muy pequeña proporción (1-5%) de células T periféricas recien aisladas. De acuerdo a Greaves y cols, (1979), las células T Ia positivas están incluidas en la fracción celular Tg. Así, Yu y cols, (1980) ven que en la activación celular T, una notable proporción de células expresan antígenos Ia-like. Dentro de las poblaciones celulares activadas, sin embargo, las células Ia positivas no están restringidas a la fracción celular Fcg positivas. Cabe -

destacar que los receptores Fcg y antígenos Ia sean detectables en proporciones relativamente grandes de células T aloactivadas in vitro (siguiendo un cultivo mixto linfocitario) según Moretta y cols (1981) e in vivo en pacientes con rechazo contra injerto (Bacigalupo y cols, 1981).

Haynes y cols (1981) caracterizaron otro antígeno de superficie por el uso del anticuerpo monoclonal 4F2, el cual se une a una proteina de superficie no Ia de 120.000 dalton de Pm , presente en monocitos de sangre periférica en reposo, pero virtualmente ausente en las células T de sangre periférica en reposo. Sin embargo, también observaron que se expresa en una fracción de células T activadas por células alogénicas o mitógenos. Este mismo autor en 1981 obtuvo otro Ac Mo, el 5E9, que reconoce un antígeno de 90.000 dalton de Pm que similarmente al anterior, está presente sólo en 1-5% de células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo se une al 40-80% de células mononucleares activadas por mitógeno, y así pues, también puede ser usado para detectar activación celular. En vistas de la expresión de receptores Fcg, antígeno Ia y antígeno 4F2 sobre fracciones variables de células T aloactivadas, estos marcadores se han aplicado en un intento de identificar CTL específicos humanos. De esta forma se ha mostra-

do (Moretta y cols, 1981) que los CTl carecen de receptores Fcg detectables, pero expresan antígenos 4F2. Este fenotipo está presente en alrededor del 30% de células T que responden en el cultivo mixto linfocitario. Aunque los CTL específicos se pueden restringir a una relativa pequeña fracción de células T aloactivadas por esta vía, podría subrayarse que la frecuencia actual de CTL dentro de esta subpoblación está por ser definida.

Los antígenos de superficie que han sido descritos están exclusivamente presentes en células T activadas. En este sentido Corte y cols (1981) han seleccionado un grupo de cuatro anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a distintas fracciones de células T activadas, mientras que no se unen a otros tipos celulares circulantes. Las capacidades funcionales de las poblaciones celulares T activadas que expresan estos antígenos no han sido hasta aquí bien definidos.

Otros estudios persiguiendo este objetivo están siendo llevados a cabo recientemente. Así, se sabe, que aunque la activación celular T in vitro, puede ser iniciada por ciertos antígenos y mitógenos, Ruscetti y cols, (1981) encuentran que la proliferación de células T humanas es aparentemente dependiente de una glicoproteina de 15.000 dalton de Pm designada "factor de crecimiento de células

T" o Interleukina 2 (IL-2), producida por las mismas células T. De una forma similar a otros péptidos hormonales, - la IL-2 actúa a través de sus uniones a receptores específicos de membrana, nuevamente sintetizados y expresados en células T (Robb y cols, 1981). Uchiyama y cols, (1981) produjeron un anticuerpo monoclonal (anti Tac) que reacciona con células T humanas activadas y funcionalmente maduras. Mas adelante Leonard y cols, (1982) sugieren que el anticuerpo (anti Tac) puede reconocer el receptor para la IL-2 - en células T, o estructuras íntimamente relacionadas con - él. De esta forma, Robb y Greene, (1983) han demostrado que la identificación de la estructura celular que se une a la IL-2 aparece en células T humanas activadas. Aunque la respuesta inmune mediada por IL-2 se considera que ocurre in vivo, el antígeno Tac está normalmente ausente en células T circulantes de individuos sanos y enfermos. a excepción de pacientes con sindrome proliferativo celular T, asociado con un retrovirus tipo C, llamado leucemia celular T/linfoma virus, según Broder y cols (1984). No obstante según Yachie y cols, (1983), la expresión de antígeno Tac está - presente en células T circulantes aunque sólo débil y transitoriamente.

4.3.4.- Marcadores de diferenciación celular T.

La inmunofisiología tímica, ha sido estudiada extensivamente en modelos animales y con menos extensidad en humanos, no obstante, se dispone actualmente de una amplia información acerca de los aspectos y etapas de diferenciación timocítica humana.

Estudios en roedores y humanos, han demostrado que los timocitos se originan de células precursoras de médula ósea, las cuales migran hacia el timo; y que el 90% de los timocitos se encuentran en el cortex, mientras que el restante 10% están en la médula tímica (Stutman, 1977).

Reinhertz y Schlossman, (1980), usaron un grupo de Ac Mo en un intento de definir de forma precisa diferentes etapas o estadíos de maduración celular T. Teniendo en cuenta los patrones de especifícidad de estos anticuerpos, junto con la distribución intratímica que estos expresan, y el fenotipo de células malignas de LLA, han descrito tres estadíos de maduración celular T:

Estadío I, representado por células inmaduras que reaccionan con dos Ac Mo llamados OKT9 y OKT10 respectivamente; el primero reconoce a las células con el receptor de la transferrina humana, y el segundo reconoce un antígeno activado de células pluripotenciales (Stem Cells)

timocitos y células plasmáticas.

Estadío II, representado por la pérdida del antígeno OKT9, con el mantenimiento del OKT10, y la adquisición de otros antígenos que se unen; OKT6, OKT4 y OKT5/8 respectivamente; el OKT6 reconoce timocitos y células de Langerhans (Mc Milan y cols, 1983); los demás ya se han mencionado.

Estadío III, representado por la pérdida del antígeno OKT6, la adquisición del antígeno OKT3, y la segregación en subpoblaciones celulares OKT4 y OKT5/8 positivas.

En un principio, este esquema, resultó altamente atractivo y potencialmente muy útil, especialmente en cuanto a células T malignas; pero pronto se vio, que los antígenos específicos de estadío, así llamados, pueden bajo ciertas circunstancias, ser expresados en otras etapas de activación y/o diferenciación, y que como después se ha visto, todos estos antígenos no son específicos de células T.

Mas recientemente, en una revisión de Thiel y cols, (1984), se estableció el mismo tipo de estadíos madurativos, pero con algunas diferencias:

Estadio I.- Gailili y cols, (1982), observaron que los timocitos corticales se componen de una población de timocitos pequeños, rosetas E (+), y una población menor, a nivel subcapsular, de grandes timocitos rosetas E (-),

que se dividen rápidamente. Estas últimas, están consideradas como células precursoras tímicas, y han sido designadas "protimocitos". Puede haber una correlación entre ellos y el estadío I de timocitos descrito por Reinhertz y Schlossman, (1980), ya que expresan OKT9 y OKT10. Sorprendentemente el antígeno CALLA ha sido recientemente demostrado en algunos grupos de timocitos subcapsulares (Hoffman-Fezer y cols, 1983), pero la expresión simultánea de antígenos de diferenciación T en estas células, no ha sido aún bien determinada.

El estadío II de diferenciación, comprende timocitos que se encuentran primariamente en el cortex tímico, expresan el receptor E, y reaccionan con OKT11. Aún mejor reaccionan con el antígeno timocítico humano (HTA1), reconocido por los Ac Mo NA1/34 y OKT6. Algunos timocitos comunes, simultáneamente exhiben antígenos OKT4, 5 y 8. También aparecen en esta etapa los antígenos OKT11 y Leu-1. Además la formación de rosetas con hematies de conejo, caracteriza la etapa transicional de timocito común a timocito maduro, mostrado por análisis con Ac Mo con doble marcador (Munker y cols, 1983).

El estadío III de timocitos maduros, está representado por células en la médula tímica. Ellos adquieren los -

antígenos HLA-ABC (Bhan y cols, 1980) y OKT3; pierden el HTA1, y recíprocamente expresan OKT4 y OKT5/8.

A nivel extratímico, las células OKT4 (+), OKT5/8 (-) predominan en sangre periférica, amigdalas y ganglios linfáticos (paracortex), y en la lámina propia intestinal (Janossy y cols, 1980). En contraste las células OKT4 (-) OKT5/8 (+) predominan en médula ósea normal y epitelio - intestinal. además, este mismo autor ha encontrado, sobre todo a nivel amigdalar, una íntima asociación entre las células T OKT4 (+), OKT5/8 (-) y células interdigitantes CID y macrófagos tisulares Ia (+). Los datos recogidos - sobre la distribución tisular de subpoblaciones celulares T son particularmente complejos e implican que varias subpoblaciones de células T pueden tener diferentes funciones inmunológicas in vivo (Thiel, 1984).

Por último, otros dos antígenos identificados por - Ac Mo, se incluyen en este apartado, por estar considerados que tienen relación con la diferenciación celular T, aunque esta relación no esté bien esclarecida:

Así, el potencial diagnostico del Ac Mo 5E9 puede - ser reconocido por el hecho de que sólo del 1-5% de células mononucleares de sangre periférica, expresan este antígeno. Sin embargo, éste, se encuentra en células huma-

nas normales y malignas en división rápida, incluyendo todas las líneas celulares buscadas, hematopoyéticas y no - hematopoyéticas (Haynes y cols, 1981).

El Ac Mo WT1 ya citado, se considera otro marcador que reacciona con blastos de LLA-T tanto formadores de rosetas E, como no formadores. Este Ac parece tener actividad inmunosupresora, y puede tener uso clínico como un agente inmunosupresor según Tax y cols, (1984).

En la siguiente tabla, se exponen los principales fenotipos de la diferenciación celular T:

| Tipo celular | Localización | OKT1( | OKT6 NA1/34 | OKT3 | OKT4 | OKT8 | Leu-1 | OKT11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Protimocito | Timo subcapsular | + | - | - | - | - | + | - |
| Timocito común inmaduro | Cortex tímico | + | + | - | + | + | + | + |
| Timocito maduro | Médula tímica | + | - | + | + | + | + | + |
| Célula T madura | Compartimentos periféricos | - | - | + | +/- | +/- | + | + |

4.4.- MARCADORES DE SUPERFICIE DE CELULAS NULAS; NO T, NO B

Las células mononucleares que no pueden ser identificadas como linfocitos T o B o monocitos, se consideran de un 5 a 20%. Estas células nulas constituyen mas bien una población heterogénea que incluye distintos tipos celulares. De esta manera, células inmaduras T y B que no han adquirido aún receptores E o IgS, respectivamente, están presentes en la fracción de células nulas. Las células T inmaduras pueden ser tentativamente identificadas por la presencia de antígenos específicos de linaje reconocidos por antisueros adecuadamente preparados y absorvidos (Ades y cols, 1979). Del mismo modo que células B inmaduras se distinguen por la presencia de una combinación de marcadores de superficie que incluyen receptores para hematies de ratón, receptores de complemento, receptores de Fc y antígenos Ia, la detección de inmunoglobulinas intracitoplasmáticas (como en el caso de células Pre-B o células plasmáticas) indica claramente el origen celular B de ciertas células nulas o también aquellas otras que siendo de la línea celular B, sólo expresan la TdT (Desoxinucleotidil transferasa terminal).

La mayoría de células nulas, sin embargo, están representadas por células con receptores para Fcg. Estas células forman rosetas con hematies humanos del grupo O positivo cu

biertos con anticuerpo anti CD, (Froland y cols, 1974). Debido a su receptor para Fcg, estas células unen moléculas IgG séricas, que rápidamente se pierden en la incubación in vitro (Winchester y cols, 1975). Debido a sus determinantes IgG de superficie "lábiles", estas células han sido llamadas por Haynes y cols, (1981) "células L". También se les ha referido frecuentemente como "la tercera población celular". Estas incluyen la mayoría de células circulantes capaces de mediatizar en las actividades ADCC o NK (Perlman y cols, 1976). Una fracción notable de células de la tercera población puede formar rosetas E cuando se tratan con neuraminidasa (Moretta y cols, 1982). De esta manera es posible que al menos una fracción de estas células tengan algunas similitudes con las células T Fcg positivas (células Tg) como veremos mas adelante. Cabe señalar que estudios morfológicos y citoquímicos (Ferrarini, 1980) han mostrado que la mayoría de poblaciones (células nulas y células Tg) tienen las características de células grandes granulares LGL. Similares estudios (Timonen y cols, 1979) han demostrado que, aunque la mayoría de las células Tg se componen de células con el fenotipo de grandes células granulares LGL, ellas también contienen otros tipos celulares adicionales.

En 1981 Abot y cols, producen un Ac Mo llamado , HNK-1, que mas tarde ellos mismos lo denominaron Leu-7 que identifica las células "Natural Killer" (NK) y células (K) o células asesinas dependientes de Ac, encontrando que la mayoría de células Leu-7 positivas tienen el receptor para Fcg, y tras eliminar las células positivas de éste, un 6% presentan el receptor de la formación de rosetas E. Posteriormente, estos mismos autores (1982) en la caracterización de este Ac Mo, encuentran dos fenotipos distintos de células NK con diferentes capacidades citotóxidas medidas in vitro: una con gran actividad NK de fenotipo Leu-7 (+), OKM1 (-) y OKT3 (+); y la otra fracción apenas sin actividad citotóxica y de fenotipo Leu-7 (+), OKM1 (+) y OKT3 (-) sugiriendo que estas fracciones representen distintas etapas madurativas de células NK. De hecho estos mismos autores señalaron que el Ac Mo OKM1 que reacciona con células nulas y monocitos (Beard y cols, 1980), lo hace con el 60% de células Leu-7 positivas. Mas tarde Lusheng Si y cols, (1983) encuentran que el Leu-7 reacciona con linfocitos grandes granulares LGL que contenían la mayoría de actividad NK de sangre periférica. Por estudio de doble marcador encuentran dos poblaciones de células Leu-7 (+) -

en tejidos linfoides: una que expresa antígenos Ia-like y otra que no los expresa. Asímismo observan que aunque el anti-Leu-7 no reconoce todas las subpoblaciones de células NK y puede reaccionar con algunas células Leu-2 positivas con receptor Fcg, representa un reactivo potencialmente útil para la caracterización de los LGL.

Recientemente, en nuestro laboratorio Lopez Nevot y cols (sometido a publicación) han producido un Ac Mo que identifica un antígeno constituido por dos moléculas de 59 y 53 Kd que representa el Fc R2 (receptor para el Fc de la IgG), expresado en células NK y polimorfonucleares.

## 4.5.- MARCADORES ENZIMATICOS

Los marcadores enzimáticos, aún no han suministrado un papel tan útil, como los marcadores inmunológicos en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias. Estudios citoquímicos de las clases de células hematopoyéticas, - han demostrado diferentes, aunque no únicas, distribuciones celulares de un grupo de enzimas. Estudios usando tecnicas bioquimicas, sugieren que la total actividad especifica de enzimas, también difieren entre las clases inmunológicas de células (Blat y cols, 1980). Las enzimas mas estudiadas son: Deoxinucleotidil Terminal Transferasa — (TdT), 5-Nucleotidasa (5`-N), Adenosida Deaminasa (ADA) y las isoenzimas de la Hexosaminidasa.

Deoxinucleotidil Terminal Transferasa (TdT).- Es una - enzima polimerizante, que siendo diferente a otras DNA polimerasas, cataliza la adición del deoxiribonucleótido — trifosfato al grupo final 3`OH de los primeros poli o deoxiribonucleótidos. Se encuentra en timocitos y en un porcentaje pequeño de células de médula ósea, pero no en linfocitos maduros. Se ha visto su actividad incrementada en la mayoría de células blásticas de LLA, en linfomas de tipo celular inmaduro y en crisis blástica de la LMC. Recientemente Kenneth y cols (1985) han encontrado una pequeña proporción de células TdT (↓) en sangre periférica de su-

jetos normales, sugiriendo que esta población son timocitos corticales inmaduros que han salido a la sangre, aún- que creen que los protimocitos derivados de médula ósea - que aún no han adquirido marcadores de línea celular T pue- dan estar incluidos en esta subpoblación, ya que sólo en- cuentran la expresión de antígenos relacionados con célu- las B, en algunas células TdT (-), y por el contrario, no encuentran en estas células, ningún antígeno de diferencia- ción celular T, lo cual indica fácilmente la existencia - de una heterogéneidad de linaje entre esta población de - células TdT (+).

5`-Nucleotidasa.- Esta enzima del metabolismo de la purina, está confinada en la membrana superficial, con su centro activo frente al espacio extracelular, y está cla- sificada por lo tanto como una ectoenzima. Cataliza la de- fosforización de 5`-nucleótidos, para producir, los nucleó- sidos correspondientes. Está expresada en muchos tejidos - humanos, pero sólo en algunos linfocitos T y B en etapas tempranas de diferenciación, aunque recientemente se ha - encontrado en mayor cantidad en células B periféricas que en células T (Thompson y cols, 1979).

Adenosina Deaminasa ADA.- Es una enzima que convier- te de forma irreversible la adenosina en inosina, y la de-

oxiadenosina en deoxinosina. Es esencial para la diferenciación de células linfoides, particularmente de células T. La actividad ADA, refleja el origen celular B o T de una población celular y su grado de maduración. Los niveles ADA son mas altos en timocitos que en células T maduras sin estimular, las cuales, tienen a su vez mayor actividad que las células B periféricas (Tung y cols,1976).

Enzimas lisosómicos:

Hexosaminidasa.- Es una de las hidrolasas ácidas lisosomiales y se presenta como tres isoenzimas (A, I, oB) que tienen perfiles caracteristicos en granulocitos, linfocitos y timocitos.

Fosfatasa ácida.- Identificada por la reacción que lleva su nombre, ésta, puede ser positiva en células de linaje T, incluyendo linfoblastos T, linfocitos normales transformados por la fitohemaglutinina (PHA), células de Sézary , en linfocitos atípicos de pacientes con mononucleósis infecciosa, así como en áreas celulares T de bazo y nódulos linfáticos. (Catovsky y cols, 1978).

Acido Alfa-Naftil Esterasa (ANAE).- Está presente en células T maduras y en linfoblastos T de LLA (Huhn y cols 1980), aúnque ha sido cuestionada su positividad específica para la línea celular T. También se presenta en algu-

nos casos de LLA Común y en monocitos según el autor citado.

En la siguiente Tabla, se resumen los distintos marcadores de células hematopoyéticas, según Thiel y cols, - (1984).

| Tipos de marcadores | Especificidad selectiva para[a] | Reacciones cruzadas con[b] |
|---|---|---|
| 1 Marcadores inmunológicos | | |
| Inmunoglobulinas (IgS,IgC) | B, Pre B, P | Absorción pasiva |
| Ag celulares B | B | M, especificidad variable |
| Rosetas E de ratón | Subpoblación B | - |
| Ag Ia-like | B y cel prec hem | Subp T y T activados |
| Rosetas E de carnero | T | Afectación por artefactos |
| Ag celulares T | T | Especificidad variable |
| Ag mielomonocíticos | G, M | Reacciones variables con G, M |
| Glicoforina A | E | - |
| Ag CALLA | L precóces | - |
| 2 Marcadores enzimáticos | | |
| TdT | L precóces | Algunos prec miel inmaduros |
| 5`-Nucleótidasa (5`-N) | L precóces B | Selectiva sólo por actividad |
| ANAE | M | - |
| Adenosina Deaminasa (ADA) | T | Selectiva sólo por actividad |
| Fosfatasa Acida | Blastos T | G, P |

a= B, linfocitos B; T, linfocitos T; P, células plasmáticas; M, monocitos macrófagos; L, linfocitos; G, granulocitos; E, eritrocitos; Cel Prec Hem, células precursoras hematopoyéticas.

b = vease texto

## 5.-COMPONENTES CELULARES: ARQUITECTURA DE LA AMIGDALA

### 5.1.- Estudios citológicos cuantitativos y comparativos.

Hasta 1975 en que se introdu[illegible]a tecnología del hibridoma (Köehler y Milstein) para la producción de anticuerpos monoclonales, los estudios sobre el contenido celular de órganos linfoides en el hombre eran relativamente escasos (Franklin y cols, 1972; Yata y cols, 1973; — Piffko y cols, 1970; Tabata y cols, 1974; Holowieki y — cols, 1975; Müeller Hermelink y cols, 1974; Morag y cols 1975; Rabellino y cols, 1971; etc) en comparación con la literatura disponible sobre órganos linfoides animales - (Nossal y cols, 1968; Tada y cols, 1970; Leene y cols, 1971; Van Ewijk y cols, 1974; Nieuwenhuis y Keuning, 1974 ; etc). Debido a los diferentes métodos de aislamiento, modificaciones de los test, métodos de evaluación y grupos distintos de pacientes, los resultados eran muy variados. Por ejemplo, para la población celular T, oscilaban entre 21 y 74%, lo cual hacía imposible la comparación de unos a otros.

Todos los autores están de acuerdo en que la carencia de controles apropiados es la principal dificultad - en el estudio de la amigdala humana. No obstante, los estudios referidos a la amigdala humana mas significativos

son los llevados a cabo con microscopía electrónica por Franklin y cols, (1972), quienes encuentran que la población celular de amigdalas humanas normales se compone de 80-90% de células linfoides en diferentes etapas de desarrollo, células plasmáticas 5-20%, y un pequeño número de monocitos y leucocitos polimorfonucleares. Piffko y cols, (1970) señalaron que la amigdala contiene $1 \times 10^9$ células linfáticas; estas constituyen apróximadamente un o,2% de todos los linfocitos en el adulto. Rabellino y cols, (1971) junto con otros autores identificaron en amigdala dos poblaciones linfoides: linfocitos B, derivados de médula ósea (Bursa equivalentes) o timo independientes, y linfocitos T o timodependientes. Se sabe por los estudios de ME que las células B de amigdala tienen un diámetro de 4-8 micras, son generalmente esféricas con numerosas microvellosidades en la superficie. Los linfocitos T son también esféricos, y algo mas pequeños, tienen un diámetro de 3-5 micras, generalmente su superficie es lisa, con alguna microvellosidad.

Aúnque la relación de linfocitos B a T puede variar en las amigdalas de un caso individual a otro, los estudios llevados a cabo por Morag y cols, (1975) en amigdalas de niños, sugieren que apróximadamente los linfoci-

tos T oscilan del 14-47%, siendo el resto células B. - Hurtado y cols, (1974) encuentran 30-40% de linfocitos T.

A partir del desarrollo de la tecnología del hibridoma, han sido muchos los estudios practicados, tanto a nivel celular como histológico, con diferentes métodos, pero casi siempre con la ayuda de los anticuerpos monoclonales.

Siegel, (1978) utilizando gradientes de densidad discontínuo de Percoll, encuentra los siguientes tipos celulares: linfocitos pequeños (45%), centrocitos (35%), centroblastos (15%) y células plasmáticas (2,5%). Refiere que los centrocitos y centroblastos son células centrogerminales y representan etapas intermedias y -- transitorias de proliferación celular. Según todos los autores consultados (Alexopoulos y cols, 1976; Gergely y cols, 1976; Sesterhenn y cols, 1977; etc) los linfocitos amigdalares difieren en la composición celular, respecto a sangre periférica, de tal forma que las relaciones de linfocitos totales T y B de amigdala son mas bajas y mas altas respectivamente que aquellos de sangre periférica. También se ha mostrado (Gupta y -- cols, 1978) que la relación de la fracción celular Tg

de amigdala respecto al total de células T amigdalares es mas baja que la misma relación en sangre periférica y que la proporción de células T en amigdalas se incrementa con la edad (Siegel, 1978).

Sugiyama y cols, (1982) separa con gradientes de densidad discontínuo de Percoll tres poblaciones celulares en amigdala de acuerdo con su densidad:

1) Fracción III de alta densidad, compuesta de pequeños linfocitos siendo la fracción mas grande, en amigdalas de adultos que de niños.

2) Fracción I de baja densidad, compuesta de linfocitos de pequeño, mediano y gran tamaño, y células adherentes. Los números absolutos y relativos fueron mas altos en las amigdalas hiperplásicas de niños.

3) Fracción II, células intermedias de tamaño, con mayor número en niños que en adultos.

Por lo tanto, según este autor, el número absoluto de linfocitos amigdalares, fue mas alto en niños que en adultos.

Este mismo autor (Sugiyama y cols, 1983), caracteriz los linfocitos T y células NK de amigdala y sangre periférica de niños y de adultos, con anticuerpos monoclonales, utilizando el FACS (clasificador de célu

las activadas por fluorescencia), que le permite medir al mismo tiempo, intensidades de fluorescencia, encontrando los siguientes hallazgos:

a) La proporción de células que reaccionan con los Ac Mo Leu-1, 3a y 4 es mas baja en amigdalas - que en las células T de sangre periférica.

b) El número de células que reaccionan con los Ac Leu 2a y 7, es todavía mas bajo.

c) La intensidad de fluorescencia de los linfocitos amigdalares que reaccionan con los Ac Mo Leu-1, 2a y 4 es mas baja que la de los linfocitos de sangre periférica.

d) Los linfocitos amigdalares del adulto, tienen unas proporciones mas altas de células que reaccionan con los Ac Mo Leu-1, 2a, 3a, 4 y 7 que los linfocitos amigdalares del niño, y la intensidad de fluorescencia de las células que reaccionan con estos Ac Mo anti-Leu, tiendan a ser mas alta en los linfocitos amigdalares del adulto, lo cual corrobora los hallazgos de otros autores ya referidos.

Prussek y cols, (1983) determinan en amigdalas de 50 niños de ambos sexos de 5-15 años de edad; intervenidos por razones laringológicas o pediátricas:

- La proporción de linfocitos T y B de las amigdalas extraidas.
- Las diferencias en las interrelaciones entre linfocitos T y B aislados de sangre periférica de niños con amigdalitis crónica comparándolas con las de niños sanos.
- Los efectos de la amigdalectomía en las poblaciones T y B de sangre periférica.

Aúnque los métodos para la identificación de linfocitos T y B fueron simples: Para los T sólo la determinación de linfocitos formadores de rosetas E (método de Basch), y los linfocitos B por inmunofluorescencia directa utilizando antisueros contra IgG, IgA e IgM; observan que la inflamación crónica de las amigdalas conduce a cambios en la proporción de linfocitos T y B en sangre periférica, que consisten en un incremento de linfocitos B y una disminución de linfocitos T; que la amigdalectomía conduce a casi una normalización completa de linfocitos T y B en sangre periférica, por lo que concluyen, que los cambios en la proporción de linfoci-

tos T y B en sangre periférica, pueden ser tomados en consideración como un elemento adicional en las recomendaciones para la amigdalectomía.

5.2.- Bases estructurales.

La estructura anatómica de la amigdala, en general ya ha sido descrita, señalaremos aquí sólo sus aspectos mas importantes y recientes relacionados con su función.

En relación a su función linfática, la amigdala tiene solo vasos linfáticos eferentes. Sabemos que el órgano, está surcado con un sistema extensivo de criptas, que dan una superficie interna muy amplia; con dos tipos de epitelio ya referido:

- Escamoso estratificado y
- Reticulado en la profundidad de las criptas.

Maeda y cols, (1984) han descrito en el epitelio reticulado tres tipos de microcriptas, imbricadas entre las células epiteliales ordinarias, con microestrías o surcos y "células epiteliales especializadas:

Tipo I, microcriptas abiertas entre los espacios intercelulares de las células epiteliales. En los microporos se observan células libres.

Tipo II, microcriptas abiertas cerca del centro de una célula epitelial críptica.

Tipo III, microcriptas que están entre las células epiteliales ordinarias con microsurcos y tapones de células epiteliales especializadas.

Esta estructura, permite que los antígenos sean incorporados, y puestos en contacto con el tejido linfático a través de un sistema túbulo-vesicular existente en las células epiteliales especializadas (así llamadas por Maeda y cols, 1984) o células M (así llamadas por Owen y Nemanic, 1978) y en el epitelio escamoso estratificado (Surjan, 1980; Maeda y cols, 1984).

Presumiblemente las células interdigitantes CID y foliculares dendríticas CFD del retículo están envueltas en el procesado y transporte de antíge[illegible] CID, dependientes de las áreas celulares T, reaccionan con anticuerpos HLA-DR y BA1, aúnque algunas células grandes interdigitantes son OKT6 positivas y probablemente sean, como ya se ha dicho, células de Langerhans. Las CFD reaccionan con el antisuero CR1, y con los Ac Mo HLA-DR, BA2 y alfa HM1 (Vander Valk y cols, 1984). Heynen y cols, (1984) las lograron aislar de los folículos y caracterizarlas inmunocitoquimicamente, encon

de las CFD), encontrándose la mayor actividad mitótica sobre el lado contrario al epitelio críptico (zona obscura) donde se encuentran el mayor número de macrófagos (Sprekelsen, 1975; Siegel, 1978; Antoni y cols, 1980). En este sentido, esto está corroborado también por estudios recientes sobre expresión fenotípica de linfocitos B (Hsu y cols, 1984) que muestran, que la mayoría de células positivas para IgM e IgE de superficie (células inmaduras-centroblastos), se encuentran en la zona obscura del centro germinal (CG); mientras que las células positivas para IgM e IgG citoplasmáticas están en la zona clara (células mas maduras-centrocitos). - También refieren que existen en amigdalas un considerable número de centros germinales sin inmunoglobulinas identificables. Estos resultados están en conjunción - con estudios previos de activación celular B in vitro e in vivo (Harris y cols, 1982; Hsu y cols, 1983), los cuales indican que los centroblastos (zona obscura) se forman durante etapas tempranas de diferenciación celular B, y pasan a transformarse posteriormente en centrocitos (zona clara).

El folículo está inmerso y rodeado por una red de células dendríticas las cuales aumentan en densidad en

trando, a parte de los antígenos ya citados, IgM, IgG, e IgA (pero no IgD) retenidas sobre su superficie por los receptores C3b y Fc, así como un antígeno asociado a estas células, detectado por el Ac Mo R4/23, descrito por Nacem y cols, (1983).

Las CFD unen complejos inmunes y juegan su papel en la presentación de antígenos a las células B foliculares, intimamente asociadas y en la generación de células B memoria (Heynen y cols, 1984). Otros autores como Simar y cols, (1984) sugieren que las CFD crean un microambiente favorable para la proliferación y diferenciación de células B durante la respuesta humoral.

La membrana basal está fenestrada en el área del epitelio reticular (Siegel, 1983). Debajo de la membrana basal está la zona subepitelial, donde los folículos linfoides están embebidos en el tejido perinodular, inmediatamente adyacente al epitelio reticulado. Los folículos linfoides con su estructura polar, y su corona linfocitaria compuesta en su mayoría de pequeños linfocitos; que su parte mas gruesa la dispone -- frente a la crípta, pudiendo extenderse en el epitelio reticulado. Dentro de los folículos, pueden observarse centrocitos, centroblastos y macrófagos (aparte

en la dirección de la capa linfocitaria.

El aporte vascular del folículo se efectúa por arteriolas formando una malla de capilares arteriales en el centro germinal. En combinación con las CFD, las cuales, como se ha dicho, muy probablemente funcionan como "áreas de tráfico", las arteriolas capilares tienen gran significado para la recirculación de células B (Siegel, 1983).

El tejido perinodular o interfolicular, se compone como sabemos, de pequeños linfocitos y CID, con vénulas postcapilares interpuestas. Las anastomosis arteriovenosas inducen un lento descenso de la circulación sanguinea en las vénulas postcapilares, y facilitan el paso de linfocitos, procedentes del sistema circulatorio a través de los orificios que dejan las grandes células endoteliales, hacia el tejido linfático. Las células plasmáticas se observan en la región subepitelial, en el tejido perinodular y en el epitelio reticulado. Los mastocitos aparecen en el tejido perinodular, así como en el tejido conectivo.

En los últimos 10 años con los estudios realizados, se puede considerar que la amigdala muestra una estructura departamental inmunológica. Por antisueros marca--

dos con fluoresceína, aplicación de métodos histoquimicos y tejidos etiquetados con particulas marcadas apropiadamente, se ha demostrado en cortes amigdalares con criostato, que las células B y T de la amigdala muestran una distribución característica. Las células B, están localizadas en los folículos linfoides, y los linfocitos T son las células del tejido perinodular (Lamelin y cols, 1978; Leprini y cols, 1979; Siegel, 1979; Yamanaca y cols, 1983; etc). Similar distribución se ha observado en nódulos linfáticos (Poppema y cols, 1981).

Con la ayuda de los anticuerpos monoclonales, se ha podido demostrar que las células T del tejido perinodular, son en su mayor parte células helper (OKT4 positivas), principalmente concentradas cerca de las CID, y en la zona del epitelio reticular. También aparecen, pero en menor cantidad, en la zona del manto o capa linfocitaria así como en el centro germinal, pero aquí aún en menor concentración. Celulas T supresoras-citotóxicas (OKT5-OKT8 positivas) también se encuentran en menor cantidad en las áreas interfoliculares (lejos de las CID), epitelio reticulado y zona del manto, y muy raramente se observan en el centro germinal.

## 6.- FISIOLOGIA DE LA AMIGDALA

Hasta la actualidad, la función de la amigdala palatina, está aún sujeta a un gran debate y especulación. Ello, está ahora puesto en primicia, exactamente cien - años después de la primera hipótesis científica sobre - la función de la amigdala.

En 1.882, Stöhr describió el epitelio amigdalar y postuló la migración de linfocitos a su través. A esta, siguieron otras teorías, que aúnque generalmente reco-- nocidas, no ganaron aceptación. La función amigdalar es- taba hasta ahora fuera de nuestra comprensión, a pesar de contar comparativamente a otros órganos, de una descripción exacata; anatómica e histológica. Esto se debe al desarrollo relativamente tardío del estudio de la in- munología y biología de los linfocitos; avances mayores que no habían sido realizados tempranamente, mas que en los últimos 25 años.

### 6.1.- Capacidad funcional a nivel celular, y su signifi- cación biológica.

Ya hemos hablado de los componentes celulares a ni- vel de la amigdala. Sabemos que los centrocitos y cen-- troblastos, son células centrogerminales y representan etapas intermedias y transitorias de proliferación celu- lar. Las células plasmáticas desarrolladas a partir de

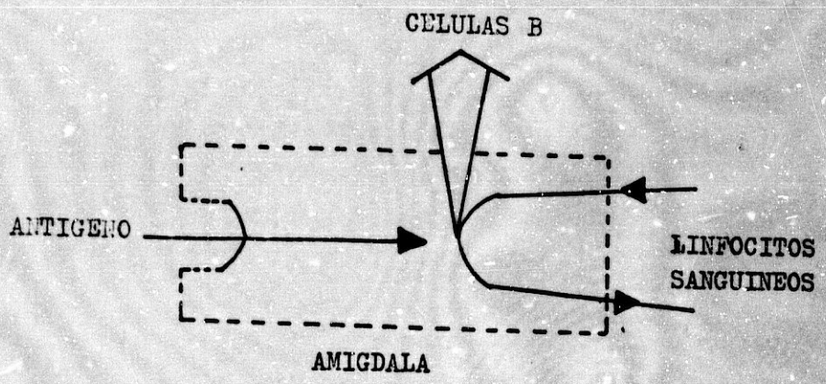
linfocitos, producen inmunoglobulinas.

La proliferación de células tiene lugar en los centros germinales. En cortes histológicos, Sprekelsen (1975) mostró autoradiográficamente que la timidina tritiada "(H3) TdR" se incorpora predominantemente en los centros germinales. Siegel, (1979) aisla las fracciones celulares T y B de una suspensión celular amigdalar y determina la incorporación de $C^{14}$ TdR en las fracciones aisladas, y observa que la incorporación tiene lugar casi exclusivamente en la fracción celular B. Antoni y Staub,(1980) encontraron similares resultados. La proporción de células proliferantes dentro de la población celular B, puede ser determinada autoradiográficamente. El índice de marcaje es de 0,10 a 0,15 en la amigdala del niño, y decrece con el crecimiento (Siegel y cols, 1982).

Todos los autores consultados, están de acuerdo que en la amigdala, la proliferación de linfocitos es inducida por contacto con antígenos o activadores policlonales respectivamente. Los activadores policlonales, son polisacáridos y lipopolisacáridos procedentes de membranas de bacterias, virus, levaduras y lecitinas. Sus efectos sobre células amigdalares fueron estudiados

por Janossy y Greaves, (1975).

Siegel, (1983) considera la generación de células B en los centros germinales de la amigdala como una de las funciones mas esenciales de la amigdala. La fig subyacente, muestra una representación esquemática de las funciones amigdalares (tomada de Siegel, 1983).




La amigdala establece el contacto entre antigenos exógenos y activadores policlonales con linfocitos sanguineos. Como consecuencia de esta reacción habrá una reproducción de poblaciones celulares B. Estas concepciones de Siegel, son la extensión del concepto presentado por Surjan y cols, (1972). La función de las células B generadas, aún no está esclarecida. Ellas, pueden ser precursoras de células plasmáticas migradoras desde los folículos a los tejidos circundantes. Vessiere-Louveaux y cols, (1980), por localización de las combinaciones isotípicas de las cadenas H en los linfocitos pequeños de la amigdala, identificaron diferentes esta-

díos de maduración de la diferenciación en células memoria. Las células B de la amigdala, pueden también ser precursoras del sistema inmunológico secretorio del tracto aerodigestivo superior (Ogra y Morag, 1975; Kosrud y cols, 1981). La suerte de las células B fuera de las amigdalas, es desconocida. Sólo las células T, son detectadas por Crocker, (1981) en los vasos linfáticos aferentes de los órganos linfoides en pacientes adultos. La causa de la proliferación selectiva de células B, no ha sido establecida tampoco aún. Muy probablemente, el sistema de resorción de antígenos en el epitelio críptico y la estructura departamental del tejido, evita la activación celular T en gran cantidad. Por el contrario, la tolerancia de las células T, debe ser asumida. La significación biológica del bajo número de células T activadas, es otro problema inresuelto.

Los estudios de Oosterom y cols, (1981) indican que la maduración celular T, es debida a un factor epitelial amigdalar, análogo al encontrado en el timo, confirmando los estudios previos de Harrison, (1970 y 1972) sobre trasplante de tejido amigdalar a animales neonatales timectomizados, cuyos efectos eran similares al de aquellos otros animales a los que se les trasplantaba -

el timo. Además, la sensibilización antigénica de células T en la amigdala, se ha postulado por Curran y Jones, (1977). Sin embargo no existen datos experimentales en la literatura que apoyen esta afirmación. Además otras observaciones sistemáticas, como la ausencia de una transferasa terminal (TdT) en las células amigdalares así como la baja incorporación de H3 TdR en las células T (Linse y Siegel, 1982), hablan en contra de una contribución sustancial del órgano a la diferenciación de células T. La presencia de células T helper y supresoras en la amigdala, ya ha sido referida así como sus relaciones cuantitativas respecto a sangre periférica. Aquí, cabe resaltar un estudio reciente de Takenaka y cols, (1984) sobre los efectos de estas dos subpoblaciones T amigdalares en la respuesta proliferativa linfocitica antígeno-específica, los cuales son cuantitativamente diferentes a los de sangre periférica. Esto implica para estos autores, que existen diferentes subpoblaciones de linfocitos en las amigdalas respecto de sangre periférica, o que existe una diferencia en la maduración celular entre ambas. Las actividades NK son escasas en amigdala, aúnque según Yamanaka y cols, (1984), éstas tienden a incrementarse con la edad del in-

dividuo. Sin embargo, las cuestiones planteadas con la función de las células T en amigdala, dejan la puerta abierta a ensayos mas austeros.

6.2.- Capacidad funcional a nivel molécular y su significación biológica.

La producción de inmunoglobulinas o Ac específicos por linfocitos amigdalares, es mantenida por muchos autores (Brandzaeg y cols, 1979; Gitlin y Sasaki, 1969; Cavazzani y Zampieri, 1978; etc). Además se puede hacer mención de la producción de un gran número de proteinas relevantes inmunológicamente: Interferón (Sugiyama y cols, 1976), linfoquinas (Kuritani y cols, 1980; Rutengerg y cols, 1979), componentes del complemento, - lisozima (Crocker, 1981), factor de transferencia y factor tímico (Oosterom y cols, 1981). En principio, la — producción de moduladores inmunológicos se ha observado siempre que se ha buscado.

Siegel y Wilke, (1976); Cavazzani y Zampieri,(1978); demostraron que las inmunoglobulinas están acumuladas - en la amigdala, y consideran ésta como un lugar acumulativo y generativo de numerosas proteinas inmunológicamente relevantes. Las inmunoglobulinas, son hasta aquí, los componentes mas intensamente investigados, los cuales en

su función biológica, pueden estar un poco sobrevalorados; pero junto con otros mediadores, ellas forman parte del mecanismo defensivo intraamigdalar (Siegel,1983). Según este autor, este mecanismo sirve para el equilibrio inmunológico entre el tejido amigdalar y el contenido críptico, lo cual es muy importante, para la integridad funcional del órgano. Este autor, no atribuye ninguna influencia fuera del órgano a los mediadores antes mencionados, y entiende que en la amigdalitis crónica, el incremento considerable observado por Sasaki y cols, (1978) en el número de bacterias en el tejido, debe ser entendido como un defectuoso funcionamiento del mecanismo defensivo intraamigdalar (Siegel, 1983).

Otros autores autores como Sala y Gravina, (1982) recogiendo observaciones suyas y de otros autores ya citados sobre el descenso de inmunoglobulinas séricas tras la amigdalectomía, consideran, que dichos mediadores sí actúan mas allá del organo, de tal forma que sugieren que los episodios inflamatorios recidivantes de vías aéreas superiores, que a veces se observan en adolescentes y adultos tras amigdalectomía, se deben al descenso citado de inmunoglobulinas séricas. También

estos mismos autores, de acuerdo con Donovan, (1973); y Surjan, (1977); sugieren que en casos de amigdalitis crónicas, acompañadas de inflamaciones agudas de vías respiratorias (sinusitis, traqueobronquitis), - éstas se deben a un descenso relativo de inmunoglobulinas séricas, y estas amigdalitis, serían secundarias a esta carencia inmunitaria, estando por ello contraindicada la amigdalectomía, recomendando la inmunoestimulación prolongada, por pequeñas dosis antigénicas.

6.3.- Hipótesis funcional de la amigdala palatina.

Recogiendo observaciones propias y otros estudios mas o menos recientes, Siegel, (1983) establece una hipótesis funcional de la amigdala, que trata de establecer su significación dentro del sistema inmunitario. Por su interés teórico, ya que da explicación a un gran número de cuestiones planteadas, la - vamos a tratar de exponer adicionando aquellos otros estudios mas recientes que sobre el particular aportan nuevos datos.

Siegel distingue dos niveles de función amigdalar:

a nivel celular y a nivel molécular. De igual forma, representa dos mecanismos inmunológicamente diferentes en la amigdala:

- El mecanismo defensivo intraamigdalar antes mencionado, que incluye Ig y otros mediadores y que según Siegel, es provechoso en el mantenimiento de la integridad fu[illegible]al del órgano.

- El mecanismo biológico fundamental, que cubre — funciones a nivel celular tales como la generación de - células B ya mencionado.

Los dos mecanismos están ligados el uno al otro por la estructura histológica, y para su actuación; Siegel asigna una función inmunológica a cada estructura amigdalar, así:

a) El epitelio reticulado, constituido por células M, células de Langherans y túneles intraepiteliales, - capta y recibe los antígenos procedentes de la luz críptica, poniendolos en contacto con el tejido perinodular CID y con las CFD de la capa linfocitica del folículo linfoide.

b) Las CID del tejido perinodular y las CFD, serían "descifradoras" de la información inmune y presentarían el antígeno a las células T y a la capa linfocítica.

c) La capa o corona linfocítica del folículo linfoide, constituida por linfocitos T en su mayoría estimulantes o helper, células B memoria y CFD; actuaría como "área clasificadora", con una función de filtro para los antígenos. De tal forma que antígenos conocidos provocarían una transformación de linfocitos B memoria a células plasmáticas (constituyendo parte del sistema defensivo intraamigdalar), y antígenos desconocidos o bien grandes concentraciones antigénicas atravesarían esta capa linfocítica, entrando al centro germinal y provocando una amplificación de la respuesta inmune por proliferación clonal y/o policlonal de linfocitos B según la naturaleza del antígeno.

d) Red capilar del folículo. Al llegar el antígeno a esta zona, provocaría agregación y acumulación de células B antígeno-sensibles procedentes de la circulación que llegan a través de esta red capilar intranodular y se unen al antígeno. Presumiblemente, existe una proliferación de estas células en las que los macrófagos juegan una parte, en concordancia con las concepciones dadas a luz por White y cols, (1970) concernientes a la formación de los centros germinales. Así pues, se provocaría una proliferación de linfocitos B antíge-

no-sensibles, los cuales se transformarían en linfocitos B memoria, que pueden emigrar hacia la capa linfocítica (Curran y Jones, 1977), y linfocitos B sensibilizados que pasarían a sangre periférica. Este proceso continuamente se está llevando a cabo, y el paso de linfocitos B memoria a la capa linfocítica o "área clasificadora" hace que también continuamente tenga lugar - la adaptación para el espectro antigénico. Este proceso de adaptación es de importancia como un inductor de la involución amigdalar. Presumiblemente, la entrada de - antígeno en el centro germinal, decrece con el desarrollo de la capa linfocítica. Y por tanto, la proliferación celular B, decrece como resultado del engrosamiento de la capa linfocítica.

La regulación de la respuesta inmune tiene lugar por la acción de los componentes del tejido perinodular, que denomina "elementos controladores" que incluyen fundamentalmente los linfocitos T con sus funciones estimuladora "helper" o supresora en la proliferación de células B, y por tanto en la producción de anticuerpos. Estos "elementos controladores" se influenciarían, regulando la respuesta inmune por los siguientes mecanismos:

1) La recirculación de células T, tiene lugar a través de las vénulas postcapilares del tejido perinodular, cuyo flujo se ve modificado por la acción de las células endoteliales de estas vénulas postcapilares, las cuales son sensibles a los cambios de concentración de inmunoglobulinas, modulando la recirculación de células T, logrando así, un control de Feed-Back entre la concentración local y la generación de inmunoglobulinas.

2) La liberación de histamina por los mastocitos en el tejido perinodular, produce gradientes de concentración (tópicamente) que además de su efecto sobre la permeabilidad vascular de las vénulas postcapilares, también tiene, en función de su concentración, un efecto inhibitorio y estimulante sobre la función de los linfocitos (Brostorff y cols, 1980). Los receptores de la histamina sobre los linfocitos de amigdala, han sido detectados por Ballet y Merler (1976). Y Wilke, —— (1969), describió una alta concentración de histamina en el tejido.

3) Los factores tímicos del epitelio pueden del mismo modo influenciar las actividades celulares T en la amigdala (Oosterom y cols, 1981). Por el momento,

los significados biológicos de este tercer mecanismo funcional, no está explicado. Una conexión funcional del sistema celular T con el sistema celular reticulado, vía antígenos Ia, existe en la amigdala (Janossy y Greaves, 1980). Así, Siegel, asume que el tejido perinodular tiene funciones reguladoras en la respuesta inmune amigdalar referida al mecanismo celular B, al igual que piensan la gran mayoría de los autores. No obstante, el conocimiento acerca del mecanismo celular T, es aún insatisfactorio, y a veces contradictorio, por lo que se precisan nuevos estudios para elucidar su funcionamiento.

Dos experimentos mas recientes, apoyan algunos aspectos de la hipótesis funcional de Siegel:

Simar y cols, (1984) tras aislar las CFD con métodos enzimáticos, sugieren que ellas crean un microambiente favorable para el crecimiento de células linfoides dentro de los centros germinales. Tambien sugieren estos autores, que la presencia de antígenos o anticuerpos, influencia la activación, proliferación y/o la diferenciación de células B puesto que muestran similares antígenos de superficie que los monocitos o macrófagos, que son conocidos por actuar sobre las cé

lulas linfoides como presentadoras de antígeno.

Maeda y cols, (1984) en estudios realizados con microscopía electrónica y marcaje con peróxidasa (HRP), comprueban como desde las grandes vénulas endoteliales, hay una vía para las células linfoides trasladarse de la circulación general hacia los organos linfoides, y sugieren que algunos linfocitos localizados en las microcriptas, provienen de la circulación general.

6.4.- Involución de la amigdala.

Anteriormente, se ha apuntado de forma somera, como con el avance de los años, la amigdala involuciona. Brandtzaeg y cols, (1978), mostraron las relaciones alteradas entre el folículo linfático y el tejido perinodular respecto a la edad. Siegel y cols, (1982) corroboraron los cambios estructurales del epitelio reticular y encuentran una densidad reducida de células de Langherans, comprobando, como disminuye con la edad la proliferación celular antígeno-inducida, la incorporación de timidina y el índice de marcaje de las células B; resultando, en un incremento relativo del número de células T, hecho que ya vimos en el capítulo del contenido celular. El número de células T supresoras aumenta, inhibiendose la proliferación celular B. Para la mayoría

de los autores, la involución de la amigdala comienza entre los 10 y 12 años. El incremento de células T con el paso de los años, Siegel (1983) lo valora como una acumulación de células T recirculantes. Brandtzaeg y cols; y Brochier y cols, (1978 ambos) observan que en el curso de los procesos de involución, el número de - células B disminuye. Para Siegel (1976), el descenso - del contenido inmunoglobulínico en la amigdala, observado con el avance de los años, también tiene su origen en el descenso del número de células B. Este último autor, concluye en 1983 que la reducción en la capacidad para generar células B y acumular inmunoglobulinas, desequilibra el mecanismo defensivo intraamigdalar mas - probable (inmunoglobulinas), considerando que el aumento en la frecuencia de amigdalitis en la etapa postpuberal, es un cuadro clínico de estos procesos.

Surjan, (1980), Siegel, (1983) y Maeda (1984), encuentran alteraciones epiteliales crípticas, que disminuyen la capacidad de resorción antígénica, lo cual para el primero y tercero es la causa de amigdalitis recurrente por estimulación inadecuada, y sin embargo para Siegel (1983) significa el mecanismo iniciador de la involución amigdalar, pudiendo añadirse a título informal otros cambios, de acuerdo al modelo funcional amigdalar por él descrito.

## 7.- MECANISMOS PATOGENICOS DE LA AMIGDALITIS

Por el momento, los criterios morfológicos de amigdalas normales y patológicas, no están claramente definidos, y de acuerdo con Sprinkle y Veltri, (1976) la definición de amigdalitis aún no ha sido escrita. Las diferencias en la microflora orofaringea han sido descritas, y de ello ha derivado el concepto de amigdalitis - de etiología viral o bacteriana.

Existen en la actualidad, dos grandes teorías patogénicas respecto a la amigdalitis de repetición en niños:

A) Teoria críptica o hiporeactiva (Surjan y cols, 1980)

B) Teoría genética o hiperreactiva (Siegel, 1983)

Respecto a la amigdalitis focal, domina actualmente la teoría inmunológica (Kuki y cols, 1984), y respecto a la amigdalitis del adulto, la teoría mas importante que se baraja es la involucionista, involucrandose en el caso de la mujer, factores hormonales (Siegel, 1983).

La primera teoría, explica las amigdalitis recurrente, porque éstas, producen una metaplasia del epitelio críptico, particularmente del epitelio reticulado, el - cual se transforma en su mayor parte, en epitelio escamoso estratificado, perdiendose con ello, las células -

epiteliales especializadas (células M) encargadas de la captación antigénica. Las pocas células M persistentes, o aquellas capaces de regenerarse, contienen menos cantidad de vesículas y túbulos de transporte antigénico - que las análogas normales. Este epitelio metaplásico, - forma una barrera entre la luz críptica y el tejido linfoide subyacente, y por consiguiente, la activación de los linfocitos disminuye, así como el número de células que contienen inmunoglobulinas. Debido a estos cambios, la posibilidad de una nueva infección se incrementa, y cada infección resulta en nueva pérdida de células M. El epitelio estratificado escamoso nuevamente formado no es capaz de captar antígenos, pero a su través pueden penetrar bacterias vivas hacia el tejido linfoide subyacente que tiene menor cantidad de células produciendo inmunoglobulinas para su propia defensa, y por ello desarrollarse la infección.

Esta teoría, está apoyada en estudios histológicos y funcionales llevados a cabo in vivo e in vitro, en - grupos de pacientes que sufrieron amigdalotomía con amigdalas clínicamente normales, y amigdalas de perros; en comparación con otros de amigdalitis recurrente (Surjan y cols, 1978; Brandtzaeg y Surjan, 1979; y Surjan -

1980) y teniendo en cuenta los hallazgos ya citados de Owen y Mamenic, (1978).

Por otra parte, esta teoría, se ve corroborada - parcialmente, por los estudios de Maeda y cols, (1984) quienes al igual que Surjan, encuentran destrucción de microcriptas y un descenso de células epiteliales especializadas encargadas de la recepción antigénica. Sin embargo, no encuentran cifras estadísticamente significativas en el descenso de células conteniendo inmunoglobulinas. Por consiguiente, Maeda y cols, (1984) establecen, que la amigdalitis recurrente puede ser debida a un desequilibrio entre la protección del huesped y el desarrollo de la inmunidad sistémica contra invasiones ajenas, debidas a la destrucción y disfunción - de las criptas.

La teoría genética (Siegel, 1983), explica la amigdalitis recurrente, como una respuesta inmune inadecuada del organismo, condicionada genéticamente por la presencia de una haptoglobulina (Hp 2-2), que se encuentra disminuida en la amigdalitis de repetición de enfermos con amigdalas atróficas y en las amigdalitis focales y que está, por el contrario, elevada, en los - cuadros de amigdalitis de repetición de enfermos con -

amigdalas hipertróficas. Debido a estas observaciones, este autor, se plantea la siguiente hipótesis:

Los niños y chicos jóvenes con hiperplasia amigdalar, pueden apróximadamente ser clasificados como "altos respondedores", y aquellos con atrofia amigdalar - como "bajos respondedores". La hiperplasia amigdalar - de los "altos respondedores" surge de una intensa proliferación comparativamente tras el contacto con el antígeno. Ello debe ser visto como una hiperplasia activa y es un proceso fisiológico. En este caso, para - una indicación de cirugía, es conveniente mantener una actitud de reserva. No obstante, puede ser aceptable - la intervención, en casos de hiperreactividad inmunológica del organismo.

La situación es completamente diferente con las amigdalitis atróficas. Debido a la débil respuesta inmune determinada genéticamente, el equilibrio inmunológico en la amigdala es inestable en los "bajos respondedores" y se colapsa rápidamente. Por ello, el autor deduce, que la amigdala puede llegar a ser una fuente de infección y debe ser extraída. La intervención quirurgica sin embargo, no proporciona cambio alguno en la - condición del sistema inmunológico, sino que sólo eli-

mina una fuente preocupante de infección y perturbadora de dicho sistema. Recomienda el autor, que en casos de amigdalitis atrófica, debería examinarse sistemáticamente si, constituye un sintoma de un defecto inmunológico.

Otros autores, (Gieney y cols, 1977; Mozalevsky y cols, 1978) han apoyado esta disposición genética en las amigdalitis, apoyandose esta teoría en los estudios de Kohler y Prokop, (1977) quienes demostraron que el tipo genético de haptoglobina, condiciona la función inmunitaria; y fundamentalmente en los estudios de Siegel y cols (1981) que corroboraron las evidencias anteriores en grupos de enfermos con amigdalitis.

La teoría inmunológica de la amigdalitis focal, defendida actualmente por Enomoto y cols, (1983); y Kuki y cols (1984), no se basa en la génesis de la amigdalitis en sí, sino en el problema de la focalidad de la amigdala. Esta teoría refiere, que la antigénicidad del epitelio amigdalar modificada por infecciones bacterianas larvadas, contribuye a la producción de autoanticuerpos en la amigdala. Enomoto y cols, (1983) estudiando enfermos con amigdalitis focal y pustulósis palmo-plantar, encontraron que la antigenicidad del e-

pitelio amigdalar exhibía reactividad cruzada con antígenos epiteliales de la planta del pie y la palma de la mano por inmunocitología e inmunoquímica. Kuki y cols, (1984) encuentran diferencias remarcables en el sistema inmune contra antígenos epiteliales amigdalares entre la amigdalitis focal y las amigdalas con inflamación recurrente, concretamente, observan en amigdalitis focal, que tras sensibilización in vitro por antígenos epiteliales amigdalares, había un incremento de linfocitos portadores de IgD de superficie en la zona del manto o corona, sugiriendo la habilidad de estos linfocitos para la producción de autoanticuerpos.

La teoría involucionista (Siegel, 1983) refiere que la amigdalitis crónica en adultos, con o sin afectación focal, se desarrolla de la interacción de varios factores que están genética y hormonalmente inducidos, y puede ser provocada por los procesos de involución amigdalar y por antígenos. En pacientes femeninos, las correlaciones entre el nivel hormonal y su fluctuación en la respuesta inmune (hasta ahora no bien estudiadas), son tenidas en cuenta.

# MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL

1.1.- Amigdalas palatinas.

Se obtuvieron 38 pares de piezas de otros tantos enfermos que sufrieron amigdalectomía en el Servicio ORL de la C S "Virgen de las Nieves" de Granada. Se trataba en su conjunto de individuos entre 4 y 25 años de edad exentos de accesos amigdalares al menos 10 días antes de su intervención; las causas de la misma se han clasificado en tres grupos:

A) Amigdalitis focal (AF), 9 pacientes entre 5 y 19 años, ninguno de ellos presentaba hiperplasia amigdalar.

B) Amigdalitis recurrente (AR), 22 pacientes entre 4 y 25 años, que se subdividieron en dos grupos en relación a la presencia o no de hiperplásia amigdalar:

- 15 con hiperplásia amigdalar (AR con HA) entre 4 y 14 años.
- 7 sin hiperplásia amigdalar (AR sin HA) entre 4 y 25 años.

Todos padecían accesos con exudados blanquecinos, intensa odinofagia, malestar general y fiebre alta de 4 a 6 días de evolución con una frecuencia que oscilaba entre 1-2 accesos al mes para los pequeños

hasta 2-3 accesos al año para los de mayor edad.

C) Hiperplásia amigdalar simple (HAS), 7 pacientes entre 4 y 7 años que provocaba problemas obstructivos en vías aéreas superiores, la mayoría de ellos en el contexto de un cuadro catarral casi contínuo que en ocasiones se exacerbaba con fiebre alta de 1 a 2 días de evolución.

Luego de su extirpación, las piezas se colocaron en Buffer Salino Fosfato (PBS) en recipiente estéril a 4ºC para ser procesadas en un tiempo máximo de 3 horas después de su obtención. A continuación se describen los 38 casos exponiendo edad, sexo, fórmula con VSG, y datos de serología reumática entre los que se incluyen: ASLO, Streptozyme, PCR, Waler Rose y LATEX, los dos últimos siempre fueron negativos.

Se consideró serología reumática positiva, la presencia de ASLO igual o superior a 400 UI y/o el título de Streptozyme igual o superior a 1/600 encuadrandose dentro de las amigdalitis focales aquellos casos con serología positiva y/o enfermedad focal.

AMIGDALITIS FOCAL.

| CASO | EDAD(Años) | SEXO | ASLO | STREPTO | PCR | VSG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | V | 400 UI | 1/600 | (↓) | 8-24 |
| 2 | 19 | H | 400 UI | 1/600 | (↓↓) | 7-19 |
| 3 | 5 | H | 320 UI | 1/600 | (-) | 5-16 |
| 4 | 15 | V | GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL | | | |
| 5 | 10 | H | 400 UI | 1/600 | (↓↓) | 5-14 |
| 6 | 5 | V | 1600 UI | 1/1200 | (↓) | 36-67 |
| 7 | 13 | H | 640 UI | 1/600 | (-) | 16-33 |
| 8 | 16 | V | GLOMERULONEFRITIS | | | 18-39 |
| 9 | 7 | H | 640 UI | 1/600 | (-) | 15-38 |

AMIGDALITIS RECURRENTE CON HIPERTROFIA AMIGDALAR.

| CASO | EDAD(Años) | SEXO | ASLO | STREPTO | PCR | VSG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | H | 200 UI | 1/300 | (-) | 24-51 |
| 2 | 4 | H | 200 UI | 1/300 | (-) | 10-28 |
| 3 | 8 | H | 200 UI | 1/300 | (-) | 2-7 |
| 4 | 6 | V | 200 UI | 1/150 | (-) | 4-12 |
| 5 | 9 | V | 160 UI | 1/320 | (-) | 8-21 |
| 6 | 13 | V | (-) | (-) | (-) | 4-7 |
| 7 | 11 | H | 400 UI | 1/300 | (-) | 11-22 |
| 8 | 12 | H | (-) | (-) | (-) | 12-29 |
| 9 | 5 | V | (-) | (-) | (-) | 12-21 |
| 10 | 14 | V | 200 UI | 1/300 | (++) | 7-21 |
| 11 | 4 | V | 200 UI | (-) | (-) | 5-14 |
| 12 | 5 | H | 200 UI | (-) | (-) | 4-10 |
| 13 | 5 | H | 200 UI | 1/300 | (-) | 5-15 |
| 14 | 5 | V | 250 UI | 1/300 | (-) | 12-35 |
| 15 | 11 | V | 200 UI | (-) | (-) | 8-22 |

AMIGDALITIS RECURRENTE SIN HIPERTROFIA AMIGDALAR.

| CASO | EDAD(Años) | SEXO | ASLO | STREPTO | PCR | VSG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | H | (-) | (-) | (-) | 21-46 |
| 2 | 5 | V | 200 UI | 1/300 | (-) | 7-18 |
| 3 | 10 | H | (-) | (-) | (-) | 5-15 |
| 4 | 5 | H | (-) | (-) | (-) | 10-27 |
| 5 | 15 | H | 200 UI | 1/300 | (↓) | 10-24 |
| 6 | 5 | V | (-) | (-) | (↓) | 11-24 |
| 7 | 25 | V | (-) | (-) | (-) | 10-23 |

HIPERPLASIA AMIGDALAR SIMPLE.

| CASO | EDAD(Años) | SEXO | ASLO | STREPTO | PCR | VSG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | H | (-) | (-) | (-) | 15-28 |
| 2 | 5 | V | 200 UI | 1/300 | (-) | 4-10 |
| 3 | 4 | H | (-) | (-) | (-) | 21-50 |
| 4 | 5 | H | (-) | (-) | (-) | 17-41 |
| 5 | 4 | V | (-) | (-) | (-) | 2-6 |
| 6 | 7 | V | (-) | (-) | (-) | 8-21 |
| 7 | 5 | V | (-) | (-) | (-) | 2-8 |

## 1.2.- MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA

Las muestras de sangre periférica se obtúvieron por punción venosa de una vena del antebrazo de cinco niños de entre 4 y 9 años de edad, 10 días antes de la intervención. Una vez obtenida, la sangre se desfibrina mediante un método físico, por agitación suave durante 8 a 10 minutos en matraz de Erlenmeyer de 50 ml., en el que previamente se habian depositado de 8 a 10 bolitas de vidrio. La agitación forma un coagulo de fibrina y plaquetas alrededor de las bolitas, quedando el resto de elementos formes libres. Una vez desfibrinada esta sangre, se diluye a 1/2 con PBS quedando lista para separar las células mononucleares en gradiente de Ficoll como se describirá más adelante.

1.3.- Marcadores inmunológicos utilizados.

1.3.1.- Marcadores de linfocitos B.

a) Anticuerpos monoclonales:

B-1 Reconoce un antígeno que aparece en los estadíos de linfocito Pre-B-Pre-B y Pre-B, y se mantiene durante las diferentes fases de la serie linfoide B hasta llegar a célula plasmática donde pierde su expresión ( Stashenko y cols., 1980 ). Se ha utilizado en la caracterización de los linfocitos totales ( aislados por Ficoll ) de amigdala y sangre periférica de 5 niños y en los linfocitos totales de amigdala de 5 adultos.

GRB1 Producido en nuestro laboratorio, reconoce un determinante antigénico monomórfico de los antígenos HLA-DR de clase II que se expresa en linfocitos B, monocitos y linfocitos T activados ( Ruiz Cabello y cols, 1985). Se ha utilizado en la caracterización de todas las poblaciones linfocitarias aisladas por las diversas técnicas en todos los casos estudiados ( 27 niños y 5 adultos ).

OKIa Idéntico al anterior en cuanto a su especificidad isotípica, reconoce un determinante antigénico común a todas las variantes alogénicas de los antígenos DR (Reinherz y cols.1979 y Nadler y cols.,1981). Se ha

utilizado en la caracterización de linfocitos totales de amigdala de todos los casos estudiados y en los linfocitos totales de sangre periférica de 5 niños. Asimismo, se ha empleado debido a su capacidad de fijar el complemento, en los experimentos de deplección celular para lisar las células que expresan este Ac Mo.

J-5 Reconoce el antígeno "CALLA" (antígeno de 100 Kd de peso molecular)que se encuentra en las leucemias linfoblásticas agudas comunes (Ritz y cols., 1980) y a nivel madurativo, en el estadío de célula Pre-Pre-B ( Greaves y cols, 1983). Su expresividad se ha ensayado por inmunofluorescencia indirecta(al igual que todos los Ac Mo) en todas las poblaciones linfocitarias aisladas por los distintos métodos, tanto de sangre periférica como de amigdala.

GR2110 Producido en nuestro laboratorio, identifica un antígeno de 24 Kd de peso molecular, se encuadra entre los antígenos denominados " P-24 ". Está presente en plaquetas y en un subgrupo de LLA, también se ha encontrado en médula ósea, y se piensa sea un precursor de células B (linfocitos Pre-Pre-B y Pre-B),(Gomez Morales y cols. 1985). Al igual que el anterior, ha sido utilizado en todas las poblaciones linfocitarias aisladas y además en cortes de criostato.

b) Inmunoglobulina de superficie

IgS Antiinmunoglobulina humana de conejo (Nordic Laboratories), Se expresan de forma específica en los linfocitos B. Se ha empleado en la caracterización de todas las poblaciones linfocitarias aisladas tanto en amigdala como en sangre periférica por todos los métodos utilizados.

IgM Anti-IgM humana de conejo ( Nordic Laboratories ). Se ha utilizado en la caracterización de las células de cada uno de los 14 halos, obtenidos por fraccionamiento con Percoll de linfocitos totales de 10 amigdalas de otros tantos niños.

IgD Anti-IgD humana de conejo ( Nordic Laboratories ). Igualmente a la anterior se ha utilizado en la caracterización de todos los halos celulares separados por Percoll. La detección de inmunoglobulina de superficie se ha realizado por la técnica de inmunofluorescencia directa ( IFD ).

MCR c) Rosetas con hematíes de ratón (su técnica se describirá más adelante).

1.3.3.- Marcadores inmunológicos de linfocitos T

a) Anticuerpos monoclonales

T3 Antígeno de superficie reconocido por el Ac Mo OKT3 (ORTHO) que está presente en la mayoría de los linfocitos T maduros (Kung y cols, 1979). Se ha utilizado en la caracterización de todas las poblaciones celulares aisladas tanto en amigdalas como en sangre periférica

T4 Antígeno de superficie reconocido por el Ac Mo OKT4 que se expresa en los linfocitos T "Helper"/inductores (Reinherz y cols, 1979; Thomas y cols, 1980). Se ha utilizado en la caracterización de linfocitos totales de sangre periférica y en la de todas las poblaciones aisladas de amigdala, a excepción de la población celular obtenida por deplección tras lisis con diversos Ac Mo y complemento.

T8 Antígeno de superficie reconocido por el Ac Mo OKT8 (ORTHO), que se encuentra en la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos (Kung y Goldstein, 1980). Se ha utilizado en la caracterización de las mismas poblaciones celulares que el T4.

T11 Antígeno de superficie reconocido por el Ac Mo OKT11 que corresponde al receptor para los hematíes de carnero de los linfocitos de estirpe T humanos ( Verbi y cols,

1982). Se ha utilizado en la caracterización de los linfocitos totales (separados por ficoll) de amigdala y sangre periférica así como en las poblaciones linfoides separadas por adherencia a fibra de nylon. Tanto este Ac Mo como el OKT4, han sido suministrados por la casa ORTHO.

T10 Antígeno de superficie reconocido por el Ac Mo OKT10 (ORTHO), que se expresa en células pluripotenciales(Stem Cell), timocitos y células plasmáticas (Reinherz y cols. 1980). Se ha utilizado en la caracterización de linfocitos totales de amigdala y sangre periférica, así como en todas las poblaciones aisladas por el método de Percoll.

WT1 Reconoce al antígeno del mismo nombre que se encuentra en linfocitos T inmaduros, que no reaccionan con otros marcadores T como OKT11. También está presente en linfocitos T de sangre periférica normal (Vodinelich y cols, 1983). Se ha empleado en la caracterización de todas las poblaciones celulares aisladas por los diversos métodos tanto en sangre como en amigdala.

RE b) Rosetas con hematíes de carnero: su técnica se describirá más adelante. Su formación se ha ensayado en 10 casos de linfocitos totales de amigdala ( 5 niños y 5 adultos) y en los linfocitos totales de sangre periférica.

1.3.5.- Marcadores inmunológicos de células nulas

a) Anticuerpos monoclonales

GRM1 Ac Mo producido en nuestro laboratorio, idéntifica un antígeno constituido por dos moléculas de 59 y 53 Kd que representa el Fc R2 (receptor para el Fc de la IgG) compartido por células NK (natural killer) y polimorfonucleares (Lopez Nevot y cols, sometido a publicación). Se ha utilizado en la caracterización de los linfocitos totales de amigdala y sangre periférica.

OKM1 Ac Mo (ORTHO) que reconoce un antígeno de superficie celular de 170 Kd de peso molécular, expresado por monocitos, granulocitos y células nulas (NK), (Breard y cols, 1980). Se ha utilizado al igual que el anterior, en la caracterización de los linfocitos totales de amigdala y sangre periférica.

TdT b) Marcador enzimático TdT: Se trata de la enzima Deoxinucleotidil Terminal Transferasa, que se encuentra en timocitos y en un porcentaje pequeño de células de médula ósea, pero no en linfocitos maduros. Se ha visto su actividad incrementada en la mayoría de células blásticas de LLA, en linfomas de tipo celular inmaduro y en crísis blástica. de la LMC. Kenneth y cols, (1985) indica la existencia de una heterogéneidad de linaje entre la pobla-

ción de células TdT (↓), por ello se ha incluido en este apartado. La técnica para poner de manifiesto dicha enzima se expondrá mas adelante. Se ha ensayado su presencia en los linfocitos totales de sangre periférica, en 10 casos de linfocitos totales de amigdala, y en la mayoría de las poblaciones linfoides separadas por el método del Percoll.

1.3.6.- Controles negativos

- Suero normal de ratón (SNR), para determinar la fijación inespecífica de los Ac Mo utilizados, ya que todos ellos son Ig de ratón. Se ha empleado en todos los casos en - que se practicó la inmunofluorescencia indirecta -IFI- (todos los Ac Mo).
- Buffer salino fosfato (PBS), para determinar la fijación inespecífica del segundo anticuerpo que se trataba de - un suero de conejo anti-ratón (RAM-Ig-FITC). Se ha utilizado en todos los test practicados tanto por IFI (Ac Mo) como por IFD (Ig de superficie).

En la tabla de la página siguiente, se exponen los marcadores que han sido utilizados para caracterizar las poblaciones linfoides separadas en cada ensayo de fraccionamiento, con los casos estudiados en cada uno de ellos.

A: Linfocitos totales de amigdala de niño separados por Ficoll (27 casos).

B: Linfocitos totales de sangre periférica separados por Ficoll (5 casos).

C: Linfocitos totales de amigdala de adultos separados por Ficoll (5casos).

D: Linfocitos fraccionados por adherencia a fibra de nylon (5 casos).

E: Linfocitos supervivientes a la lísis mediada por complemento (5 casos).

F: Linfocitos fraccionados por el método del Percoll (10 casos).

G: Cortes histológicos de amigdala en criostato.

MARCADORES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS ARRIBA EXPRESADOS:

| Ensayos / Marcadores | A | B | C | D | E | F | G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B-1 | 5 casos | ↓ | ↓ | - | - | - | - |
| GRB1 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| OKIa | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - | - | - |
| IgS | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| IgM | - | - | - | - | - | ↓ | - |
| IgD | - | - | - | - | - | ↓ | - |
| Rosetas M (MCR) | 5 casos | ↓ | ↓ | - | - | - | - |
| J-5 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| GR2110 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| T3 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| T4 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - | ↓ | - |
| T8 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - | ↓ | - |
| T11 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - | - | - |
| Rosetas E | 5 casos | ↓ | ↓ | - | - | - | - |
| T10 | ↓ | ↓ | ↓ | - | - | ↓ | - |
| WT1 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| GRM1 | ↓ | ↓ | ↓ | - | - | - | - |
| OKM1 | ↓ | ↓ | ↓ | - | - | - | - |
| TdT | 5 casos | ↓ | ↓ | - | - | ↓ | - |
| Controles(-) | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |

(↓)= Marcador ensayado; (-)= Marcador no ensayado.

## 2.- METODOS

### 2.1.- Separación celular de las piezas.

MATERIALES:

- Dos amigdalas
- Un soporte enrejado
- Un recipiente de cristal
- Pinzas de disección
- Jeringa y aguja

REACTIVOS:

30 ml de PBS

PROCEDIMIENTO:

1. Se colocan las amigdalas sobre el soporte enrejado el cual descansa sobre el recipiente de cristal.
2. Con la aguja estéril y ayudado de las pinzas, se puncionan repetidas veces atravesando la pieza.
3. Utilizando la jeringa y la misma aguja, se inyecta a presión 15 ml de PBS en cada amigdala para arrastrar las células que caerán junto con el PBS en el recipiente de cristal, obteniéndose así 30 ml de suspensión celular.

### 2.2.- Separación de células mononucleares de la suspensión celular según la tecnica de Boyum, 1969.

MATERIALES:

- Tubos de 15 ml cónicos de plástico.
- Pipetas de 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Portas y cubreobjetos.

REACTIVOS:

Histopaque 1.077 (Sigma): contiene Ficoll (Tipo F 400) 57 gr./dl. y diatrizoato sódico 9gr./dl. en solución - aséptica.

Buffer Salino Fosfato (PBS)

Solución de cloruro amónico al 0,87%.

PROCEDIMIENTO:

1. Se colocan 5 ml de Histopaque 1,077 en tres tubos de 15 ml (5 ml en cada tubo).
2. Sobre el histopaque 1.077, se añaden 10 ml de la suspensión celular (células de amigdala y PBS). Se centrifúgan los tubos a 400 g durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
3. Después de centrifugar, se aspira el sobrenadante - hasta llegar a medio centímetro de la interfase opaca que contiene las células mononucleares. Se recoge esta fase con una pipeta Pasteur.

4. La interfase se reparte en tres tubos y a cada tubo se le añaden 10 ml de PBS. Se centrifúgan a 250 g - durante 10 minutos.
5. Se realizan dos lavados más con PBS.
6. La viabilidad de las células se comprueba por contraste de fase.
7. En caso de existir exceso de hematíes, las células se tratan con 10 ml de la solución al 0,87% de cloruro amónico durante 5 minutos a temperatuta ambiente.
8. Las células se ajustan a $5 \times 10^6$/ml en PBS.

2.3.- Separación de células moncnucleares de sangre periférica.

Se utiliza la misma técnica, descrita anteriormente, variando únicamente el que la sangre desfibrinada, la diluímos en PBS a razón de cada 10 ml de sangre en 14 ml de PBS. Sólo se utilizan 10 ml de sangre desfibrinada por cada caso.

2.4.- Separación de linfocitos T y B, (Eisen y cols, 1972).

MATERIALES:

- Fibra de nylon.

- Jeringa de 5 cc.
- Tubos cónicos de 15 ml.
- Parafilm.
- Baño de agua a 37º C.
- Estufa.
- Colador.

REACTIVOS:

Medio RPMI 1.640.

Solución de ClH 0,1 N.

Suero fetal de ternera. (Gibco)

HEPES/(Flow).

PROCEDIMIENTO:

1. Preparación de la fibra de nylon.

   a) Se pesan 300 mg de fibra de nylon por cada muestra.

   b) Se abre la fibra, evitando los grumos y se coloca en una jeringa de 5 cc.

   c) Se lava con 50 cc de agua destilada y 50 cc de ClH/0,1N. Pasando por la jeringa 10 cc de ClH, seguidos de otros 10 de agua y repitiendo el lavado de forma alternativa hasta completar los 50 cc de cada uno de los elementos.

   d) Después se pasan 50 cc de medio RPMI sin suero

fetal y otros 50 de medio caliente (atemperado al baño maría) con el 10 % de suero fetal de ternera.

e) La jeringa se tapa por ambos extremos con parafilm, dejandola llena de medio enriquecido con suero fetal, evitando las burbujas de aire, para tenerla bien impregnada.

f) Se incuba a 37º C durante media hora.

2. Preparación del medio de cultivo.

a) Por cada muestra se preparan 200 cc de medio.

b) Se pesan 2,08 gr de RPMI para 200 cc de agua destilada. Después de diluir bien, se determina el ph que se ajusta entre 7,2 y 7,4. Se estabiliza con HEPES al 1 %.

c) Se separan 50 cc de medio para lavar la jeringa. Los 150 cc restantes se enriquecen con fetal inactivado al 10 %. 50 cc de este medio se atemperan al baño maría y se utilizan como se ha mencionado anteriormente, para lavar por última vez la jeringa antes de ponerla a incubar.

3. Obtención de los linfocitos T

a) Después de la separación por Ficoll y de los lavados correspondientes, el botón celular de cada

muestra se resuspende en 2 cc de medio.

b) La jeringa ya incubada, se escurre con su émbolo hasta alcanzar los 2,5 cc de su graduación.

c) Se colocan los 2 cc de la suspensión celular a una concentración de $30 \times 10^6$/ml .

d) Se incuba durante media hora a 37º C en estufa.

e) Para separar los linfocitos T se pasan 10 cc de medio frío por la jeringa, muy lentamente, recogiendose en un tubo cónico graduado. Después de centrifugar se ajustan a $5 \times 10^6$/ml.

f) Posteriormente se lava la jeringa con 50 cc de medio atemperado.

4. Obtención de los linfocitos B.

a) Se saca la lana de la jeringa, después del último lavado.

b) Se coloca en un colador, situado sobre una taza. La lana se va abriendo, con cuidado, por medio de dos agujas extendiendola lo máximo posible para evitar la formación de grumos, mientras se lava con medio de cultivo para evitar que se seque.

c) El medio de cultivo recogido en la taza se centrifuga a 250 g durante 10 minutos. Después de resuspender el botón celular, los linfocitos B -

se ajustan a $5 \times 10^6$/ml.

d) La viabilidad de los linfocitos se comprueba por contraste de fase.

2.5.- Fraccionamiento por citotóxicidad mediada por complemento.(Según Fung-Win Shein, 1984).

A. Lisis con el Ac Mo OKT3 más complemento.

1. Las células mononucleares de amigdala, separadas previamente mediante gradiente de Ficoll-Hypaque, se lavaron dos veces con PBS y se ajustaron a $30 \times 10^6$/ml.
2. En cada caso, en un tubo de plástico $15 \times 10^6$ células, fueron colocadas. Se centrifugaron a 250 g durante 10 minutos y sobre el botón celular se añadieron 150 microlitros del Ac Mo OKT3 diluído al 1/10.
3. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente.
4. Se lavó con PBS dos veces para eliminar el exceso de anticuerpo.
5. Se añadieron 0,5 ml de suero de conejo como fuente de complemento y se dejaron incubando a temperatura ambiente una hora y media.
6. Finalmente se lavó dos veces con PBS para descartar el exceso de suero de conejo.

B. Lisis con el Ac Mo OKia más complemento.

Se utilizó la misma técnica, variando únicamente la cantidad de células y por consiguiente la de Ac Mo y complemento, concretamente se utilizó:

$25 \times 10^6$ células mononucleares.

250 microlitros de Ac Mo OKia diluído al 1/10.

1 ml de suero de conejo.

Se utilizaron tales cantidades en un caso y otro, con la finalidad de obtener el suficiente número de células para poder practicar las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta con los marcadores que ya se han descrito.

2.6.- Separación celular por centrifugación en gradiente discontinuo de densidad de Percoll (según la técnica de Tor Olofson y cols, 1980).

MATERIALES Y REACTIVOS:

- Tubos de vidrio de 22 ml.
- Percoll (Pharmacia Fine Chemicals).
- PBS 10 x.
- Refractómetro.

1. Preparación de los gradientes de Percoll.

Se preparan dos soluciones denominadas A y B, según la tecnica descrita por Tor OLofson y cols, (1980) pa-

ra la separación en gradiente de Percoll de células de médula ósea. La solución A a partir de 117 ml de Percoll y 13 ml de PBS 10 x. La solución B con 117 ml de agua destilada y 13 ml de PBS 10 x. Mezclando ambas soluciones se obtienen 13 concentraciones de Percoll desde el 30 % al 65 %, estableciendo una diferencia de 5% entre los dos primeros y los dos últimos gradientes y de 2,5 entre cada uno de los restantes. Las proporciones de solución A y B se indican en la siguiente tabla así como su índice de refracción para cada uno de los gradientes.

| sol A ml | sol B ml | % de Percoll | índice de refracción |
|---|---|---|---|
| 6 | 14 | 30 % | 1,3390 |
| 7 | 13 | 35 % | 1.3400 |
| 7,5 | 12,5 | 37,5 % | 1,3404 |
| 8 | 12 | 40 % | 1,3408 |
| 8,5 | 11,5 | 42,5 % | 1,3412 |
| 9 | 11 | 45 % | 1,3416 |
| 9,5 | 10,5 | 47,5 % | 1,3420 |
| 10 | 10 | 50 % | 1,3425 |
| 10,5 | 9,5 | 52,5 % | 1,3429 |
| 11 | 9 | 55 % | 1,3433 |
| 11,5 | 8,5 | 57,5 % | 1,3438 |
| 12 | 8 | 60 % | 1,3442 |
| 13 | 7 | 65 % | 1,3452 |

Las soluciones de Percoll se conservaron a 4º C.

2. De cada una de las soluciones de Percoll ya mezcladas se toma 1,5 ml. En un tubo de vidrio de 22 ml se van colocando los gradientes, empezando por los de mayor concentración. Se utiliza una jeringa de insulina, las soluciones se van dejando caer dentro del tubo muy lentamente, de forma que resbalen por la cara interna del tubo y así se evita la mezcla de gradientes. De esta forma se llenan dos tubos de vidrio para cada caso estudiado.
3. Las células mononucleares de amigdala habían sido separadas en gradiente de Ficoll-Hypaque, lavadas cuatro veces con PBS, contadas en cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fases, ajustandose a la concentración de $30 \times 10^6$/ml.
4. Sobre los gradientes de Percoll, preparados en los tubos de vidrio, se colocan en cada tubo 1,5 ml de PBS que contienen $45 \times 10^6$ células mononucleares. Los tubos se centrifugan a 300 g durante 45 minutos a temperatura ambiente.
5. Después de la centrifugación se puede comprobar la formación de halos opacos entre los diferentes gradientes de Percoll. Con una pipeta Pasteur se reco-

gen los distintos halos, comenzando con los superiores y realizando la aspiración con cuidado para no mezclarlos.

6. Las células una vez separadas, se lavan tres veces con PBS, se cuentan las células vivas de cada halo, anotan su viabilidad en cada uno de ellos; todo ello en cámara de Neubauer con microscopio de contraste de fases.
7. A continuación se congelan en nitrógeno liquido, según se describe mas adelante, para posteriormente poder aplicarles con las técnicas de inmunofluorescencia directa , indirecta y TdT; los marcadores ya descritos. La fig. 1 muestra los 14 halos obtenidos.

2.7.- Técnica de congelación en nitrógeno líquido.

En la mayoría de los casos se congelaron las células con las que posteriormente se practicaron todos los ensayos de caracterización.

MATERIALES:

- Tubos de plástico estériles de 2ml con tapón de rosca (NUNC).
- Suero fetal de ternera al 20 %
- Dimetil-sulfóxido al 10 % (DMSO).
- Congelador de -80º C.
- Contenedor de nitrógeno líquido

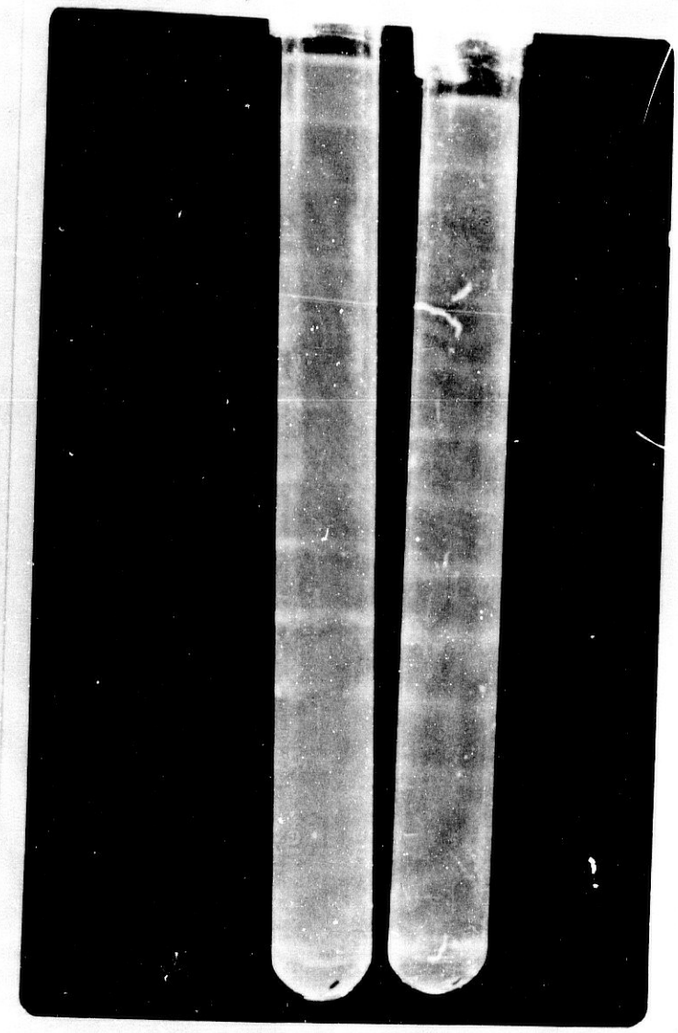


Fig.1.- Fraccionamiento de células linfoides de amigdala. En la figura se obserban los_ 14 halos celulares obtenidos mediante _ gradientes discontinuos de Percoll.

PROCEDIMIENTO:

1. Las células lavadas por tres veces en PBS y procedentes de cualquiera de las técnicas antes descritas, se resuspenden y se ajustan a una concentración de 10 x $10^6$ células/ml con suero fetal más DMSO al 10 % a 4ºC.
2. Rápidamente se dispensa en tubos de 2 ml con tapón de rosca a razón de 1,5 ml en cada tubo.
3. Los tubos se llevan inmediatamente al congelador de -- 80º C, donde se aprovecha para cerrar los tubos, -- consiguiendo así que las células estén el mínimo tiempo sin congelar en contacto con el DMSO que es tóxico. Las células permanecen en este congelador 24 horas.
5. Del congelador de -80º C se pasan al contenedor de nitrógeno líquido, donde quedan almacenados hasta su utilización.

DESCONGELACION:

En el momento de usar estas células, basta con sacar el tubo, descongelarlo agitando con rápidez en un baño de agua termostatizado a 37º C (baño maría), en donde previamente tenemos calentado un tubo universal con PBS para una vez descongelado, verterlo al universal para liberar las células del DMSO ya que es tóxico.

## 3.- TECNICAS DE CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES LINFOCITICAS.

### 3.1,a.- Formación de rosetas con hematies de carnero.

MATERIALES:

- Tubos de plástico.
- Centrífuga.
- Hematies de carnero.

PROCEDIMIENTO:

En un tubo de plástico de 12 por 75 mm, se colocan 0,1 ml de una suspensión al 0,5 % de hematies de carnero y $(1 \pm 0,5) \times 10^6$ células mononucleares en 0,1 ml de PBS. Se añade una gota de suero humano previamente absorbido con hematies de carnero y después inactivado con calor. Se centrifuga lentamente a 50 g durante 5 minutos y se deja durante 18 horas a 4º C, sin despegar el botón celular. Después con mucho cuidado, haciendo oscilar el tubo durante dos minutos, sin golpearlo, se disuelve el botón celular. Las células se observan en cámara de Neubauer y se calcula el porcentaje de rosetas. Se considera como roseta todo linfocito rodeado al menos por tres hematíes. El contaje celular se aprecia mediante el contraste de fase.

### 3.1.-b) Formación de rosetas de ratón.

Los hematies de ratón se obtienen por punción re-

trorbitaria con un capilar. La técnica se desarrolla con la misma metodología que la anterior. Tiene como finalidad determinar el grado de diferenciación de los linfocitos B.

3.2.- TdT inmunoperóxidasa.

Usa el método peróxidasa antiperóxidasa, permitiendo la enumeración de células positivas por microscopía óptica. El kit suministrado por "CULTEK Biotecnología" contiene los reactivos listos para su uso enumerados:

1. Suero normal de cabra.
2. Anti-TdT (producido en conejo).
3. Anti-IgG de conejo (producido en cabra).
4. Complejo de peróxidasa/antiperóxidasa (Anti-Po/-Po, producida en conejo).
5. Acetato sódico 1 M, Ph 5,2.
6. Substrato cromogénico (3-aminoethylcarbazoles - en dimethylformamide).
7. Hematoxilina de Mayer.
8. Glicerol/PBS.

Reactivos adicionales no incluidos en el kit:

a) Metanol frío.

b) PBS.

c) H2 O2 al 1% en agua destilada.

Pasos descriptivos de la técnica:

A) Preparación del porta: Se marca un círculo (apróximadamente de 1 cm de diámetro), en la zona donde se vayan a aplicar los reactivos, y se secan las preparaciones a temperatura ambiente.

B) Se fijan 15 minutos en metanol absoluto a 4º C.

C) Se coloca una gota de agua oxigenada al 3% en el área circulada, se deja 5 minutos y se lava con PBS. Luego se quita el exceso de PBS y se añade una gota de solución número 1. Se deja estar 5 minutos y se lava con PBS.

D) Se añaden 20 microlitros de reactivo número 2 y se incuba 30 minutos en cámara humeda a temperatura ambiente.

E) Se lava con PBS 10 minutos con varios cambios de éste.

F) Se añaden 20 microlitros de reactivo número 3 y se incuba 30 minutos en cámara humeda a temperatura ambiente.

G) Se lava durante 10 minutos con PBS con varios cambios de éste.

H) Se añaden 20 microlitros de reactivo número 4 y se incuba 30 minutos en cámara humeda a temperatura -

ambiente.

I) Igualmente se vuelve a lavar con PBS 10 minutos.

J) Se mezclan 100 microlitros de reactivo número 5, 300 microlitros de agua destilada y 100 microlitros de reactivo número 6. Se añaden 5 microlitros de agua oxigenada al 1% y se mezcla. Se colocan dos gotas en el área circulada, de la mezcla, y se incuba 20 minutos en cámara humeda a temperatura ambiente.

K) Se elimina el exceso de la solución anterior (decantando simplemente el porta) y se añade una gota de reactivo número 7. Se deja 10 minutos y se sumerje 3 veces en agua amoniacada.

L) Se monta la preparación con una gota de glicerol /PBS (reactivo número 8).

M) Se examina en microscopio simple:

- TdT positivas: núcleo rojizo amarronado.
- TdT negativas: núcleo azulado pálido.

Esta técnica se ha utilizado en linfocitos totales de amigdala y en las 14 poblaciones separadas por el Percoll. Para mayor comodidad, se han utilizado portas preparados con 8 pocillos o áreas circuladas.

3.3.- Técnica de inmunofluorescencia directa.

Esta técnica se practicó para detectar la presencia de inmunoglobulinas de superficie en las distintas poblaciones de células mononucleares de amigdala separadas por los distintos métodos ya descritos, así como sobre cortes histológicos de amigdala en criostato.

MATERIALES Y REACTIVOS:

- Tubos de plástico de 3 ml.
- Centrífuga refrigerada.
- PBS con el 0,1 % de albúmina.
- Antiinmunoglobulina humana de conejo (IgS) marcada con fluoresceina (NORDIC).
- Anti-IgM humana de conejo (IgM).(NORDIC).
- Anti-IgD humana de conejo (IgD).(NORDIC).

PROCEDIMIENTO:

1. Las células mononucleares a estudiar se ajustan a $10 \times 10^6$/ml.

2. Se colocan 50 microlitros de la suspensión celular en un tubo de plástico de 3 ml, en una gradilla situada sobre un baño de hielo. Se añaden 10 microlitros de la antiinmunoglobulina humana (a estudiar) marcada con fluoresceina diluida en PBS al 1/5.

3. Se deja incubando durante treinta minutos a 4ºC.

4. Se realizan tres lavados con PBS-albúmina, centrifugando a 250 g durante 10 minutos a 4º C.

5. Después del último lavado, se decanta el sobrenadante y las células con una pipeta de 50 microlitros se llevan a un portaobjetos para ser observadas al microscopio de fluorescencia.

6. Se realiza el contaje de las células fluorescentes, valorando sólo la positividad en las células vivas. El resultado se presenta en porcentaje de células positivas (fluorescentes).

3.4.- Técnica de inmunofluorescencia indirecta.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se utiliza para estudiar la expresión, a nivel de las distintas poblaciones linfoides de amígdala ya separadas por los distintos métodos expuestos, de los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales que forman parte del protocolo, anteriormente descrito.

1. Las células mononucleares se ajustan a $10 \times 10^6$ por ml.

2. Se colocan 50 microlitros de la suspensión celular en tubos de plástico de 3 ml. A cada uno de los tubos se le añaden 10 microlitros del anticuerpo mono--

clonal deseado diluído al 1/10.

3. Se incuban durante media hora a 4º C en el refrigerador.

4. A continuación se realizan tres lavador con - PBS-albúmina.

5. Después del último lavado se decanta el sobrenadante y sobre el botón celular se añade 10 microlitros de antiinmunoglobulina de ratón (NORDIC) marcada con fluoresceina, diluída en PBS al 1/10.

6. Se incuban durante media hora a 4º C en el refrigerador.

7. Se realizan tres lavados con PBS-ázida sódica, centrifugando a 250 g durante 10 minutos, a 4º C.

8. Las células, después del último lavado se recogen con una pipeta de 50 microlitros para colocarlas sobre un portaobjetos. Se observan al microscopio de-fluorescencia. Se valoran sólo las células fluorescentes que aparecen vivas en contraste de fase.

4.- TECNICAS CITOHISTOLOGICAS

Se han utilizado 12 amigdalas de 6 enfermos para estudio citohistológico por distintas técnicas:

- 4 amigdalas, una por cada grupo clínico para estudio a microscopía óptica mediante cortes incluídos en parafina y tinción de Hematoxilina-Eosina.
- 6 amigdalas para estudio, en cortes de criostato, de Ac Mo por técnica de inmunofluorescencia indirecta, 4 de ellas corresponden a los mismos enfermos citados en el apartado anterior y 2 a un enfermo de AR con HA.
- 2 amigdalas de un enfermo de AR con HA; tras fraccionarlas por el método de Percoll, se les ha prácticado la tinción de May-Grumwald-Giemsa para estudio de cada halo por microscopía óptica. A continuación se describen las técnicas histológicas propiamente dichas.

4.1.- Cortes incluídos en parafina.

1º.- Fijación: Inmediatamente extraídas las piezas de amigdalectomía, se fijan en formol tamponado al 10 % durante 24-48 horas.

2º.- Deshidratación: Se realiza introduciendo el material en soluciones de concentración creciente de alcohol etílico. La parte seguida ha sido la siguiente:

Alcohol etílico de 80º durante una hora.

Alcohol de 95º dos pases consecutivos de dos horas.

Alcohol absoluto dos pases consecutivos de cuatro horas.

3º.- Aclaramiento: Haciento pasar la muestra por una solución a partes iguales de alcohol benzol y luego un pase de media hora sólo por benzol.

4º.- Inclusión: Se utiliza parafina en la que se incluye la muestra por un procedimiento de pases sucesivos:

Benzol-parafina media hora.

Parafina I una hora.

Parafina II dos horas.

Parafina III tres horas.

Luego se prepara el bloque de parafina que se guarda en frigorífico hasta su utilización.

5º.- Corte: Se realizan cortes perpendiculares al plano de superficie a estudio del bloque de parafina de 4-5 micras de espesor utilizando para ello un microtomo tipo MINOT.

6º.- Tinción: De los cortes antes obtenidos, realizamos tinción con hematoxilina-eosina según técnica convencional.

7º.- Montaje: A la preparación anteriormente teñida se le monta un cubre-objetos en la placa utilizando como adherente el bálsamo. Las microfotografías fueron obtenidas en microscopio Laberloux-12.

4.2.- Cortes de criostáto.

Las piezas frescas se cortaron en pequeñas porciones de 3-4 mm. y se congelaron en Nitrógeno Líquido desde donde en su momento se extrajeron para prácticar cortes de criostáto

de 4 micras de grosor, colocandose los cortes en portaobjetos albuminados, y almacenándose éstos a -80ºC.

4.2.1.- Inmunofluorescencia indirecta.

Antes de la tinción, los cortes se fijaron con acetona fría durante 5 minutos y despues fueron secados a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con suero AB durante 30 minutos en cámara humeda a temperatura ambiente y despues se realizó lavado de 10 minutos en PBS. A continuación los cortes fueron cubiertos con el Ac Mo diluído en PBS a 1/20 durante 30 minutos en cámara humeda a temperatura ambiente. Lavado en PBS durante 10 minutos con varios cambios de PBS y a continuación se cubrieron los cortes de nuevo con antiinmunoglobina de ratón (NORDIC) marcada con fluoresceína diluída en PBS a 1/10 durante 30 minutos en cámara humeda a temperatura ambiente. Nuevo lavado de 10 minutos en PBS con varios cambios de éste, y a continuación se echa sobre el tejido una gota de glicerol sobre la que se coloca un cubre-objetos. Por último la preparación se observa en microscopio de fluorescencia donde se práctican las microfotografías.

Como control positivo se utilizó el Ac Mo GRT1 producido en nuestro laboratorio que reconoce antígenos de histocompatibilidad de clase I. Como control negativo, se utilizó suero normal de ratón.

# RESULTADOS

1.- Expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdala y sangre periferica de niños.

En la Tabla I se establece una comparación entre la expresión de dichos marcadores en linfocitos de amigdala y sangre periférica de un grupo de 5 niños, entre 4 y 9 años, cuyos resultados son analizados por el test de la T de Student para muestras apareadas. Cabe resaltar la gran diferencia en la expresión de antígenos " Ia " entre linfocitos de amigdala y sangre periférica a favor de los primeros ($P \leq 0,001$), igual ocurre con la expresión del antígeno B1 que está presente en la población linfoide B, cuya expresión es mayor en amigdala que en sangre periférica ($P \leq 0,001$), por lo que se puede afirmar que la expresión de antígeno Ia en amigdala corresponde mayoritariamente a linfocitos B en distintos estadíos de desarrollo. Todo lo contrario ocurre con los marcadores de linfocitos T, donde en amigdala tienen una expresión mucho menor que en sangre periférica, siendo las diferencias muy significativas ($P \leq 0,001$) en cada marcador de LT. Aunque aquí, cabe resal-

tar la distinta expresión de subpoblaciones T4 y T8 en linfocitos de amigdala y de sangre periférica ya que e el cociente T4/T8 es mayor en amigdala que en sangre - periférica (2,59 y 1,76 respectivamente) indicando por tanto que la proporción relativa de linfocitos T supresores/citotóxicos es mayor en sangre periférica que en amigdala.

Las diferencias no fueron significativas entre ambos grupos de linfocitos para las inmunoglobulinas de-superficie (IgS).

Es de gran interés la aparición en linfocitos de-amigdala de Ag de superficie que expresan inmadurez celular en un variado porcentaje: 16,6 para el GR2110 y-21,5 para el J-5, dichos antígenos no están presentes en los linfocitos de sangre periférica de estos mismos donantes, siendo esta diferencia muy significativa ($P \leq 0,001$). Sin embargo la expresión del Ag WT1, fue superior en sangre periférica que en amigdala ($P \leq 0,01$).

La expresión de linfocitos con actividad NK en amigdala fue muy escasa (5,5 %), y algo superior en sangre periférica de los mismos donantes (11,9 %) siendo significativa dicha diferencia ($P \leq 0.05$). Por su parte, la presencia de monocitos en ambos grupos de linfoci—

tos no evidenció diferencias significativas. La presencia de células portadoras del Ag OKT10, si manifestó diferencias significativas ($P \leq 0,001$), con mayor expresión en amigdala que en sangre periférica (31,6 y 6,2% respectivamente).

Los linfocitos B formadores de rosetas con eritrocitos de ratón, no evidenció diferencias significativas, siendo su expresión muy baja en ambos grupos como se observa en la Tabla I.

Por su parte, la enzima TdT, fue negativa en ambos grupos de linfocitos. La fig 2 presenta una fotografía de células de amigdala TdT negativas, en comparación con la fig 3 que muestra células positivas a la enzima TdT de una línea linfoblástica T humana(MOLT-4).

Los porcentajes de los controles negativos utilizados oscilaron siempre en valores inferiores al 5% en ambos grupos y la intensidad de fluorescencia observada fue siempre menor que la que se vió para los distintos Ac Mo.

TABLA I

Expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdala y sangre periférica en niños de 4 a 9 años.

| MARCADORES | L de Amigdala $\bar{X} \pm SD$ | L. de Sangre Periférica $\bar{X} \pm SD$ |
|---|---|---|
| B-1 | 55,6 ± 1,9 | 27,1 ± 1,6 |
| GRB1 | 69,4 ± 6,7 | 29,4 ± 4,9 |
| OKIa | 69,2 ± 4,7 | 30,0 ± 4,0 |
| IgS | 28,1 ± 3,1 | 26,0 ± 4,1 |
| GR2110 | 16,6 ± 2,1 | (-) |
| J5 | 21,5 ± 3,6 | (-) |
| WT1 | 25,5 ± 7,0 | 42,0 ± 4,1 |
| OKT3 | 34,0 ± 4,6 | 70,2 ± 3.9 |
| OKT4 | 26,2 ± 4,1 | 45,6 ± 5.1 |
| OKT8 | 10,1 ± 1,2 | 25,8 ± 3,7 |
| T4/T8 | 2,59 | 1,76 |
| OKT11 | 34,3 ± 5,1 | 67,6 ± 2,7 |
| GRM1 | 5,5 ± 0,9 | 11,8 ± 3,5 |
| OKM1 | 9,5 ± 1,4 | 8,2 ± 2,3 |
| OKT10 | 31,6 ± 5,8 | 6,2 ± 1,8 |
| R E | 27,2 ± 5,7 | 61,4 ± 6,8 |
| MCR | 4,0 ± 1,1 | 5,6 ± 2,0 |
| TdT | (-) | (-) |
| SNR | 4,7 ± 3,6 | 4,4 ± 1,8 |
| PBS | 3,4 ± 1,7 | 3,0 ± 1,5 |

T Student para muestras apareadas.

Fig. 2.- Ensayo para determinación de la enzima TdT sobre células linfoides de amígdala por la técnica de inmunoperoxidasa. En la figura se aprecia la negatividad para esta enzima. x 400

Fig. 3.- Ensayo para determinación de la enzima TdT sobre células de la línea MOLT-4, por la técnica de inmunoperóxidasa. En la figura se aprecia una intensa positividad para esta enzima. x 400

2.- Expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdala en niños y adultos (Tabla II).

En la tabla II, se establece la comparación en la expresión de marcadores en los linfocitos de amigdala - del grupo total de niños estudiados, que incluye a 27 - de 4 a 13 años, respecto de los de otro grupo de 5 adultos de 15 a 25 años.

Como se observa en dicha tabla, la expresión de - marcadores en los linfocitos de amigdala de niños, es - similar a la de la Tabla I; pues como se indicó anteriormente, el grupo de 5 niños de la Tabla I, está incluido en el grupo de 27 de la Tabla II. Con relación a esta última se aprecia un ligero incremento en la población de linfocitos T de adulto, estadísticamente no significativo, respecto de los del grupo de menor edad (38,0 y 33,9 % respectivamente). Dicho incremento, tiene lugar, practicamente por igual en las distintas subpoblaciones de LT, de tal forma que el cociente T4/T8 apenas se modifica (2,36 en linfocitos de niños por - 2,23 en linfocitos de adultos).

La expresión de Ag Ia, es practicamente similar en ambos grupos, si bien se observa una tendencia a la baja estadísticamente no significativa en los linfocitos de los adultos. Similar tendencia (no significativa) a la baja se observa en la expresión de Ig de superficie y B-1.

La expresión de marcadores de inmadurez (GR2110 y J-5) también está presente en los linfocitos del grupo de adultos, igualmente con tendencia a la menor expresión en los adultos pero estadísticamente no significativa. Igual ocurre con la expresión del Ag T10. Por el contrario, el Ag WT1 tiende a ser mayor su expresión en los linfocitos de adultos que en los de niños aunque las diferencias no son estadisticamente significativas.

Respecto a los LT capaces de formar rosetas E, se aprecia una mayor expresión, estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$), en los linfocitos de adultos. Igualmente la positividad del Ac Mo OKT11 que identifica el receptor para el hematíe de carnero, es significativamente mayor ($P \leq 0,02$) en los linfocitos de adulto.

TABLA II

Expresión de marcadores en linfocitos totales de amigdalas de niño en comparación con las de adulto.

| MARCADORES | L de Amigdala Niños | L de Amigdala Adultos | |
|---|---|---|---|
| B1 | 55,6 ± 1,9 | 52,7 ± 2,3 | |
| GRB1 | 67,9 ± 5,6 | 65,2 ± 7,4 | |
| OKia | 66,9 ± 5,1 | 64,5 ± 6,8 | |
| IgS | 30,9 ± 3,9 | 27,1 ± 5,3 | |
| GR2110 | 18,5 ± 2,7 | 16,2 ± 4,7 | |
| J5 | 22,7 ± 3,9 | 19,3 ± 5,0 | |
| WT1 | 26,5 ± 5,9 | 28,2 ± 6,1 | |
| OKT3 | 33,9 ± 4,7 | 38,0 ± 9,0 | |
| OKT4 | 25,5 ± 3,6 | 27,5 ± 6,9 | |
| OKT8 | 10,8 ± 2,7 | 12,3 ± 3,8 | |
| T4/T8 | 2,36 | 2,23 | |
| OKT11 | 34,9 ± 4,9 | 41,4 ± 6,9 | ($P \leq 0,02$) |
| GRM1 | 6,1 ± 1,1 | 7,1 ± 2,1 | |
| OKM1 | 9,5 ± 1,7 | 9,6 ± 2,0 | |
| OKT10 | 30,7 ± 7,3 | 28,3 ± 7,1 | |
| RE | 27,2 ± 5,7 | 37,9 ± 6,2 | ($P \leq 0,05$) |
| MCR | 4,0 ± 1,1 | 4,7 ± 1,2 | |
| TdT | (-) | (-) | |
| SNR | 4,5 ± 1,4 | 4,9 ± 4,0 | |
| PBS | 3,4 ± 1,6 | 4,0 ± 2,8 | |

T de Student para muestras independientes.

Respecto a los demás marcadores (MCR, TdT) y controles negativos, su comportamiento y expresión, son los mismos que se indican en la Tabla I.

Los resultados de esta Tabla II, han sido analizados con el test de la T de Student para muestras independientes.

3.- Expresión de marcadores en los linfocitos de diferentes grupos clínicos de amigdalas de niños.

En la Tabla III, se clasifica el grupo de 27 niños de la Tabla II en las distintas variantes clínicas de amigdalitis que se exponen en material y métodos. Los resultados se exponen en relación a la expresión de marcadores por cada grupo clínico. La distribución de los pacientes correspondió como sigue:

1. Amigdalitis recurrente con hipertrofia amigdalar (AR con HA), 12 niños de 4 a 13 años.
2. Amigdalitis recurrente sin hipertrofia amigdalar (AR sin HA), 4 niños de 4 a 5 años.
3. Amigdalitis focal (AF), 5 niños de 5 a 13 años.
4. Hipertrofia amigdalar simple (HAS), 6 niños de 4 a 7 años.

Como se describe en material y métodos, todas las amigdalitis focales resultaron ser amigdalas sin hiperplásia, por lo que atendiendo a este factor, el primer y cuarto grupo según se describen, son hiperplásicas y el segundo y tercero hipoplásicas.

A los resultados de la expresión de los distintos marcadores sobre cada uno de los grupos clínicos en que se clasificaron los 27 casos de niños estudiados en la Tabla II, se les realizó el análisis de la varianza, y según el mismo, fueron estudiados estadísticamente por el Test de la T de Student para muestras independientes, aquellos marcadores donde el análisis de la varianza revelaba diferencias significativas entre cada grupo clínico.

Hubo diferencias estadísticamente significativas con la expresión de antígenos "Ia",(tanto cuando se midieron con el Ac Mo GRB1 como con el OKIa) y con el antígeno OKT10.

En el caso de los Ag "Ia", la expresión menor correspondió al grupo 2 (AR sin HA) y la mayor al grupo 4 (HAS); siendo las significaciones estadísticas con ambos Ac Mo y entre los distintos grupos,las siguientes:

- GRB1 ($P \leq 0,02$) entre el grupo 2 y 4; y ($P \leq 0,05$)

entre el grupo 2 y 1.

- OKIa ($P \leq 0,02$) entre el grupo 2 y el 4, y la misma significación ($P \leq 0,02$) entre el 2 y el 1. Entre los demás grupos, no hubo diferencias significativas.

Respecto al Ag T10, su expresión mayor correspondió - al grupo 3 (AF) y la menor al grupo 4 (HAS), aúnque considerándolos por la presencia o no de hiperplásia amigdalar, la mayor expresión se dió en los grupos hipoplásicos (2 y 3) y la menor en los hiperplásicos (1 y 4) - con diferencias estadísticamente significativas entre:

- Grupos 3 y 4 ($P \leq 0,001$).
- Grupos 2 y 4 ($P \leq 0,01$).
- Grupos 3 y 1 ($P \leq 0,01$).

Con el resto de marcadores, las diferencias en la expresión de cada uno de ellos en los distintos grupos, no revelaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, considerándolos en conjunto, cabe señalar una mayor expresión de antígenos de "madurez celular" en los grupos con hiperplásia amigdalar (1 y 4) -- que en los que presentan hipoplásia (2 y 3); con la excepción de las inmunoglobulinas de superficie que presenta la máxima expresión en el grupo 2 (AR sin HA). -- Por el contrario los Ag de inmadurez celular (J-5, GR21

TABLA III

Expresion de marcadores sobre linfocitos totales de los diferentes grupos clinicos de amigdalas de niños.

| Marcadores | AR con HA | AR sin HA | A F | HAS |
|---|---|---|---|---|
| GRB1 | 68,6 ± 6,0 | 62,2 ± 4,7 | 67,3 ± 4,3 | 70,2 ± 4,5 |
| OKia | 68,0 ± 4,8 | 61,4 ± 3,8 | 66,8 ± 5,1 | 68,2 ± 4,9 |
| IgS | 31,2 ± 3,0 | 35,7 ± 2,4 | 26,0 ± 1,9 | 31,2 ± 3,3 |
| GR2110 | 18,2 ± 2,7 | 19,2 ± 2,4 | 20,6 ± 3,0 | 17,1 ± 1,8 |
| J-5 | 21,4 ± 2,7 | 27,3 ± 3,0 | 19,0 ± 1,6 | 25,7 ± 3,0 |
| WT1 | 28,2 ± 4,0 | 25,2 ± 1,6 | 17,6 ± 3,8 | 31,4 ± 3,3 |
| OKT3 | 35,5 ± 3,7 | 31,1 ± 2,6 | 27,8 ± 3,2 | 37,8 ± 2,5 |
| OKT4 | 26,6 ± 3,2 | 24,1 ± 2,1 | 20,8 ± 1,8 | 28,5 ± 1,6 |
| OKT8 | 11,6 ± 2,6 | 9,2 ± 3,2 | 8,4 ± 1,2 | 12,5 ± 2,0 |
| T4/T8 | 2,29 | 2,61 | 2,47 | 2,28 |
| OKT11 | 36,3 ± 4,0 | 32,9 ± 3,5 | 28,4 ± 3,1 | 38,7 ± 4,9 |
| GRM1 | 6,3 ± 0,8 | 5,5 ± 1,0 | 5,2 ± 0,8 | 7,1 ± 1,3 |
| OKM1 | 9,7 ± 1,2 | 8,4 ± 0,9 | 7,7 ± 1,0 | 11,2 ± 1,9 |
| OKT10 | 29,0 ± 6,4 | 34,6 ± 5,6 | 39,5 ± 4,6 | 24,4 ± 2,2 |
| SMR | 4,2 ± 1,8 | 5,5 ± 0,5 | 4,6 ± 1,4 | 4,3 ± 0,5 |
| PBS | 3,0 ± 1,5 | 3,3 ± 2,4 | 3,8 ± 1,1 | 3,9 ± 1,8 |

AR con HA = Amigdalitis recurrente con hipertrofia amigdalar

AR sin HA = Amigdalitis recurrente sin hipertrofia amigdalar

A F = Amigdalitis focal

HAS = Hipertrofia amigdalar simple

Análisis de la varianza. t de Student para muestras independientes.

10) y el ya comentado OKT10, tienden a presentar una mayor expresión en los grupos de amigdalas hipoplásicas - (2 y 3) que en los de amigdalas hiperplásicas (1 y 4) - siendo significativo dicho incremento como ya se ha indicado en el caso del Ag T10. En resumen, estos resultados nos han permitido constatar un relativo descenso de Ag de "madurez celular" y un relativo aumento de los Ag de inmadurez (en algunos casos estadísticamente significativo) en los grupos de amigdalas hipoplásicas.

Los controles negativos, siguen una expresión paralela en todos los grupos, siendo sus porcentajes similares a los descritos en la Tabla I.

4.- EXPRESION DE MARCADORES EN LINFOCITOS DE AMIGDALA SEPARADOS POR ADHERENCIA A FIBRA DE NYLON. (TABLA IV).

Con la separación de linfocitos totales de amigdala de 5 niños por adherencia a la fibra de nylon, observamos que la alícuota de linfocitos adherentes (LB) es aproximadamente igual de numerosa que la no adherente (LT?).

Los resultados de la expresión de marcadores en ambas

fracciones por las tecnicas de IFD e IFI, se expone en la Tabla IV. Cabe destacar, la mayor pureza de la fracción de linfocitos adherentes (LB), donde los Ac Mo especificos de linfocitos T, son invariablemente negativos, alcanzando altos porcentajes la expresión de Ag Ia (86,2 y 86,8% para GRB1 y OKia respectivamente). Por su parte, las células con Ig de superficie no alcanzan la proporción de las portadoras de Ag Ia, quedandose en 63,4%, que representa la proporción de LB maduros dentro de esta población no adherente.

La expresión de las células portadoras de Ag GR2110 y J-5, no se eleva en la misma proporción que las anteriores (26,6% el GR2110 y 27,6% el J-5); y si tenemos en cuenta que su expresión en la fracción de células no adherentes (LT) es nula para el J-5 y de un 4,6% para el GR2110, debemos pensar que muchas de las células deterioradas al practicar la tecnica de separación, pertenecen a este grupo.

Por último, en esta fracción adherente, vemos un pequeño porcentaje (7,0%) de células con el Ag WT1.

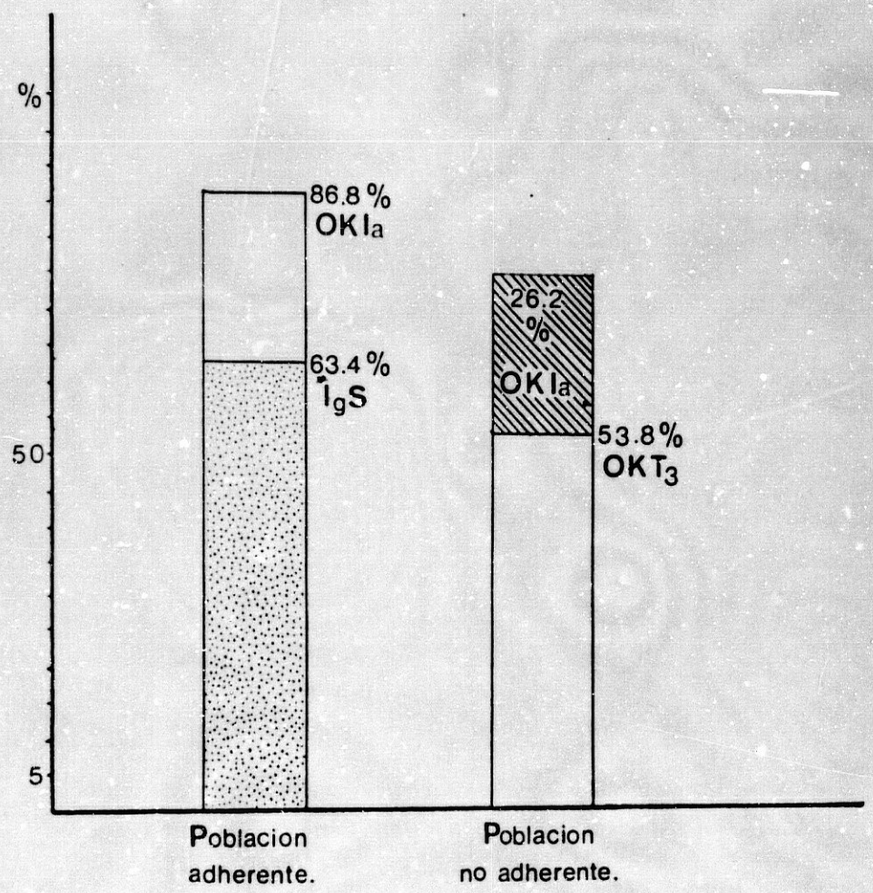
Respecto a la fracción no adherente (LT), cabe resaltar que la expresiónde marcadores especificos de LT, no superan el 53,8% (expresion de OKT3); siendo las subpoblaciones T4 y T8 (L Helper y Supresores respectivamente), de 37,6 y 13,6% respectivamente; con un cociente T4/T8 de 2,76, ello sugiere

TABLA IV

Expresión de marcadores en linfocitos de amigdala separados por adherencia a fibra de nylon.

| Marcadores | población adherente Linfocitos B | población no adherente Linfocitos T |
|---|---|---|
| GRB1 | 86,2 ± 8,6 | 23,6 ± 9,4 |
| OKIa | 86,8 ± 8,9 | 26,2 ± 10,6 |
| IgS | 63,4 ± 8,4 | 7,3 ± 6,8 |
| GR2110 | 26,6 ± 5,8 | 4,6 ± 5,0 |
| J-5 | 27,6 ± 5,3 | (-) |
| WT1 | 7,0 ± 6,1 | 35,7 ± 8,2 |
| OKT3 | (-) | 53,8 ± 7,3 |
| OKT4 | (-) | 37,6 ± 8,3 |
| OKT8 | (-) | 13,6 ± 5,7 |
| T4/T8 | (-) | 2,76 |
| OKT11 | (-) | 53,5 ± 9,1 |
| SNR | 6,2 ± 5,9 | 2,8 ± 2,7 |
| PBS | 4,0 ± 2,5 | 2,6 ± 2,5 |

Figura 4: Representacion grafica de la caracterizacion de linfocitos de amigdala fraccionados por adherencia a fibra de nylon.



que la subpoblación T8 supresora no se eleva en la misma proporción que la subpoblación T4 Helper, si bien esta apreciación no es significativa. Así pues, en esta fracción estamos en presencia de un gran porcentaje (aproximadamente 46,2%) de células no adherentes que no son LT. (Vease fig4 ).

Tambien cabe resaltar, la presencia de células con Ag Ia y células con Ig de superficie, éstas en escasa cantidad (7,3%) y aquellas en unos porcentajes que oscilan entre 23,6 y 26,2%, lo cual puede corresponder a LT activados, o bien a células estacionarias como las CID o CFD,o a linfocitos B no adherentes.

Los controles negativos, si bien expresaron unos porcentajes muy bajos, aquí se aprecia una discreta elevación en la fracción adherente (6,2% para SNR y 4,0% con el PBS, , siendo practicamente despreciables sus expresiones en la fracción no adherente.

## 5.- Fraccionamiento de linfocitos de amigdala por citotóxicidad mediada por complemento.

### 5.1,-Lisis con el Ac Mo OKT3 mas complemento (C)

Tras lisar como se describe en material y métodos una alicuota de 15 x $10^6$ L totales de amigdala, se redujo la cantidad a 8 x $10^6$ en los dos casos estudiados, a los cuales, se les practicó por IFD e IFI, la bateria de Ac Mo representados en

la Tabla V junto con sus respectivos porcentajes de positividad. En dicha Tabla, podemos observar que las células portadoras de Ag Ia y de Ig de superficie, tienen unos porcentajes (88,2% para GRB1 y 63,4% para IgS) paralelos al que expresaron estos mismos marcadores en la fracción adherente al nylon (vease Tabla IV). Sin embargo, la expresión de células con los Ag GR2110 y J-5, se concentran en esta fracción ausente de LT en mayor proporción (46,0% el GR2110 y 37,5% el J-5) que en el experimento anterior; debido probablemente al menor porcentaje de células deterioradas con esta tecnica (aproximadamente 13%). Si al mismo tiempo, observamos la Tabla VI, vemos que tambien hay células GR2110 (10%) y J-5 (6,6%) que no contienen los Ag Ia, pudiendo corresponder a otra estirpe celular distinta. De hecho, así parece ser en el caso del GR2110, ya que como se verá en los cortes histológicos, a los que se les practica la IFI con este Ac Mo, se demuestra que las células que reaccionan con GR2110 se localizan de -- forma nítida a nivel del epitelio criptico amigdalar, y en menor cantidad, en el interior de los foliculos linfoides.

Por su parte, el Ac Mo WT1, tambien se expresa en un -- bajo porcentaje (9,8%), indicando que todas las células con el Ag WT1, no comparten el Ag T3.

5.2.- Lisis con el Ac Mo OKia + C

Para obtener una cantidad de células, similar al experimento anterior, se partió de $25 \times 10^6$ L totales en cada uno de los 3 casos estudiados. Esta cantidad, tras lisarse con OKia + C como se describe en material y métodos, se redujo a $9 \times 10^6$ células, a las cuales se les aplicó la misma bateria de Ac Mo que en el experimento citotóxico anterior, y cuyos resultados se expresan en la Tabla VI.

Aqui destaca, como cabría esperar, la abundancia de células con el Ag T3 (73,4%) y WT1 (65,6%), pero aunque esta población es mas rica en LT que su homónima de células no adherentes a la fibra del nylon, no parece constituir una población pura de linfocitos T como se podía esperar si la comparamos con la expresión de Ag Ia tras lisar con OKT3 + C. Ello sugiere nuevamente, al igual que sucedió en el experimento anterior, que existe una población de L en amigdala que no expresan ni Ag Ia, ni Ag específicos de LT (OKT3). Entre esta población, se encuentran probablemente como ya se ha indicado: Algunas células con el Ag GR2110 (10%), otra fracción menor con el Ag CALLA (6,6%), y probablemente, la fracción con el Ag WT1 (9,8%) que no se lisó con el OKT3 + C. En la Fig5 , se ilustra para mayor comprensión, las distintas poblaciones celulares linfoides tras los experimentos de citotóxicidad.

TABLA V

Expresión de marcadores en linfocitos supervivientes a la lisis de linfocitos totales de amigdala con -- OKT3 + C.

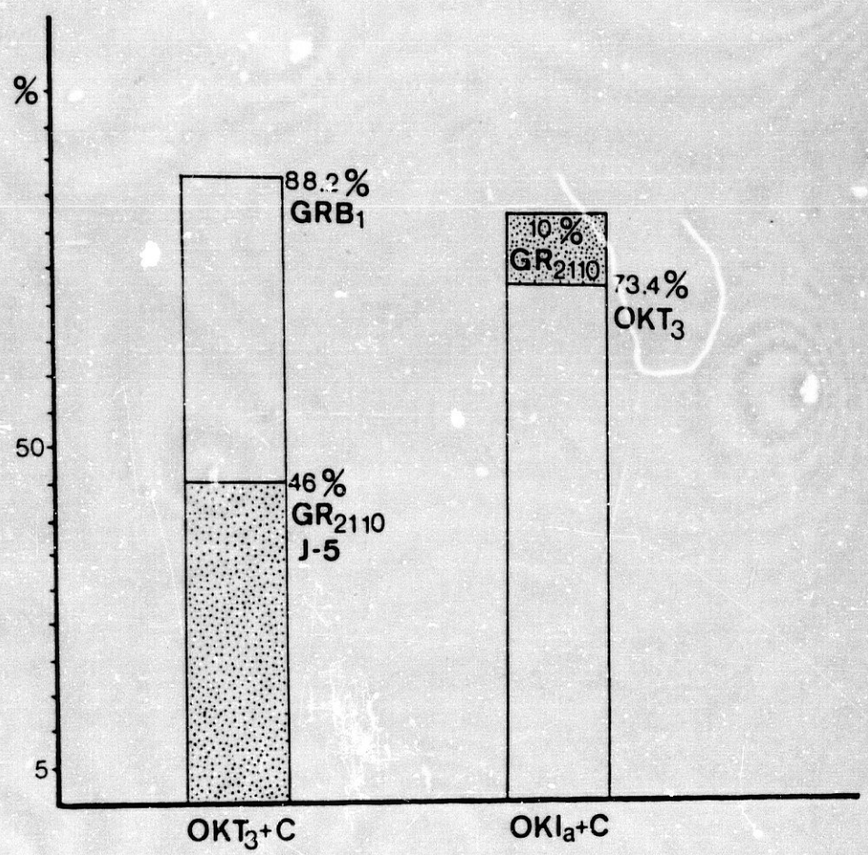
| Marcadores | Expresión % |
|---|---|
| GRB1 | 88,2 |
| IgS | 63,4 |
| GR2110 | 46,0 |
| J-5 | 37,5 |
| WT1 | 9,8 |
| OKT3 | 0 |
| SNR | 0 |

TABLA VI

Expresión de marcadores en linfocitos supervivientes a la lisis de linfocitos totales de amigdala con -- OKIa + C.

| Marcadores | Expresión % |
|---|---|
| GRB1 | 0 |
| IgS | 2,7 |
| GR2110 | 10,0 |
| J-5 | 6,6 |
| WT1 | 65,5 |
| OKT3 | 73,4 |
| SNR | 0 |

Figura **5**: Representación gráfica de la caracterización fenotipica de las poblaciones linfoides de amigdala supervivientes a los ensayos de lisis por complemento.



## 6.- ENSAYOS DE FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LINFOCITOS TOTALES DE AMIGDALA POR EL METODO DE PERCOLL.

### 6.1.- Cuantificación de células en los halos obtenidos por fraccionamiento en gradiente discontínuo de Percoll.

Los resultados de la cuantificación celular de cada uno de los 14 halos en las 10 amigdalas estudiadas por este método se muestran en las figuras 6 y 7 , y en las tablas VII y VIII; expresandose en porcentajes respecto de la suma total de células de todos los halos. Como se expone en material y métodos, las células se cuentan en cámara de Neubauer apreciandose su viabilidad por contraste de fase. En este sentido, cabe señalar que en los cuatro primeros halos consecutivos (los correspondientes a los gradientes de menor densidad de Percoll) existía un porcentaje variable de células muertas en todos los casos estudiados. En el resto de los halos la mortalidad celular fue nula. No obstante, los porcentajes que se expresan en las tablas mencionadas corresponden a células vivas.

Tras el contaje celular de todos los halos en los 10 casos se apreció que 6 de los 10 casos presentaban un patrón de distribución celular similar entre sí, pero distinto al de los 4 casos restantes, que a su vez también eran

similares entre sí, por lo que atendiendo a este resultado, las amigdalas estudiadas por este método se clasificaron en dos grupos:

GRUPO I.- Constituido por 6 amigdalas cuyo patrón de distribución se expresa en la tabla VII y figura 6. Se comprobó que dichos casos pertenecían a los grupos clínicos que se habían caracterizado por presentar hiperplásia amigdalar, concretamente: 4 casos de amigdalitis recurrente con hipertrófia amigdalar (AR con HA) y 2 casos de hipertrófia amigdalar simple (HAS).

GRUPO II.- Constituido por 4 amigdalas cuyo patrón de distribución se expresa en la tabla VIII y figura 7. Se comprobó que estos 4 casos pertenecían a los grupos clínicos que se habían caracterizado por presentar hipoplásia amigdalar, concretamente: 3 casos de amigdalitis recurrente sin hipertrófia amigdalar (AR sin HA) y 1 caso de amigdalitis focal (AF).

Sobre el halo superior fue depositada la suspensión celular de $90 \times 10^6$ linfocitos totales (células mononucleares), repartida en dos tubos de vidrio de 22 $cm^3$ de capacidad cada uno. La figura 1 corresponde a una de las experiencias.

Los resultados de los porcentajes de distribución se compararon estadísticamente por el Test de la t de Student para muestras independientes, para cada halo de ambos grupos. Sólo aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en el halo I. La cantidad de células en este halo en las amigdalas del grupo II fue mayor que en las del grupo I ($P \leq 0,001$). En el resto de los halos entre ambos grupos, no existieron diferencias estadísticamente significativas.

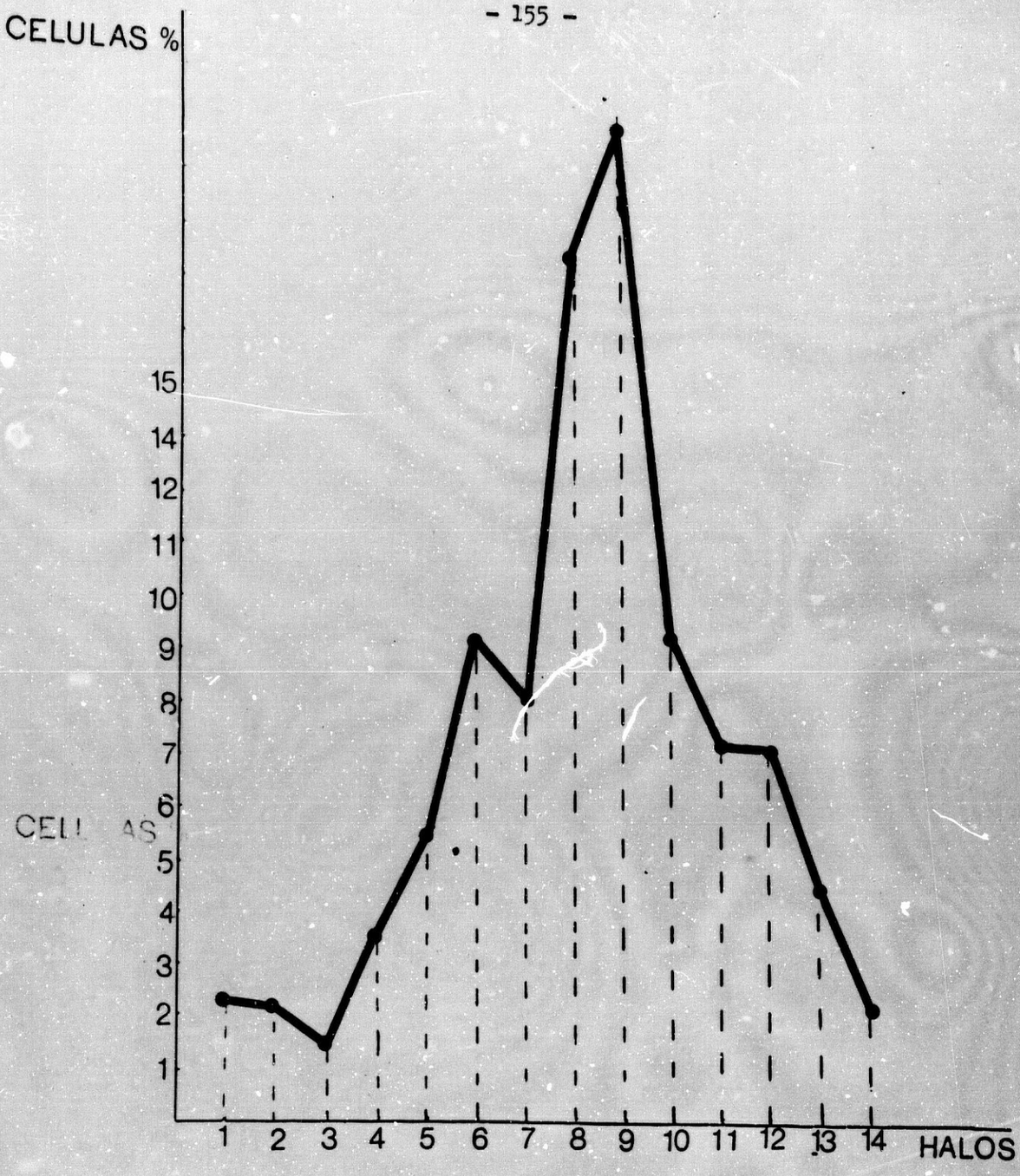



FIGURA 6

Representacion grafica de la distribucion porcentual de celulas en los halos de las amigdalas del grupo I

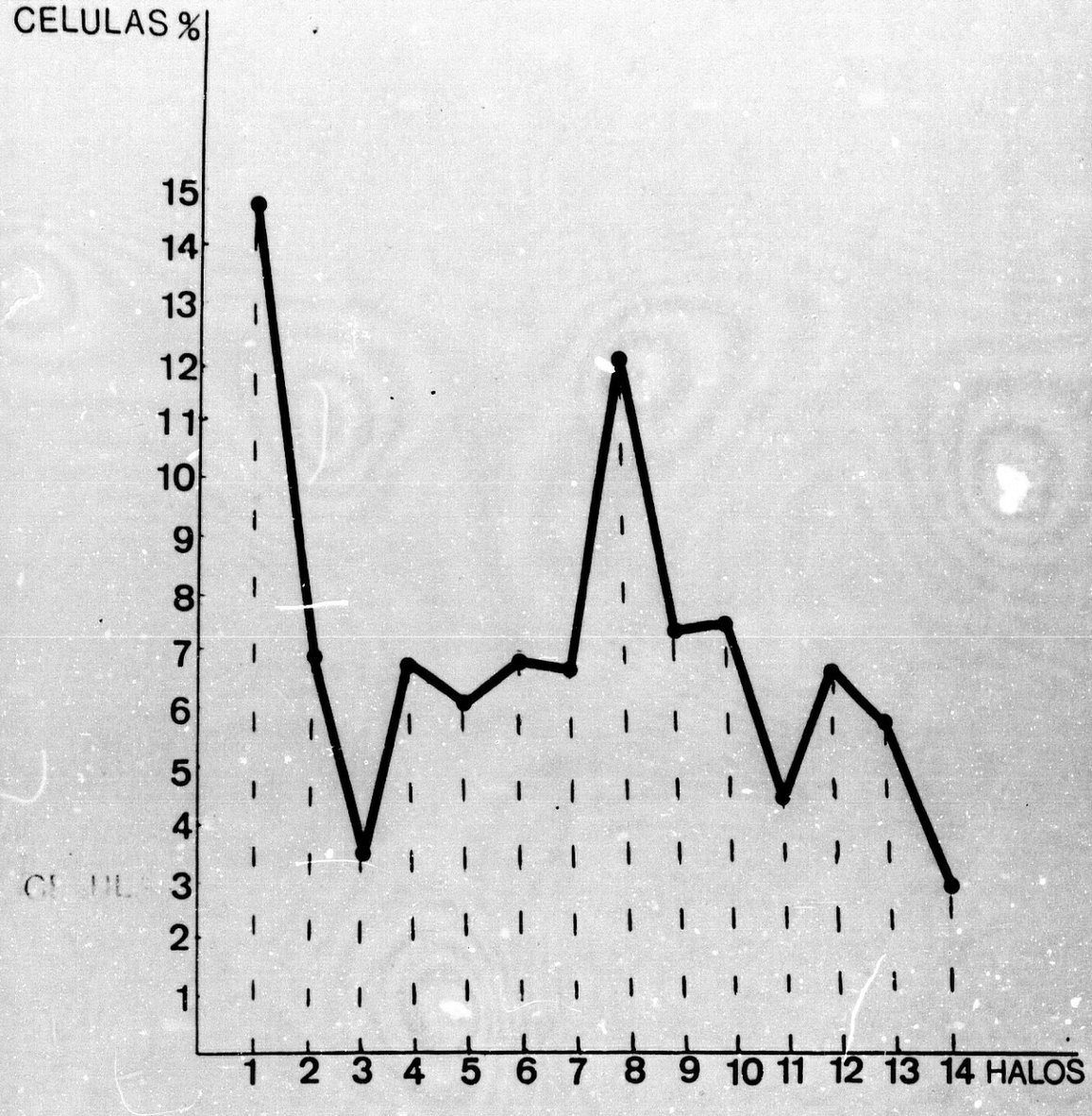



FIGURA 7

Representacion grafica de la distribucion porcentual de celulas en los halos de las amigdalas del grupo II

## TABLA VII

Distribución porcentual de células en los halos obtenidos por Percoll.

GRUPO I: AMIGDALAS CON HIPERPLASIA

| HA-LOS | Caso 4 de HAS 5 años | Caso 2 de AR con HA 4 años | Caso 11de AR con HA 4 años | Caso 9 de AR con HA 5 años | Caso 7 de HAS 5 años | Caso 12 de AR con HA 5 años | % células en los halos $\bar{X} \pm SD$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,3 | 0,9 | 2,6 | 2,5 | 3,0 | 2,5 | 2,3 ± 0,8 |
| 2 | 2,1 | 0,8 | 2,0 | 1,8 | 2,5 | 4,3 | 2,2 ± 1,1 |
| 3 | 1,6 | 0,9 | 1,5 | 2,1 | 1,6 | 1,4 | 1,5 ± 0,3 |
| 4 | 3,5 | 3,4 | 1,5 | 2,4 | 2,5 | 8,9 | 3,7 ± 2,6 |
| 5 | 6,2 | 2,9 | 3,4 | 3,7 | 4,0 | 14,3 | 5,7 ± 4,3 |
| 6 | 8,5 | 9,5 | 6,0 | 2,9 | 8,0 | 19,6 | 9,0 ± 5,6 |
| 7 | 7,7 | 5,5 | 10,1 | 9,3 | 9,2 | 7,1 | 8,1 ± 1,6 |
| 8 | 17,5 | 17,1 | 14,9 | 14,6 | 14,0 | 21,4 | 16,6 ± 2,7 |
| 9 | 20,0 | 39,5 | 12,0 | 25,6 | 11,1 | 8,0 | 19,3 ± 11,8 |
| 10 | 8,5 | 5,9 | 10,1 | 15,4 | 10,0 | 5,3 | 9,1 ± 3,6 |
| 11 | 7,5 | 7,9 | 12,0 | 2,0 | 11,3 | 2,8 | 7,5 ± 4,3 |
| 12 | 6,9 | 2,9 | 13,8 | 5,2 | 13,0 | 2,6 | 7,4 ± 4,9 |
| 13 | 3,2 | 1,8 | 8,0 | 6,4 | 7,0 | 1,7 | 4,6 ± 2,7 |
| 14 | 1,3 | 0,9 | 2,1 | 5,8 | 1,9 | 0,0 | 2,0 ± 2,0 |

TABLA VIII

Distribución porcentual de células en los halos obtenidos por Percoll.

GRUPO II : AMIGDALAS SIN HIPERPLASIA

| HA-LOS | Caso 2 de AR sin HA 5 años | Caso 4 de AR sin HA 5 años | Caso 6 de AF 5 años | Caso 6 de AR sin HA 5 años | % células en los halos $\bar{X} \pm SD$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 15,0 | 15,2 | 16,1 | 12,6 | $14,7 \pm 1,4$ |
| 2 | 5,7 | 8,3 | 6,3 | 7,5 | $6,9 \pm 1,1$ |
| 3 | 1,5 | 1,8 | 6,1 | 4,7 | $3,5 \pm 2,2$ |
| 4 | 5,7 | 12,2 | 4,2 | 4,8 | $6,7 \pm 3,7$ |
| 5 | 6,8 | 8,3 | 5,1 | 4,7 | $6,2 \pm 1,6$ |
| 6 | 6,8 | 10,0 | 2,6 | 8,1 | $6,8 \pm 3,1$ |
| 7 | 8,3 | 4,8 | 6,1 | 7,6 | $6,7 \pm 1,5$ |
| 8 | 9,3 | 25,1 | 8,1 | 7,4 | $12,4 \pm 8,4$ |
| 9 | 5,8 | 3,6 | 8,2 | 12,0 | $7,4 \pm 3,5$ |
| 10 | 7,4 | 2,3 | 11,1 | 9,7 | $7,6 \pm 3,8$ |
| 11 | 6,6 | 2,9 | 6,1 | 3,7 | $4,8 \pm 1,8$ |
| 12 | 12,4 | 1,8 | 7,1 | 5,7 | $6,7 \pm 4,3$ |
| 13 | 5,3 | 0,7 | 9,2 | 8,6 | $5,9 \pm 3,8$ |
| 14 | 2,9 | 1,8 | 4,2 | 2,8 | $2,9 \pm 0,9$ |

6.2.- Caracterización fenotípica de las fracciones celulares separadas.

En la caracterización fenotipica de las células obtenidas en los halos, se han empleado los marcadores que se expresan en las tablas IX y X. Como se observa, se han utilizado las inmunoglobulinas de superficie IgM e IgD que no se habían usado anteriormente. Ello fue con el fin de observar distintos estadíos madurativos de linaje B en los distintos halos.

En la tabla IX se expresan la media de los porcentajes obtenidos en los seis casos del Grupo I (caracterizado por la hiperplásia amigdalar) tras la aplicación de tales marcadores en cada uno de los 14 halos.

En la tabla X se expresan de igual forma los mismos marcadores aplicados sobre los cuatro casos del Grupo II (caracterizado por la hipoplásia amigdalar). Se han subdividido en estos dos grupos debido a la aparición de dos patrones distintos de distribución celular, como ya se ha indicado.

En general, en ambas tablas se puede observar una expresión similar de marcadores a lo largo de los halos. Se han comparado estadísticamente con el test de la t de Student

para muestras independientes los resultados de la expresión de dichos marcadores en ambos grupos y sólo ha habido diferencias estadísticamente significativas entre los Ac Mo -- OKT10 y GR2110 en algunos halos, así:

El Ac Mo OKT10 tiene mayor expresión en los cuatro primeros halos del Grupo II que en los correspondientes del -- Grupo I.

Halo 1 ($P \leq 0,001$)

Halo 2 ($P \leq 0,001$)

Halo 3 ($P \leq 0,001$)

Halo 4 ($P \leq 0,05$)

El Ac Mo GR2110 tiene mayor expresión en el halo 1 del Grupo II que en el correspondiente del Grupo I ($P \leq 0,05$). Se han considerado resultados negativos (-), todos aquellos cuyo porcentaje ha sido en general inferior a 5, de ahí que no se hayan considerado las diferencias en la expresión de J-5 en los halos 9, 10, 12 y 13 como estadísticamente significativas.

En las figuras 8 y 9 se expresan gráficamente las diferencias estadísticamente significativas encontradas en la caracterización de los halos de ambos grupos de amigdalas.

En las tablas XI y XII se exponen por separado los re-

sultados de la Tabla IX corresponciente a las amigdalas del Grupo I, indicandose en la primera de ellas, la expresión de marcadores utilizados para identificar fundamentalmente la línea celular B, y en la segunda la de los marcadores de la línea celular T y la enzima TdT. Igualmente en las Tablas XIII y XIV, se separan siguiendo la misma pauta los resultados de la Tabla X correspondiente al Grupo II de amigdalas.

En la figura 10 se esquematiza la expresión en los distintos halos de todos los marcadores estudiados y podemos ver que los marcadores de inmadurez (GR2110, J-5) y en general todos los correspondientes al linaje celular B, predominan en los halos pertenecientes a la menor densidad de Percoll, estando las células definidas por J-5 sobre todo en los dos primeros, las definidas por GR2110 entre los 6 y 7 primeros, y el resto de marcadores de LB distribuidos en distintos porcentajes decrecientes hasta los halos 10 a 11, en donde ya aparece una expresión significativa de marcadores de la línea celular T.

La expresión de GR2110, fue además estudiada sobre cortes criostáticos de amigdala. La fig 11, corresponde a un corte de amigdala de un enfermo de AR con HA donde se puede observar la localización de la positividad para este

Ac Mo, sobre centro germinal. Sin embargo, cabe resaltar también la positividad a nivel del epitelio críptico. En la figura 12, se recoge un detalle a mayor aumento, de la positividad de este Ac Mo sobre el epitelio críptico.

En la figura 10, además, se esquematiza a la vista de los fenotipos expresados en los distintos halos, los distintos tipos celulares dentro de la diferenciación celular B a que dichos fenotipos expresados pudieran corresponder, así como la localización de la población linfoide T, así:

- Los centroblastos se concentran en los halos 1 y 2, y en menor proporción en el tercer y cuarto halo.
- Los centrocitos entre los halos 3 y 6. Aquí, cabe resaltar que los centroblastos y centrocitos del Grupo II (amigdalas hipoplásicas) como se ve en la Tabla X y figura 10, tambien expresan el antígeno T10.
- Inmunoblastos y linfocitos B memoria, se concentran entre los halos 5 y 8 donde la expresión de inmunoglobulinas desciende.
- Células linfoplasmocitoides y células plasmáticas, aparecen entre los halos 7 y 10, donde existe la mayor expresión de T10 en ambos grupos. Aquí cabe decir que la intensidad de fluorescencia del Ac Mo OKT10 es mayor que en el resto de los halos.

- Linfocitos T activados y linfocitos T maduros en grado creciente, se expresan entre los halos 9 y 14, siendo en este último, linfocitos T fundamentalmente "Helper" T4 (+).

A modo de ilustración, los linfocitos totales de una amigdala (caso 4 de AR con HA) fueron fraccionados por este método de Percoll. Las células de cada halo fueron teñidas con la tinción de May Grunwald Giemsa y posteriormente fotografiadas. En las figuras 13 y 14, se aprecian elementos compatibles con células centrofoliculares (centroblastos y centrocitos) pertenecientes a los halos de la mitad superior del fraccionamiento (1 y 3 respectivamente). En las figuras 15 y 16, se aprecian elementos linfoides pertenecientes a halos de mayor densidad (linfocitos T), (10 y 13 respectivamente.

TABLA IX

Expresión de marcadores en las células de los 14 halos obtenidos por el método del Percoll: GRUPO I. n=6 ; $\bar{X} \pm SD$.

| Marcadores | Halo 1 | Halo 2 | Halo 3 | Halo 4 | Halo 5 | Halo 6 | Halo 7 | Halo 8 | Halo 9 | Halo 10 | Halo 11 | Halo 12 | Halo13 | Halo 14 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IgS | 29,3 ± 4,2 | 32,0 ± 5,6 | 50,2 ± 5,4 | 50,3 ± 4,3 | 44,6 ± 4,4 | 31,6 ± 4,1 | 9,0 ± 2,6 | 7,5 ± 2,8 | (-) | (-) | 12,3 ± 3,0 | 10,0 ± 3,0 | 12,0 ± 2,0 | 10,1 ± 2,3 |
| IgM | 28,5 ± 4,3 | 32,6 ± 8,1 | 49,1 ± 7,4 | 49,3 ± 6,1 | 42,1 ± 3,1 | 23,5 ± 2,6 | 10,8 ± 1,9 | 8,1 ± 1,5 | (-) | (-) | 8,5 ± 1,8 | 8,0 ± 3,4 | 9,8 ± 2,3 | 9,6 ± 2,5 |
| IgD | 6,1 ± 1,1 | 7,5 ± 1,9 | 6,0 ± 3,7 | 24,6 ± 2,5 | 34,0 ± 10,6 | 12,0 ± 3,8 | 9,3 ± 5,6 | 4,0 ± 1,5 | (-) | (-) | 7,1 ± 1,3 | (-) | (-) | (-) |
| OKB1 | 95,8 ± 1,4 | 93,3 ± 3,1 | 88,6 ± 2,5 | 89,0 ± 2,2 | 81,8 ± 2,3 | 79,0 ± 5,9 | 76,6 ± 3,0 | 75,3 ± 3,8 | 72,6 ± 5,0 | 63,1 ± 3,6 | 49,0 ± 3,7 | 43,1 ± 4,9 | 28,5 ± 4,8 | 17,3 ± 3,0 |
| OKM2110 | 13,0 ± 7,4 | 51,3 ± 7,8 | 41,0 ± 4,1 | 33,6 ± 4,5 | 47,3 ± 11,5 | 51,5 ± 5,0 | 37,1 ± 16,3 | 11,3 ± 6,1 | 15,6 ± 2,9 | 12,0 ± 7,5 | (-) | (-) | 8,6 ± 2,1 | 17,8 ± 11,5 |
| J-5 | 50,0 ± 4,3 | 58,3 ± 11,8 | 18,3 ± 2,9 | 17,0 ± 3,3 | 11,6 ± 2,1 | 10,5 ± 2,1 | 13,0 ± 9,4 | (-) | (-) | (-) | 19,2 ± 3,6 | 15,2 ± 1,1 | 7,5 ± 2,0 | 18,2 ± 3,0 |
| WT1 | (-) | (-) | (-) | (-) | 6,0 ± 2,6 | 12,3 ± 3,0 | 16,8 ± 4,4 | 18,6 ± 3,0 | 23,1 ± 3,1 | 23,5 ± 4,6 | 38,1 ± 4,6 | 28,5 ± 2,8 | 19,3 ± 2,1 | 9,1 ± 8,9 |
| OKT3 | (-) | (-) | (-) | (-) | 4,8 ± 6,1 | 24,1 ± 7,8 | 28,6 ± 7,2 | 29,6 ± 6,4 | 28,3 ± 8,1 | 28,6 ± 3,5 | 42,3 ± 4,7 | 52,3 ± 6,2 | 74,1 ± 10,7 | 86,8 ± 5,8 |
| OKT4 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 12,3 ± 2,5 | 16,5 ± 6,1 | 15,0 ± 5,5 | 14,8 ± 4,7 | 11,3 ± 9,6 | 27,3 ± 2,5 | 31,1 ± 7,5 | 42,0 ± 5,8 | 57,5 ± 9,1 |
| OKT8 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 6,0 ± 1,4 | 4,8 ± 4,1 | 13,1 ± 6,9 | 7,5 ± 4,5 | 6,5 ± 3,4 | 13,0 ± 1,8 | 10,1 ± 2,7 | 39,6 ± 12,5 | 15,0 ± 4,5 |
| OKT10 | 5,0 ± 2,8 | 4,5 ± 3,8 | 8,0 ± 1,4 | 7,0 ± 1,5 | 22,5 ± 3,2 | 57,8 ± 4,9 | 73,3 ± 10,6 | 66,3 ± 3,6 | 56,3 ± 12,6 | 53,0 ± 8,9 | 39,5 ± 10,0 | 7,3 ± 2,1 | (-) | (-) |
| TdT | (-) | (-) | (-) | ? | (-) | ? | (-) | ? | ? | ? | (-) | (-) | (-) | (-) |
| SAP | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| SmR | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | ? | ? | ? | ? |

n = número de casos estudiados

? = no testado

TABLA X

Expresión de marcadores en las células de los 14 Halos obtenidos por el método del Percoll: GRUPO II. n = 4 ; $\bar{X} \pm SD$

GRUPO II.

| Marcadores | Halo 1 | Halo 2 | Halo 3 | Halo 4 | Halo 5 | Halo 6 | Halo 7 | Halo 8 | Halo 9 | Halo 10 | Halo 11 | Halo 12 | Halo 13 | Halo 14 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IgG | 38,0 ± 2,1 | 36,2 ± 11,8 | 54,7 ± 4,2 | 39,5 ± 12,7 | 44,0 ± 7,7 | 38,5 ± 7,3 | 20,7 ± 4,7 | 7,1 ± 2,5 | (-) | (-) | 13,7 ± 3,3 | 11,7 ± 2,5 | 9,0 ± 0,8 | 9,5 ± 1,2 |
| IgM | 35,5 ± 9,8 | 34,7 ± 5,2 | 54,5 ± 7,6 | 38,5 ± 8,8 | 38,2 ± 9,1 | 28,0 ± 4,3 | 21,5 ± 3,1 | 10,5 ± 1,7 | (-) | (-) | 10,5 ± 1,2 | 10,0 ± 2,1 | 8,5 ± 1,2 | 9,5 ± 0,5 |
| IgD | 8,5 ± 5,1 | 7,0 ± 1,8 | 8,2 ± 4,7 | 23,5 ± 11,4 | 36,7 ± 9,6 | 12,0 ± 4,3 | 6,7 ± 3,5 | 5,7 ± 2,2 | (-) | (-) | 8,2 ± 1,7 | (-) | (-) | (-) |
| OKB1 | 96,2 ± 3,5 | 93,5 ± 2,6 | 90,0 ± 1,6 | 89,2 ± 2,5 | 82,5 ± 2,3 | 80,2 ± 3,5 | 77,0 ± 2,9 | 74,5 ± 5,2 | 66,7 ± 4,0 | 59,5 ± 1,2 | 48,0 ± 5,2 | 42,5 ± 4,2 | 29,5 ± 7,4 | 15,7 ± 1,7 |
| OK2110 | 59,5 ± 12,2 | 44,0 ± 9,1 | 49,7 ± 4,6 | 41,2 ± 10,1 | 43,7 ± 10,6 | 68,7 ± 9,6 | 41,2 ± 5,3 | 21,7 ± 6,9 | 15,6 ± 2,9 | 9,4 ± 5,6 | (-) | (-) | 15,0 ± 6,6 | 15,7 ± 3,5 |
| J-5 | 51,5 ± 2,3 | 44,5 ± 6,2 | 14,2 ± 4,3 | 20,7 ± 7,4 | 8,7 ± 1,7 | 12,2 ± 9,5 | 8,0 ± 1,8 | (-) | 9,0 ± 2,9 | 10,2 ± 4,0 | 17,4 ± 3,8 | (-) | (-) | 12,3 ± 4,7 |
| WT1 | (-) | (-) | (-) | (-) | 7,0 ± 4,2 | 21,0 ± 10,1 | 22,5 ± 5,2 | 19,7 ± 7,1 | 21,7 ± 8,1 | 14,7 ± 2,2 | 31,7 ± 4,1 | 17,0 ± 2,5 | 8,0 ± 0,8 | (-) |
| OKT3 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 30,5 ± 14,4 | 33,0 ± 6,0 | 28,5 ± 11,0 | 39,0 ± 8,6 | 41,7 ± 6,5 | 41,2 ± 3,7 | 51,5 ± 2,5 | 72,2 ± 3,5 | 84,2 ± 5,5 |
| OKT4 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 15,7 ± 9,5 | 16,6 ± 3,5 | 18,0 ± 9,0 | 21,0 ± 9,8 | 7,0 ± 1,1 | 28,5 ± 3,0 | 29,5 ± 2,0 | 43,0 ± 2,1 | 20,5 ± 5,9 |
| OKT6 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 8,2 ± 2,6 | 7,6 ± 2,0 | 7,5 ± 3,4 | 8,2 ± 1,7 | 25,5 ± 9,1 | 14,0 ± 2,1 | 18,0 ± 2,9 | 28,2 ± 2,0 | 48,7 ± 1,5 |
| OKT10 | 59,2 ± 2,9 | 45,7 ± 2,9 | 46,7 ± 1,2 | 43,0 ± 8,3 | 43,2 ± 4,4 | 54,5 ± 11,8 | 54,0 ± 4,2 | 39,5 ± 13,5 | 54,2 ± 12,6 | 32,5 ± 5,5 | 32,0 ± 6,1 | 5,2 ± 3,7 | (-) | (-) |
| TdT | (-) | (-) | (-) | ? | (-) | ? | (-) | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| FDS | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| SmR | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

n = número de casos estudiados

? = no Testado

## TABLA XI

Expresión de marcadores de la línea celular B en el GRUPO I. $\bar{X} \pm SD$.

| Halos | IgS | IgM | IgD | GRB1 | GR2110 | J-5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 29,3 ± 4,2 | 28,5 ± 4,3 | 6,1 ± 1,1 | 95,8 ± 1,4 | 13,0 ± 7,4 | 50,0 ± 4,3 |
| 2 | 32,0 ± 5,6 | 32,6 ± 8,1 | 7,5 ± 1,9 | 93,3 ± 3,1 | 51,3 ± 7,8 | 58,3 ± 11,8 |
| 3 | 50,2 ± 6,4 | 49,1 ± 7,4 | 6,0 ± 3,7 | 88,6 ± 2,5 | 41,0 ± 4,1 | 18,3 ± 2,9 |
| 4 | 50,3 ± 4,3 | 49,3 ± 6,1 | 24,6 ± 2,5 | 89,0 ± 2,2 | 33,6 ± 4,5 | 17,0 ± 3,3 |
| 5 | 44,6 ± 4,4 | 42,1 ± 3,1 | 34,0 ± 10,6 | 81,8 ± 2,3 | 47,3 ± 11,5 | 11,6 ± 2,1 |
| 6 | 31,6 ± 4,1 | 23,5 ± 2,6 | 12,0 ± 3,8 | 79,0 ± 5,9 | 51,5 ± 5,0 | 10,5 ± 2,1 |
| 7 | 9,0 ± 2,6 | 10,8 ± 1,9 | 9,3 ± 5,6 | 76,6 ± 3,0 | 37,1 ± 16,3 | 13,0 ± 9,4 |
| 8 | 7,5 ± 2,8 | 8,1 ± 1,5 | 4,0 ± 1,5 | 75,3 ± 3,8 | 11,3 ± 6,1 | (-) |
| 9 | (-) | (-) | (-) | 72,6 ± 5,0 | 15,6 ± 2,9 | (-) |
| 10 | (-) | (-) | (-) | 63,1 ± 3,6 | 12,0 ± 7,5 | (-) |
| 11 | 12,3 ± 3,0 | 18,5 ± 1,8 | 17,1 ± 1,3 | 49,0 ± 3,7 | (-) | 19,2 ± 3,6 |
| 12 | 10,0 ± 3,0 | 8,0 ± 3,4 | (-) | 43,1 ± 4,9 | (-) | 15,2 ± 1,1 |
| 13 | 12,0 ± 2,0 | 9,8 ± 2,3 | (-) | 28,5 ± 4,8 | 8,6 ± 2,1 | 7,5 ± 2,0 |
| 14 | 10,1 ± 2,3 | 9,6 ± 2,5 | (-) | 17,3 ± 3,0 | 17,8 ± 11,5 | 18,2 ± 3,0 |

TABLA XII

Expresión de marcadores de la línea celular T en el GRUPO I. $\bar{X} \pm SD$

| Halos | WT1 | OKT3 | OKT4 | OKT8 | OKT10 | TdT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | (-) | (-) | (-) | (-) | 5,0 ± 2,8 | (-) |
| 2 | (-) | (-) | (-) | (-) | 4,5 ± 3,8 | (-) |
| 3 | (-) | (-) | (-) | (-) | 8,0 ± 1,4 | (-) |
| 4 | (-) | (-) | (-) | (-) | 7,0 ± 1,5 | ? |
| 5 | 6,0 ± 2,6 | 4,8 ± 6,1 | (-) | (-) | 22,5 ± 3,2 | (-) |
| 6 | 12,3 ± 3,0 | 24,1 ± 7,8 | 12,3 ± 2,5 | 6,0 ± 1,4 | 57,8 ± 4,9 | ? |
| 7 | 16,8 ± 4,4 | 28,6 ± 7,2 | 16,5 ± 6,1 | 4,8 ± 4,1 | 73,3 ± 10,6 | (-) |
| 8 | 18,6 ± 3,0 | 29,6 ± 6,4 | 15,0 ± 5,5 | 13,1 ± 6,9 | 66,3 ± 3,6 | ? |
| 9 | 23,1 ± 3,1 | 28,3 ± 8,1 | 14,8 ± 4,7 | 7,5 ± 4,5 | 56,3 ± 12,6 | ? |
| 10 | 23,5 ± 4,6 | 28,6 ± 3,5 | 11,3 ± 9,6 | 6,5 ± 3,4 | 53,0 ± 8,9 | ? |
| 11 | 38,1 ± 4,6 | 42,3 ± 4,7 | 27,3 ± 2,5 | 13,0 ± 1,8 | 39,5 ± 10,0 | (-) |
| 12 | 28,5 ± 2,8 | 52,3 ± 6,2 | 31,1 ± 7,5 | 10,1 ± 2,7 | 7,3 ± 2,1 | (-) |
| 13 | 19,3 ± 2,1 | 74,1 ± 10,7 | 42,0 ± 5,8 | 39,6 ± 12,5 | (-) | (-) |
| 14 | 9,1 ± 8,9 | 86,8 ± 5,8 | 57,5 ± 9,1 | 15,0 ± 4,5 | (-) | (-) |

## TABLA XIII

Expresión de marcadores de la línea celular B en el GRUPO II. $\bar{X} \pm SD$

| Halos | IgG | IgM | IgD | GRB1 | GR2110 | J-5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 38,0 ± 2,1 | 35,5 ± 9,8 | 8,5 ± 5,1 | 96,2 ± 3,5 | 59,5 ± 12,2 | 51,5 ± 2,3 |
| 2 | 36,2 ± 11,8 | 34,7 ± 5,2 | 7,0 ± 1,8 | 93,5 ± 2,6 | 44,0 ± 9,1 | 44,5 ± 6,2 |
| 3 | 54,7 ± 4,2 | 54,5 ± 7,6 | 8,2 ± 4,7 | 90,0 ± 1,6 | 49,7 ± 4,6 | 14,2 ± 4,3 |
| 4 | 39,5 ± 12,7 | 38,5 ± 8,8 | 23,5 ± 11,4 | 89,2 ± 2,5 | 41,2 ± 10,1 | 20,7 ± 7,4 |
| 5 | 44,0 ± 7,7 | 38,2 ± 9,1 | 36,7 ± 9,6 | 82,5 ± 2,3 | 43,7 ± 10,6 | 8,7 ± 1,7 |
| 6 | 38,5 ± 7,2 | 28,0 ± 4,3 | 12,0 ± 4.3 | 80,2 ± 3,5 | 68,7 ± 9,6 | 12,2 ± 9,5 |
| 7 | 20,7 ± 4,7 | 21,5 ± 3,1 | 6,7 ± 3,5 | 77,0 ± 2,9 | 41,2 ± 5,3 | 8,0 ± 1,8 |
| 8 | 7,1 ± 2,5 | 10,5 ± 1,7 | 5,7 ± 2,2 | 74,5 ± 5,2 | 21,7 ± 6,9 | (-) |
| 9 | (-) | (-) | (-) | 66,7 ± 4,0 | 15,6 ± 2,9 | 9,0 ± 2,9 |
| 10 | (-) | (-) | (-) | 59,5 ± 1,2 | 9,4 ± 5,6 | 10,2 ± 4,0 |
| 11 | 13,7 ± 3,3 | 10,5 ± 1,2 | 8,2 ± 1,7 | 48,0 ± 5,2 | (-) | 17,4 ± 3,8 |
| 12 | 11,7 ± 2,5 | 10,0 ± 2,1 | (-) | 42,5 ± 4,2 | (-) | (-) |
| 13 | 9,0 ± 0,8 | 8,5 ± 1,2 | (-) | 29,5 ± 7,4 | 15,0 ± 6,6 | (-) |
| 14 | 9,5 ± 1,2 | 9,5 ± 0,5 | (-) | 15,7 ± 1,7 | 15,7 ± 3,5 | 12,3 ± 4,7 |

## TABLA XIV

Expresión de marcadores de la línea celular T en el GRUPO II. $\bar{X} \pm SD$

| Halos | WT1 | T3 | T4 | T8 | T10 | TdT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | (-) | (-) | (-) | (-) | 59,2 ± 2,9 | (-) |
| 2 | (-) | (-) | (-) | (-) | 45,7 ± 2,9 | (-) |
| 3 | (-) | (-) | (-) | (-) | 46,7 ± 1,2 | (-) |
| 4 | (-) | (-) | (-) | (-) | 43,0 ± 8,8 | ? |
| 5 | 7,0 ± 4,2 | (-) | (-) | (-) | 43,2 ± 4,4 | (-) |
| 6 | 21,0 ± 10,1 | 30,5 ± 14,4 | 15,7 ± 9,5 | 8,2 ± 2,6 | 54,5 ± 11,8 | ? |
| 7 | 22,5 ± 5,2 | 33,0 ± 6,0 | 16,6 ± 3,5 | 7,6 ± 2,0 | 54,0 ± 4,2 | (-) |
| 8 | 19,7 ± 7,1 | 28,5 ± 11,0 | 18,0 ± 9,0 | 7,5 ± 3,4 | 39,5 ± 13,5 | ? |
| 9 | 21,7 ± 8,1 | 39,0 ± 8,6 | 21,0 ± 9,8 | 8,2 ± 1,7 | 54,2 ± 12,6 | ? |
| 10 | 14,7 ± 2,2 | 41,7 ± 6,5 | 7,0 ± 1,1 | 25,5 ± 9,1 | 32,5 ± 5,5 | ? |
| 11 | 31,7 ± 4,1 | 41,2 ± 3,7 | 28,5 ± 3,0 | 14,0 ± 2,1 | 32,0 ± 6,1 | ? |
| 12 | 17,0 ± 2,5 | 51,5 ± 2,5 | 29,5 ± 2,0 | 18,0 ± 2,9 | 5,2 ± 3,7 | ? |
| 13 | 8,0 ± 0,8 | 72,2 ± 3,5 | 43,0 ± 2,1 | 28,2 ± 2,0 | (-) | ? |
| 14 | (-) | 84,2 ± 5,5 | 20,5 ± 5,9 | 48,7 ± 1,5 | (-) | ? |

FIGURA 8

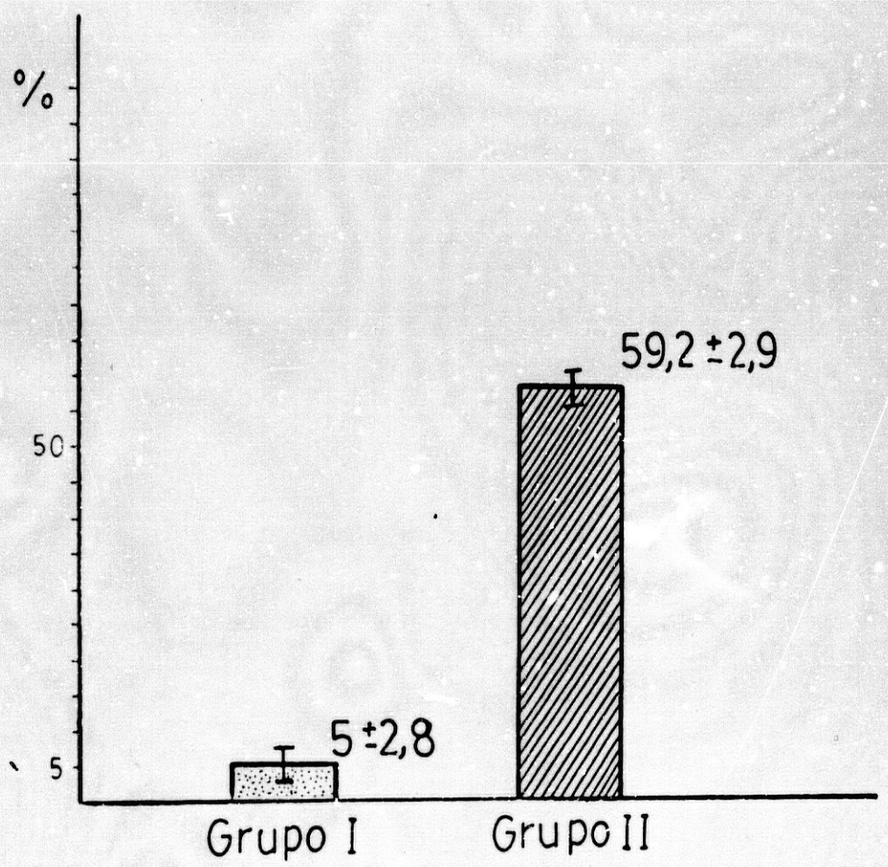


FIGURA 9

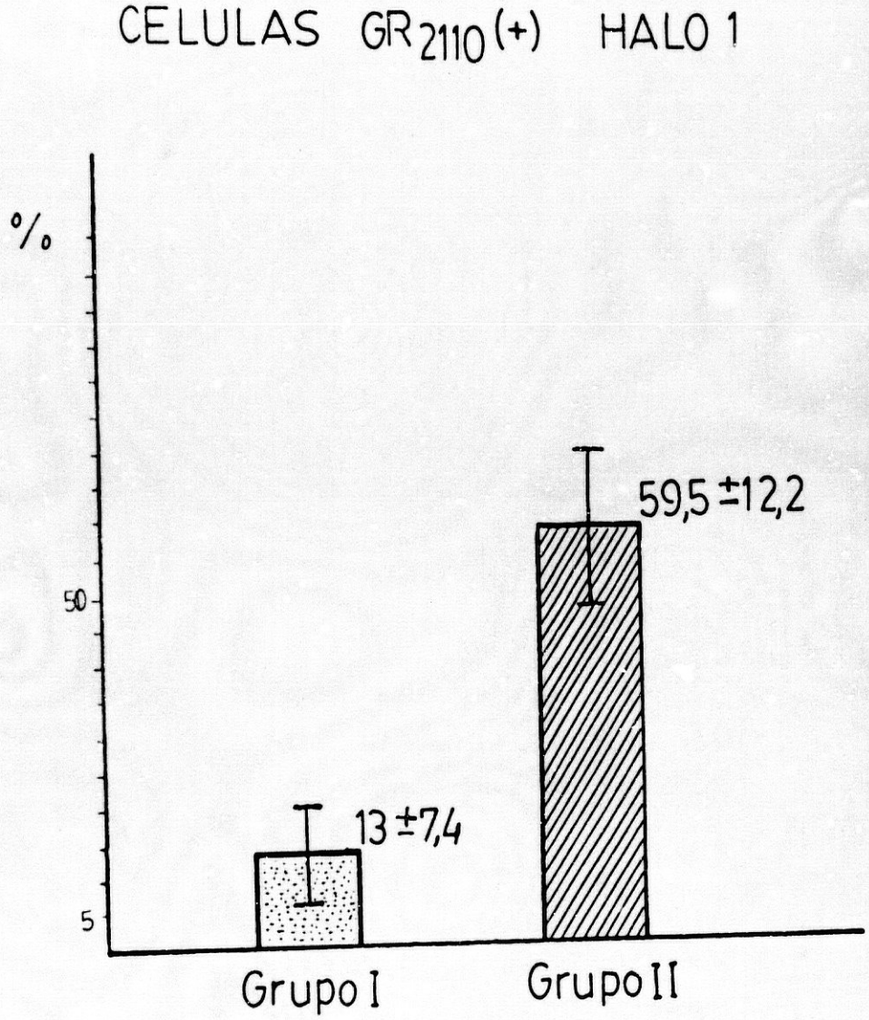


FIG.10

Representacion de la expresion de marcadores en los distintos halos de Percoll.

Fig.11.- Inmunofluorescencia indirecta sobre corte criostático de amigdala, con el anticuerpo monoclonal GR2110. Positividad a nivel de epitelio críptico y centro germinal. x 200

Fig. 12.- Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes criostatico de amigdala, con el Ac Mo GR2110. Detalle de la positividad a nivel de epitelio críptico. x 400

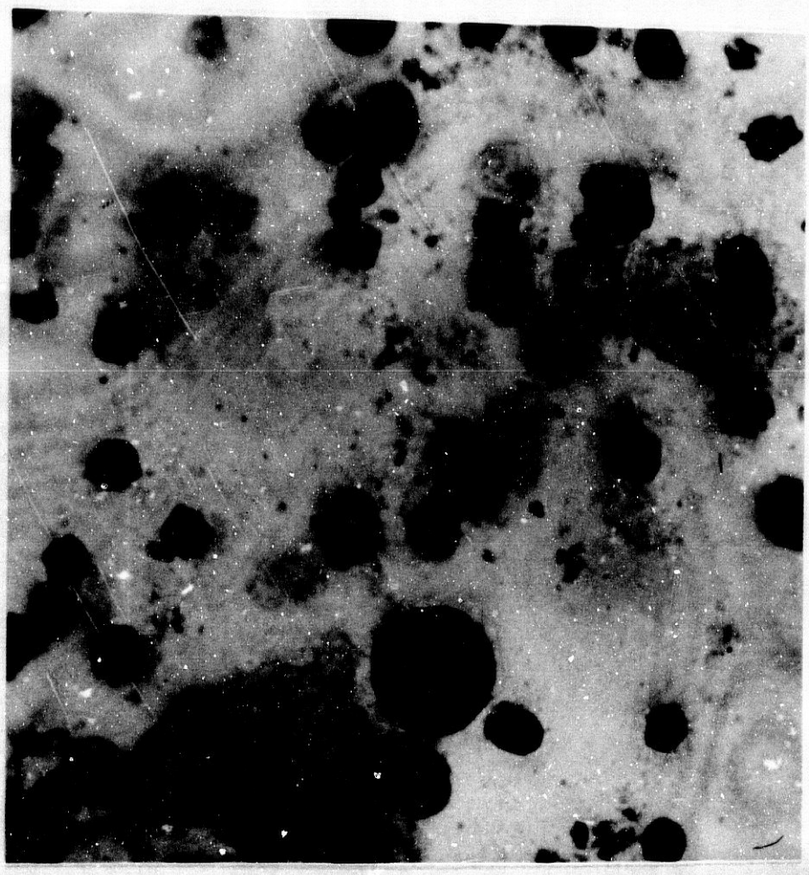


FIG 13.- Elementos celulares correspondientes al halo 1 del fraccionamiento de Percoll. x 400

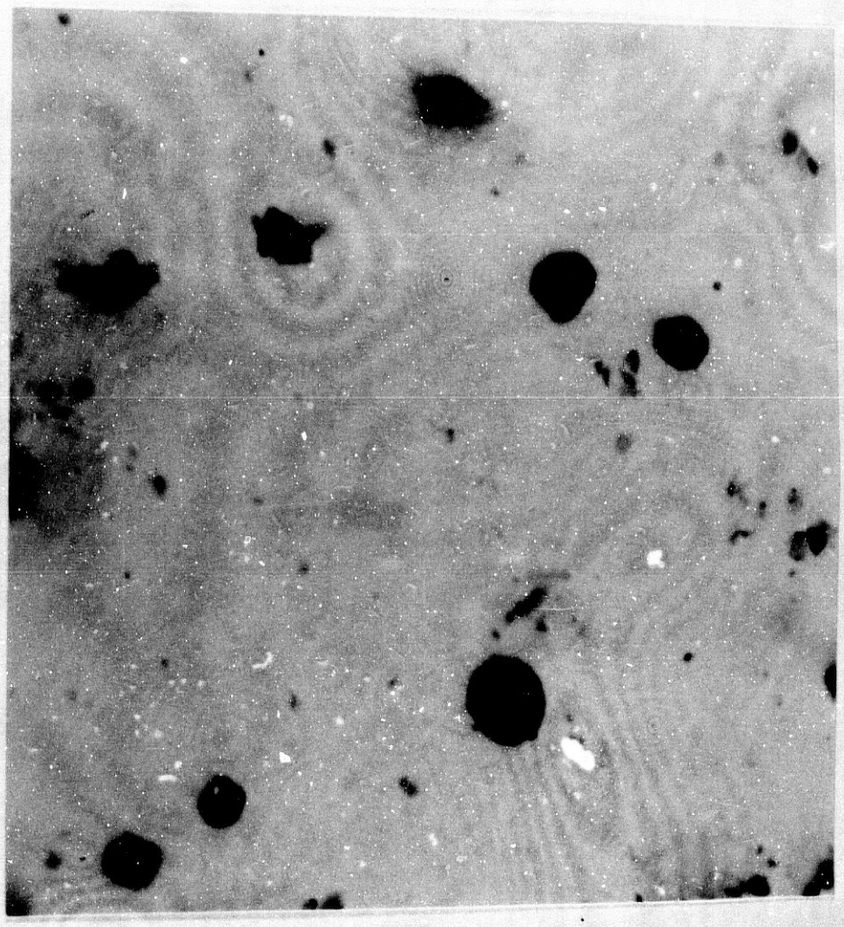


FIG 14.- Elementos celulares correspondientes al halo 3 del fraccionamiento de Percoll. x 400

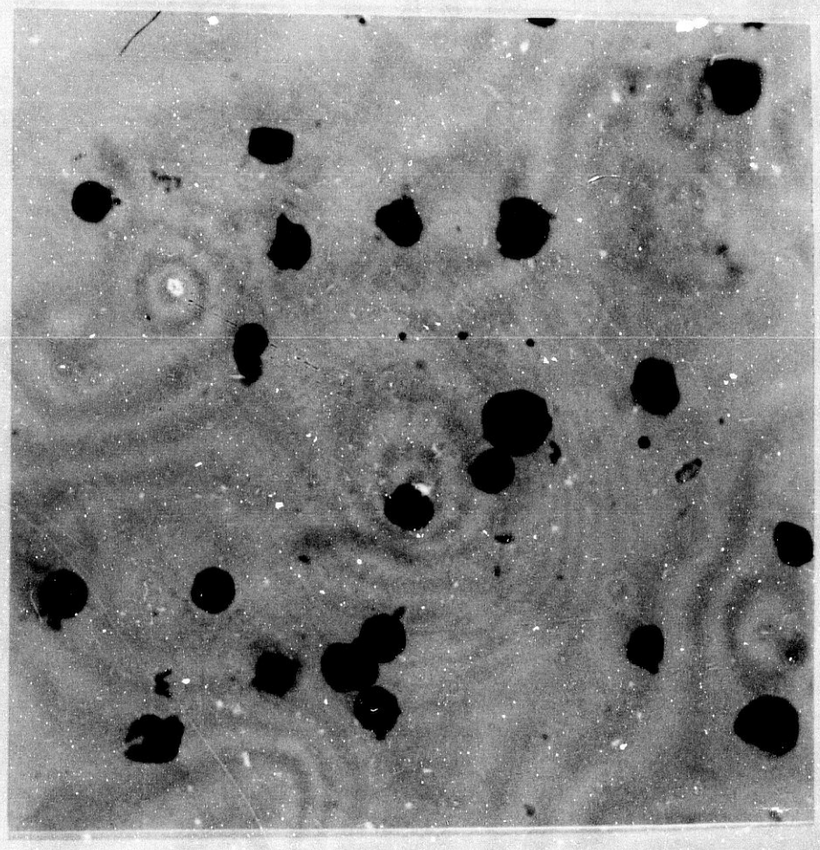


FIG 15.- Elementos celulares correspondientes al halo 10 del fraccionamiento de Percoll. x 400

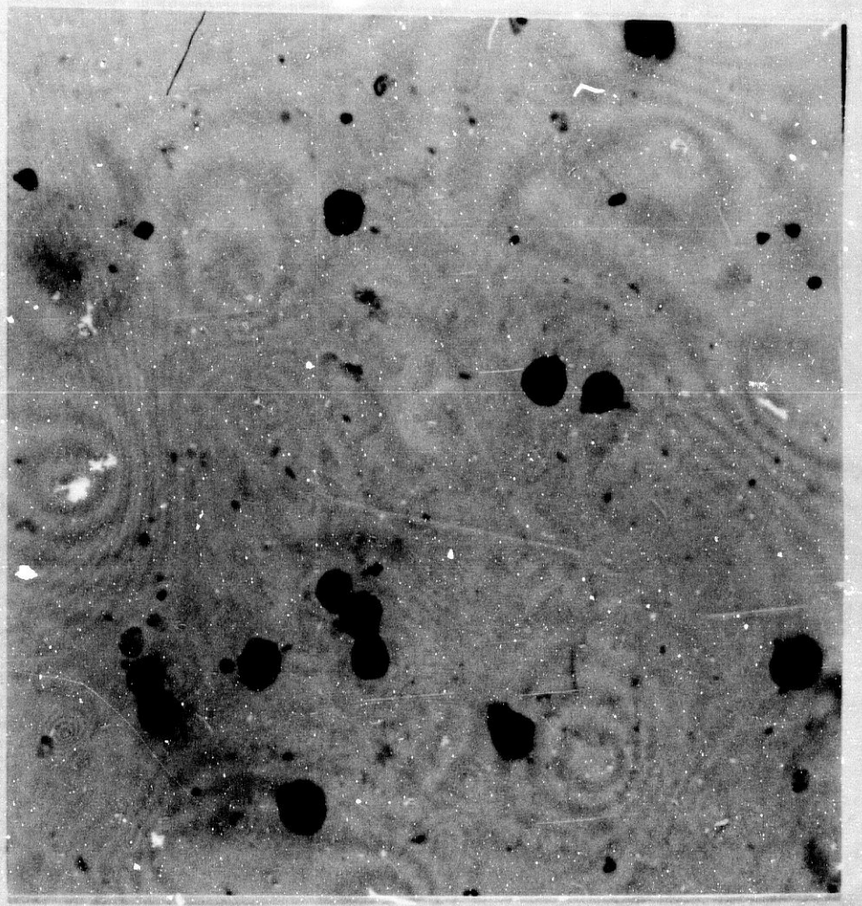


FIG 16.- Elementos celulares correspondientes al halo 13 del fraccionamiento de Percoll. x 400

7.- Estudio histopatológico con la tinción de Hematoxilina-Eosina.

Los resultados se expresan en las figuras 17 a 20, realizadas con el mismo aumento para apreciar mejor las diferencias existentes desde el punto de vista histopatológico entre los distintos grupos clínicos.

- La fig. 17 pertenece al caso 13 de AR con HA de 5 años de edad.
- La fig. 18 pertenece al caso 2 de HAS de 5 años de edad.
- La fig. 19 pertenece al caso 9 de AF de 7 años de edad.
- La fig. 20 pertenece al caso 3 de AR sin HA de 10 años de edad.

Vemos que entre las dos primeras pertenecientes a amigdalas hipertróficas, existen grandes folículos secundarios con su corona linfocitaria, ésta es mas marcada y envuelve a todo el centro germinal en la HAS, en comparación con la perteneciente a AR con HA donde el folículo presenta corona linfocitaria sólo por un sector de su circunferencia. El patrón histológico de estas amigdalas, estaba formado por grandes folículos secundarios con corona linfocitaria mas o menos homogénea con epitelio bien organizado sobre todo en la periferia, y grandes zonas de simbiosis linfoepitelial en el interior de las criptas. Por el contrario, el patrón histológico de las amigdalas hipoplásicas, fue el de abundantes y pequeños centros

gérminales sin corona linfocitaria, y en el conjunto apenas se aprecian folículos secundarios, figuras 19 y 20. En algunas zonas se apreciaba tejido conjuntivo cicatricial que se interponía entre el epitelio y el parénquima linfoide amigdalar; en algunas zonas el epitelio estaba sustituído por dicho tejido cicatricial. Se aprecian reducidas zonas de simbiosis linfoepitelial. En estos dos últimos casos, se aprecian fenómenos de marcada deplección linfoide.

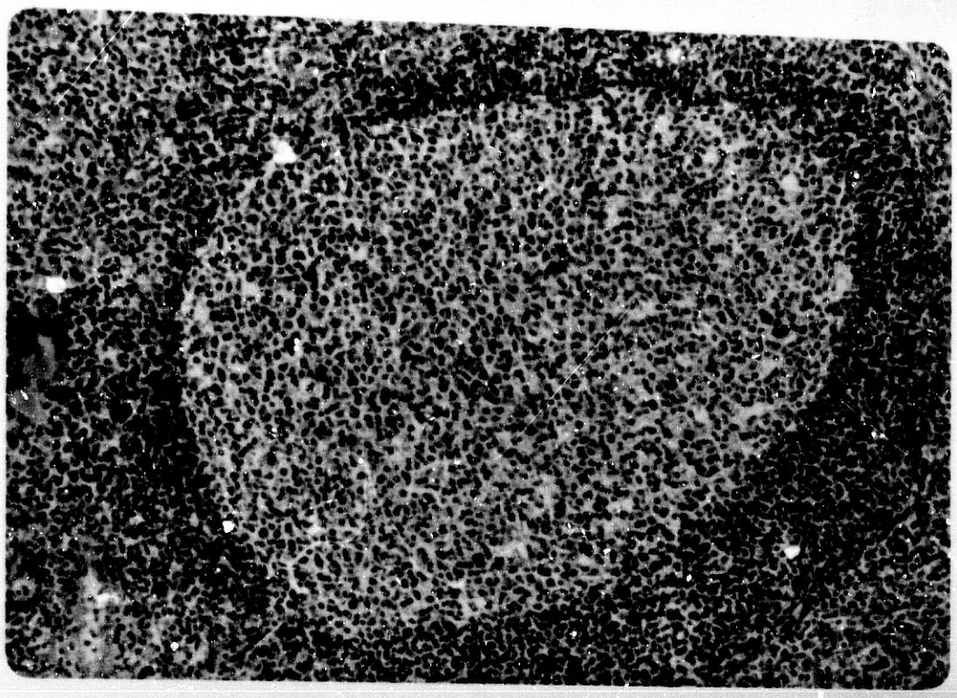


Fig. 17 Folículo secundario de AR con HA. x 200
(Explicación en el texto).

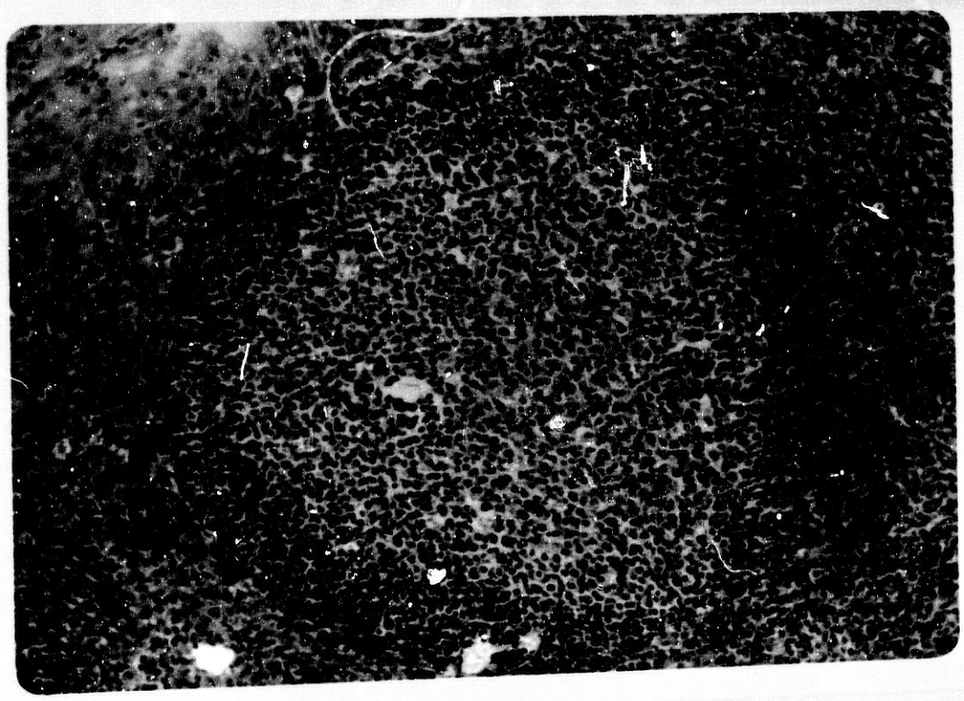


Fig. 18.- Folículo secundario de HAS. x 200
(Explicación en el texto).

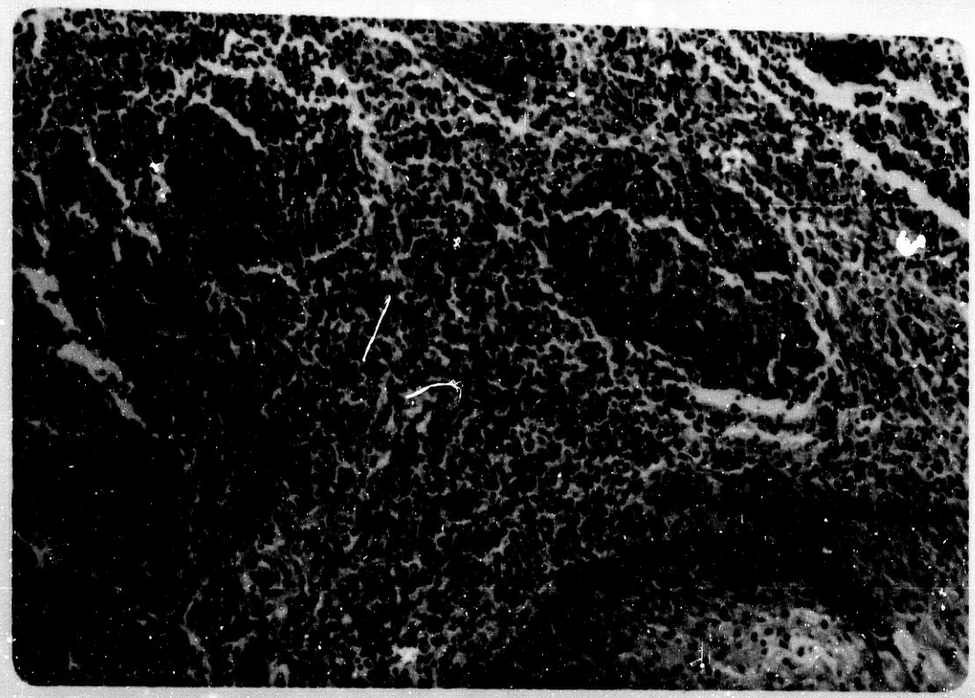


Fig. 19.- Patrón histológico de AF. x 200.
(Explicación en el texto).

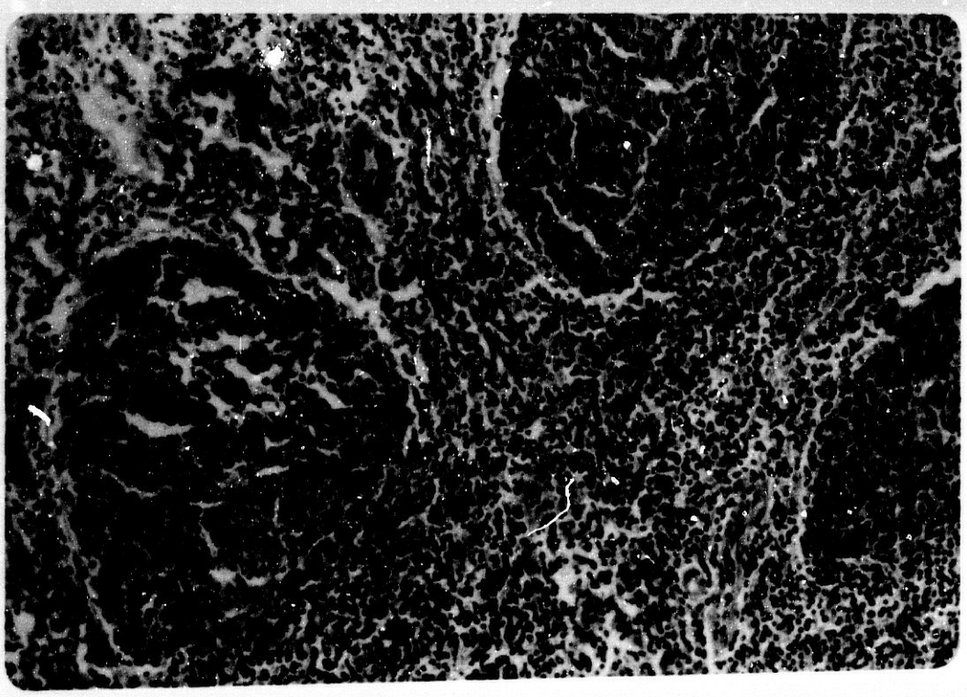


Fig. 20.- Patrón histológico de AR sin HA. x 200.
(Explicación en el texto).

# DISCUSION

## D I S C U S I O N

El planteamiento de la discusión, va a seguir el mismo orden que el expuesto en resultados, dividiendose en cuatro grandes apartados:

I - Sobre el estudio de marcadores en linfocitos totales de amigdala.

II - Sobre los estudios comparativos de la expresión de marcadores en linfocitos de amigdala de niño con: linfocitos de sangre periférica, linfocitos amigdalares de adulto, y entre los distintos cuadros clínicos de amigdalitis que se han establecido.

III- Sobre los fraccionamientos: con fibra de nylon y con anticuerpos monoclonales más complemento.

IV - Sobre el fraccionamiento con Percoll, el estudio fenotípico y distribución de las fracciones celulares aisladas, y su comparación entre los distintos grupos clínicos.

I.- Estudio de subpoblaciones linfocitarias en amigdala palatina.- Este estudio lo hemos llevado a cabo mediante la utilización de Ac Mo que definen diversos antígenos de diferenciación de la serie linfoide fundamentalmente. También han sido incluidos otros marcadores que han servido para definir otro tipo de subpoblaciones celulares como son monocitos y células nulas.

La dificultad que planteaba este estudio era fundamentalmente el fraccionamiento de la suspensión celular obtenida después de centrifugación en Ficoll. Por otra parte, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha comprenden el estudio realizado sobre cortes criostáticos, y de esta forma se han definido patrones de reacción que se han correlacionado con la localización histológica dentro de la amigdala (Lamelin y cols, 1978; Leprini y cols, 1979; Atul y cols, 1981; Yamanaka y cols, 1983; Kuki y cols, 1984; etc). De esta forma se ha descrito una maduración de linfocitos en la amigdala de acuerdo a concepciones puramente histológicas (Atul y cols, 1981; Hsu y cols, 1984). Nosotros hemos pretendido definir esta serie de estadíos de diferenciación. Además nuestro estudio comtemplaba la investigación de posibles precursores celulares linfoides dentro de la amigdala.

El empleo de Ac Mo, ha venido a resolver en gran medida los problemas que ofrecía la serología convencional. De hecho solamente se habían podido definir patrones de reacción (en cortes histológicos) con los sueros convencionales. Tanto la purificación como la determinación de una determinada proteina con estos sueros era evidentemente muy dificil. Los Ac Mo, reúnen las características de especificidad y de definir un solo determinante antigénico. Por otra parte los estudios inmunoquímicos que son posibles realizar con estos Ac Mo nos permiten a su vez discernir si un determinado marcador es compartido por varias estirpes celulares. Así pues, con el advenimiento de estos Ac Mo, se ha producido un espectacular desarrollo en la definición de marcadores asociados a procesos de diferenciación linfoide. Así en particular para la serie T, han sido definidos gran cantidad de marcadores que han permitido desdoblar funcionalmente a estas células T de acuerdo con estas proteinas de membrana asociadas a función. En este sentido Reinherz y cols (1980) han establecido un modelo de diferenciación intratímica con Ac Mo que definen diversos estadíos de maduración. Así, el estadío I estaría representado por células inmaduras localizadas en timo subcapsular que expresan los antígenos T9 y T10. En 1983, Hofman-Fezer y cols encuentran en algunas de estas células

la expresión del antígeno CALLA.

Estadío II, representado por células localizadas en el cortex tímico, las cuales pierden el antígeno T9, mantienen el T10 y adquieren progresivamente otros antígenos como el T6, T4 y T8.

Estadío III, representado por células localizadas en médula tímica que pierden el antígeno T6, adquieren el T3, segregandose en subpoblaciones T4 y T8 positivas.

Para la diferenciación celular B sin embargo, el establecimiento de marcadores inmunológicamente definidos ha sido mas complicado. A los marcadores clásicamente definidos para células B, como eran el receptor Fc, o la presencia de Ig de superficie y los receptores para complemento, han venido últimamente a sumarse una serie de marcadores definidos por Ac Mo que definen diversos estadíos dentro de la diferenciación celular B. En este sentido, la expresión de las moléculas de clase II (Ia), prácticamente se da desde los primeros estadíos de célula nula o célula Pre-Pre-B hasta el de célula plasmática en que los pierden. Otra serie de marcadores, como el B1, está presente también desde la etapa Pre-PreB localizada en médula ósea hasta célula linfoplasmocitoide en los órganos linfoides periféricos (Stashenko y cols, 1980). El antígeno B2, está presente desde linfo

cito Pre-B hasta célula prolinfocítica de los órganos linfoides periféricos (Nadler y cols, 1981). El antígeno CALLA está presente en los tres estadíos de diferenciación localizados en médula ósea (Pre-Pre-B, Pre-B y linfocito B virgen), (Greaves y cols 1983). El antígeno GR2110 también ha sido definido en los primeros estadíos de diferenciación celular B en médula ósea (Pre-Pre-B y Pre-B), (Gomez Morales y cols, 1985). Las inmunoglobulinas de superficie, aparecen, primero la clase IgM en el estadío de linfocito B virgen en médula ósea, mostrando los siguientes estadíos el resto de clases de Ig. Todas ellas se pierden a nivel de célula plasmática. El antígeno T10, aparte de estar implicado en la diferenciación celular T, como ya hemos visto, también está presente en células plasmáticas y en células centrogerminales de amigdala (Atul y cols, 1981). Nosotros, en este sentido, hemos dispuesto de una batería amplia de Ac Mo que nos definieran diversos estadíos y que nos permitieran por otra parte determinar el tipo celular correspondiente.

En una primera fase de estudio se utilizaron todos estos marcadores sobre una suspensión celular obtenida después de fraccionar en Ficoll las células obtenidas de diversas amigdalas. La utilización de todos estos marcadores, nos permitían una primera apróximación acerca del tipo celu

lar predominante. Evidentemente con esta serie de Ac Mo no hemos podido caracterizar ningún tipo celular en concreto, pero sí poner de manifiesto un predominio celular B dentro de la amigdala palatina humana. En la Tabla I se reflejan los resultados obtenidos en este sentido y su contrapartida en los mismos individuos con la expresión de estos marcadores en sangre periférica. Como se puede ver, existe una inversión de los resultados obtenidos en uno y otro grupo de células, pudiendo afirmar que en la amigdala existe un predominio celular B. Por otra parte, este primer estudio nos permitía valorar la reacción de ciertos marcadores, que en principio habíamos utilizado para definir poblaciones y posibles células inmaduras. Esta serie de marcadores, eran el CALLA definido por el Ac Mo J-5, la proteína P-24 definida por el Ac Mo GR2110, así como la proteína definida por el Ac Mo WT1 presente fundamentalmente en linfoblastos T, y la utilización de un marcador enzimático como la TdT para poner de manifiesto células inmaduras tanto de T como de B.

La enzima TdT fue negativa en los linfocitos totales de amigdala en todos los casos estudiados. En la figura 2, se muestra el patrón de reacción obtenido por una técnica de inmunoperóxidasa que fue utilizada. Por el contrario, en la figura 3 se observa como una línea celular procedente de una leucemia linfoblástica T, fue claramente positiva para esta

misma enzima. Por tanto la ausencia de esta enzima nos descarta la presencia en amigdala de ciertos estadíos madurativos muy tempranos, tanto de serie linfoide T como B. Estos estadíos donde la enzima TdT es positiva, corresponden a células pluripotenciales de médula ósea, protimocitos o timocitos subcapsulares y timocitos corticales (linfocitos Pre-Pre-T y Pre-T) y dentro de la serie linfoide B a los estadíos Pre-Pre-B y Pre-B (Kenneth y cols, 1985). Por otra parte, los otros marcadores a los que antes me he referido, (CALLA, la proteína P-24 y los definidos por WT1 y OKT10) dieron unos porcentajes de reacción reducidos aunque significativos.

Aunque estos marcadores de inmadurez han sido recientemente estudiados en amigdala palatina, estos estudios han sido llevados a cabo en cortes criostáticos. Así Pulford y cols, (1984) en sus estudios aportados al Workshop de antígenos de diferenciación leucocitaria celebrado en París, describieron por primera vez, que los antígenos CALLA y P-24 también aparecen en los centros gérminales de amigdala. Nosotros en un estudio en cortes criostáticos de amigdala, también hemos puesto de manifiesto la expresión del antígeno P-24, mediante el uso del Ac Mo GR2110, en los centros germinales y además en el epitelio críptico como se observa en las figuras 10 y 11. Esto que en principio pudiera parecer sorprendente, no lo es tanto, en tanto que últi

mamente se ha observado, que muchos determinantes antigénicos epiteliales son compartidos por el tejido linfoide, concretamente a nivel de epitelio tímico, Luger y cols, (1982) han puesto de manifiesto como los keratinocitos son capaces de producir un factor tímico análogo a la Interleukina-1 que es producida por los macrófagos. Por tanto, estos hallazgos, pueden indicar una similar organización funcional inmunológica de ambos tejidos.

Como y a se ha indicado, Atul y cols (1981) describen el antígeno T10, en cortes criostáticos de amigdala, en los centros germinales de los folículos secundarios. Kuki y cols, (1984) también en cortes de criostato, encuentran, por el contrario, este antígeno a nivel de las áreas epiteliales, y en menor intensidad en las áreas interfoliculares pero no en los centros germinales. Nosotros, en células en suspensión, hemos encontrado alrededor de un 30% de células que expresan este marcador.

Tax y cols, /1984) encuentran el antígeno WT1 a nivel de áreas interfoliculares con una intensidad de tinción variable y en un 10% en los centros germinales. Estos autores si cuantifican el porcentaje de positividad de células amigdalares en suspensión y refieren que existe un 65% de células + a WT1 con una intensidad de tinción muy variable. En este sentido, y con este marcador, nosotros hemos encontrado también en células en suspensión, una gran variabilidad en la intensidad

de fluorescencia, existiendo un alto porcentaje de células con una intensidad de fluorescencia muy débil. Nosotros hemos encontrado un porcentaje de células fluorescentes de 26,5 que contrasta con los resultados presentados por Tax y cols, (1984), ello pudiera deberse a diferencias en la interpretación de los resultados. Cabe decir, que estos autores no presentan casuística en dicho estudio.

Sin embargo, hasta ahora estas poblaciones celulares positivas a estos antígenos catalogados en principio de inmadurez, con excepción del WT1, no han sido estudiados ni cuantificados en suspensiones celulares de amigdala. Cabe resaltar en este sentido, que dado que se trata de antígenos de membrana, la técnica utilizada por nosotros es de mayor sensibilidad que aquellas otras practicadas sobre cortes criostáticos. Tampoco han sido comparados estos Ac Mo en los distintos grupos de pacientes y de cuadros clínicos.

Respecto a la expresión del resto de marcadores referidos en la Tabla I, en general coincidimos en nuestros resultados con los expresados por otros autores (Sugiyama y cols, 1983, 1984; Prussek y cols, 1983) en los ensayos llevados a cabo en suspensiones celulares.

De este primer estudio sobre linfocitos totales, se pone de manifiesto la heterogéneidad celular presente en la amigda

la palatina. Es decir, al menos varios tipos de subpoblaciones se pueden definir de acuerdo con estos resultados, sin embargo, no podemos establecer ningún fenotipo en particular restringido a un sólo estadio de diferenciación o de maduración.

II.- En la Tabla II comparamos los resultados de estos marcadores en los linfocitos amigdalares de niño con los de adulto, pudiendo apreciar un discreto aumento, pero significativo estadísticamente, en la población celular T coincidiendo en este sentido con los estudios de Sugiyama y cols, (1984), así como con los criterios de Siegel (1983), respecto a la involución amigdalar, según los cuales, con el paso del tiempo tiene lugar una recirculación de células T que conlleva una acumulación y aumento relativo de dichas células en amigdalas de adulto.

El resto de subpoblaciones no experimentan variaciones significativas, si bien se observa una tendencia a disminuir en la población B en los adultos, lo cual está en concordancia con los estudios de Siegel y cols, (1982), permaneciendo prácticamente invariable la población monocítica y de células nulas.

En la Tabla III comparamos los resultados de la expresión de marcadores en los distintos grupos clínicos de amig-

dalitis. Un problema importante se plantea a la hora de establecer grupos clínicos de control. En la literatura apenas se encuentran estudios a excepción del realizado por Brandzaeg y cols (1979), que utiliza fragmentos de amigdala procedentes de individuos sanos a los que se les practica amigdalotomía. También Surjan (1980), en un intento de tener un grupo control, utiliza las amigdalas de 3 perros sanos, aunque esto, no se puede considerar un control apropiado. Nosotros basados en la apreciación de que las amigdalitis focales por lo general son atróficas, hemos tenido en cuenta el tamaño amigdalar en relación con su patología para establecer los distintos grupos clínicos, y así hemos establecido 4 grupos: dos con hipertrofia y dos sin hipertrofia amigdalar. De esta forma, pretendíamos ver si existe alguna modificación en la expresión de tales marcadores en relación con los distintos cuadros clínicos de amigdalitis. En este sentido, con la mayoría de estos marcadores, apenas existen en la literatura estudios comparativos en la expresión de tales marcadores en relación con distintos cuadros clínicos de amigdalitis. Se pueden citar los estudios llevados a cabo por Brandzaeg y cols (1979), los cuales comparan en secciones de tejido amigdalar la concentración de inmunocitos productores de Ig en distintos cuadros clínicos de amigdalitis en relación con los de un grupo control de individuos sanos; encontrando

en todos los grupos clínicos un descenso de la densidad de inmunocitos productores de todas las clases de Ig, excepto de las células productoras de IgD, que están incrementadas, sobre todo en la amigdalitis hiperplásica idiopática en relación con el grupo control; sugiriendo que existe un defecto funcional en las amigdalas en asociación con la enfermedad. Kuki y cols (1984) comparan en secciones de criostato, la expresión de una amplia batería de 14 marcadores entre amigdalitis recurrente y amigdalitis focal, no encontrando variación alguna en su expresión. Solo encuentran un incremento relativo en la expresión de células IgD + y Esterasa + en la región subepitelial y zona del manto linfocitario, tras estimulación in vitro del tejido con antígeno epitelial amigdalar, en las amigdalitis focales. Siegel (1978), en células en suspensión compara y cuantifica las células T en cinco estados clínicos de amigdalitis mediante la formación de rosetas y no encuentra diferencias significativas entre los distintos grupos, a excepción del grupo representado por las amigdalas que han padecido un absceso amigdalar, en donde encuentra un incremento significativo de células T respecto de los demás grupos, en los cuales observa que las células T se van incrementando en relación a la edad de cada grupo, perb no en cuanto a su patología. Las diferencias encontradas por nosotros

en cuanto a la edad, ya han sido referidas. En nuestro caso, no hemos estudiado ningún caso de amigdalas con abscesos previos. Nosotros, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos cuadros clínicos, en dos tipos de marcadores: por un lado en aquellos Ac Mo que reconocen los antígenos de clase II (Ia) que son el GRB1 y OKIa, los cuales están mas expresados en los dos grupos clínicos donde domina la hipertrofia amigdalar en relación con el grupo de AR sin HA, y por otro el antígeno T10, el cual tiene una expresión mayor en los dos grupos de amigdalitis atrófi-cas en relación con los dos grupos con hipertrófia. Con el resto de marcadores como se aprecia en la mencionada Tabla III, no se aprecian variaciones significativas entre los distintos grupos clínicos. Con estos ensayos, como ya se ha dicho, no podíamos establecer ningún fenotipo en particular en los posibles estadíos de maduración o diferenciación que tiene lugar en la respuesta inmune de la amigdala, tanto si la consideramos en conjunto, como por separado en los distintos cuadros clínicos.

III.- En este sentido, era necesario, proceder al fraccionamiento de los linfocitos obtenidos por Ficoll, para establecer fenotipos inmunológicos que permitieran poner de manifiesto distintos estadíos de maduración, así como la valora-

ción mas precisa de la reactividad de los Ac Mo que definían antígenos de inmadurez.

El primer fraccionamiento se llevó a cabo, por la propiedad de algunos linfocitos de adherirse a diversos materiales, (fibra de nylon, plástico....). Es bien conocida la capacidad de los linfocitos B de adherirse a esta fibra, y de los monocitos al plástico. Este fraccionamiento por adherencia al nylon o al plástico se ha venido utilizando fundamentalmente en sangre periférica para la separación de linfocitos B y de monocitos respectivamente. Aplicamos entonces, este tipo de fraccionamiento, basado en una propiedad física de las células B, para separar esta fracción de la fracción celular T, en la suspensión celular referida. En la Tabla IV, se puede observar que la purificación celular obtenida fue fundamentalmente de células adherentes (células B), y la fracción celular no adherente, no resultó ser pura para células T. Sin embargo, pudimos poner de manifiesto, tal y como era de esperar, que los marcadores J-5 y GR2110, se redistribuyeron con la fracción celular de características inmunológicas B. Por otra parte, el marcador definido por WT1 se redistribuyó con la fracción celular no adherente, como cabía esperar, de acuerdo con los estudios realizados por Tax y cols, (1984). Sin embargo, esta fracción, como ya me he referido anteriormente, no era pura

debido posiblemente a una contaminación de células B, o por otra parte a células B no adherentes al nylon.

Otro tipo de fraccionamiento utilizado, fue la utilización de Ac Mo y complemento para la eliminación de una determinada población celular, de esta forma, elegimos dos Ac Mo. El Ac Mo OKIa, que define los antígenos DR de las células B fundamentalmente, y de otras células como monocitos. Este Ac Mo fue utilizado para eliminar la población celular Ia (+). Por otra parte, el Ac Mo OKT3, fue utilizado para eliminar fundamentalmente linfocitos T. Como se puede ver en las Tablas V y VI y en la figura 5, los resultados eran muy parecidos a los obtenidos tras el fraccionamiento con columnas de nylon (vease figura 4). Los resultados obtenidos para WT1, J-5 y GR2110, fueron tambien similares, y nuevamente los marcadores definidos por los Ac Mo ya citados, también se redistribuyeron con las poblaciones celulares T y B respectivamente. Sin embargo, tampoco este tipo de experiencias nos permitieron establecer ningún fenotipo asociado a algún estadío en particular.

IV.- Realizamos entonces, un fraccionamiento con Percoll que nos ha permitido, en gran medida, establecer un patrón de maduración intraamigdalar. Esta técnica, ha permitido a otros autores separar diversas poblaciones celulares dentro de médula

ósea, y establecer diversos estadíos madurativos dentro de la serie mieloide. Así, en los trabajos de Tor Olofsson y cols,_ (1980) sobre suspensión celular de médula ósea, la utiliza- _ ción de gradientes de densidad de Percoll, les permitió separar diversos estadíos dentro de la serie granulocítica, de _ tal forma, que el análisis distributivo de la densidad de células identificables morfológicamente, demostró, el incremento progresivo en la densidad con la maduración de células dentro de la serie granulocítica; agrupandose los mieloblástos _ en torno a la densidad de 1, 0624 g/ml y los neutrófilos maduros a 1, 0864 g/ml. Los eosinófilos, tenían la mayor densidad, 1, 0904 g/ml, de todas las células analizadas. Los monocitos y los linfocitos, se distribuyeron en torno a 1,0661 y 1,0681 _ g/ml respectivamente.

Este fraccionamiento, se basa en la utilización de un gel de polivinilpirrolidona cubierto de partículas de sílice, llamado "Percoll"; el cual presenta una baja osmolaridad, y ello permite la fácil obtención de gradientes, utilizandolo con mezclas de soluciones salinas tamponadas. Otra ventaja, es la extremada baja viscosidad que provoca una variación inapreciable entre los gradientes, y por tanto una rápida separación celular. De esta forma, este método resulta altamente reproducible y _ obtiene unos perfiles de distribución claramente definidos de células identificables morfológicamente, mostrando éstas una _

distribución homogénea. Hemos elegido pues esta técnica, ya que resuelve las desventajas de otras, que si bien basadas en el mismo fundamento físico de separar células de acuerdo a su tamaño y densidad, presentan en el caso del Ficoll una alta viscosidad y en los gradientes que utilizan albúmina (Shortman 1968) presentan problemas con la estandarización de las diferentes series de albúmina sérica para el control de la osmolaridad, y el pH no fisiológico que se utiliza (5,1). Por otra parte, el Percoll ha demostrado no afectar la viabilidad, ni la capacidad de clonación en agar de las células (Tor Olofsson y cols 1980). Ultimamente, esta técnica se viene utilizando para el fraccionamiento de distintas poblaciones, fundamentalmente en sangre periférica. Así, Timonen y Saksela (1980) lo utilizan para fraccionar las células NK en sangre periférica, al igual que en nuestro laboratorio Lopez Nevot (1985) con la misma finalidad, resultando ser una técnica altamente resolutiva. Sin embargo, en suspensiones celulares de amigdala, apenas se encuentran en la literatura trabajos donde este método haya sido aplicado. En este sentido otros autores como Siegel (1978), realiza un fraccionamiento en gradiente de densidad discontínuo, pero empleando albúmina sérica humana, con el fín de practicar un análisis citológico de células amigdalares en comparación con cé-

lulas linfoides de sangre periférica, no encontrando este autor diferencias en la distribución ni en los tipos celulares entre sangre y amigdala. Sugiyama y cols, (1983) practican otro fraccionamiento en amigdala con goma de acacia, obteniendo sólo tres fracciones de células. Nosotros, hemos utilizado un fraccionamiento de Percoll entre unos porcentajes de 65 y 30 como se describe en material y métodos. De esta forma, obtuvimos 14 halos de células y se realizó un estudio fenotípico de cada halo. Como se observa en las Tablas 9 y 10, fundamentalmente, las células T se concentraron en los halos 11, 12 13 y 14, correspondiendo los halos de menor densidad a células con marcadores de estirpe B. Además, la expresión de Ig de superficie, un clásico marcador de células B, se limitó principalmente a los halos 1, 2, 3, 4 y 5. Como se observa también en estas Tablas, a lo largo de estos halos, fundamentalmente en el 2 y 3, la expresión de Ig de superficie va aumentando, así como la IgD. Esto se corresponde con la secuencia madurativa normal, (Kehrl y cols 1984).

En cuanto a la expresión de marcadores que habíamos calificado en un principio de inmadurez, como son CALLA y proteína P-24, se agrupan fundamentalmente en estos primeros halos, bien es cierto que la reactividad de estos Ac Mo ha sido siempre débil. Los trabajos de Pulford y cols (1984) habían refe-

rido que estos Ac Mo reaccionan en amigdala a nivel de centro germinal, sin embargo nuestros resultados, nos permiten afirmar que la reactividad de estos dos marcadores, no es sobre células inmaduras, dado que las células llevan en su membrana Ig de superficie y además, la enzima TdT fue negativa, por lo que no se corresponde con estadíos madurativos a nivel de células Pre-B, Pre-Pre-B, donde inicialmente han sido descritos (Gomez Morales y cols, 1985; Greaves y cols, 1983). Este fenotipo inmunológico, así como el estudio morfológico, figuras 13 y 14, compatibiliza con células del centro gérminal (centroblastos y centrocitos).

Por otra parte, hemos podido observar que la expresión del marcador T10, no se dá en células T inmaduras como se podría esperar, sino que está expresandose como se puede ver en la Tabla X con células de linaje B. Efectivamente, había sido observado (Atul y cols 1981) que el marcador T10 era expresado en células plasmáticas. Nosotros sin embargo, hemos observado un mayor espectro de expresión de este Ac Mo. Esto puede deberse a que el estudio realizado sobre cortes, es menos sensible que el estudio en suspensión celular para el estudio de este marcador. Cabe decir, que en los halos 7, 8, 9 y 10, la intensidad de fluorescencia fue mayor que en el resto de los halos donde se expresó (vease Tabla X). Sin embargo

los halos referidos donde expresó mayor fluorescencia, pudieran corresponder a células linfoplasmocitoides y células plasmáticas de acuerdo con el estudio fenotípico.

La figura 10, presenta el resumen del estudio fenotípico realizado en los 14 halos. Hemos identificado, siguiendo la terminología de Lennert y cols (1975), como centroblastos, las células correspondientes a los halos 1, 2 y 3, centrocitos del 3 al 5, linfocitos B memoria o inmunoblastos del 5 al 7, células linfoplasmocitoides y células plasmáticas del 7 al 10, y linfocitos "activados" y linfocitos T del 10 al 14, de acuerdo con los marcadores inmunológicos compartidos. Las figuras 15 y 16 muestran una tinción de May-Grunwald Giemsa en células de los halos 10 y 13 respectivamente las cuales son compatibles morfológicamente con los tipos celulares referidos del estudio fenotípico.

Por otra parte, en lo que se refiere a los estudios cuantitativos, hemos de destacar, que como se observa en las figuras 6 y 7, existió una diferencia muy significativa en el número de células que se obtuvieron en el halo I en los grupos que se han estudiado. Así, el nº de células obtenidas en las amigdalitis atróficas (AR sin HA y AF), fue significativamente superior al observado en las hiperplásicas (AR con HA e HAS). Estas células aisladas en el halo I, han sido caracterizadas tanto morfológicamente, (fig 13), como inmunológicamente (Tablas IX y X), y compatibilizan con centroblastos. Esto; creemos nosotros pudiera evi-

denciar un nº incrementado de estas células en estas amigdalitis, y pudieran reflejar una disminución o un defecto, tanto en la proliferación como en la diferenciación celular. Es decir las células quedarían en una fase de activación celular. Otros estudios distintos han postulado que en las amigdalitis existiría una disminución de la proliferación celular (Surjan 1980; Siegel y cols 1982), Maeda y cols (1984) en amigdalitis focales, encuentra un aumento de folículos escleróticos. Todo ello llevaría consigo una atrofia amigdalar con folículos reducidos sin apenas corona linfocitaria (figuras 17 y 18) en las amigdalitis atróficas, en comparación con las hiperplásicas (figuras 19 y 20). Este proceso, que en principio es fisiológico en los adultos (Siegel y cols 1982 y Siegel 1983), al darse en niños, como ocurre en nuestro caso, llevaría consigo una deficitaria respuesta inmunológica como consecuencia de la disminución de proliferación y diferenciación.

De nuestros estudios se desprende la existencia de un incremento de estas células activadas en las amigdalitis atróficas. Y nosotros además, hemos puesto de manifiesto una diferente expresión fenotípica en los marcadores T10 y P-24 (GR21-10) en las células del halo I para los dos grupos, siendo mayor en las atróficas. En este sentido, que las proteínas anteriormente citadas, pudieran constituir una señal negativa en

los procesos de diferenciación y proliferación celular B, es algo que queda por ser investigado, y creemos, que estudios encaminados en esta dirección pudieran ser muy interesantes. De hecho, se están poniendo de manifiesto, multitud de factores implicados en estos procesos (Luger y cols, 1982), y se conoce todavía poco acerca de las proteínas receptoras para estos factores de activación, proliferación y diferenciación linfoide B.

Nosotros pensamos que las consecuencias clínicas que de estos resultados se pueden derivar, van encaminadas a la diferente actitud terapeútica frente a un cuadro de amigdalitis recurrente con atrófia o hipertrófia, imponiendose un estudio inmunológico en las amigdalitis atróficas, para descartar inmunodeficiencias y/o enfermedad focal. De esta forma descartada la primera (inmunodeficiencia), estaría plenamente indicada la amigdalectomía. Para el caso de la amigdalitis hipertrófica, debemos ser mas prudentes en la indicación quirúrgica de amigdalectomía.

# CONCLUSIONES

## C O N C L U S I O N E S

1ª) Confirmamos el predominio de células de estirpe B en amigdala respecto de sangre periférica.

2ª) Confirmamos que en las amigdalas de adulto, existe un aumento de linfocitos T respecto de las amigdalas de niño, como lo demuestra el mayor número de células E y OKT11 positivas.

3ª) Confirmamos que no existen linfocitos inmaduros previr genes T y B en la amigdala.

4ª) El fraccionamiento en gradiente de Percoll ha permitido separar y distinguir distintos estadíos de diferenciación de serie B en amigdala, desde el linfocito B vírgen hasta la célula plasmática.

5ª) El estudio fenotipico de las células aisladas en los gradientes de Percoll, puso de manifiesto la secuencia de diferenciación normal de los linfocitos B de amigdala.

6ª) Las células de menor densidad (Halo I) de fenotipo "Ia +, J-5 +, IgS +, GR2110 +, y T10 +" están significativamente aumentadas en amigdalas atróficas respecto de las hipertróficas.

7ª) La expresión de las proteínas T10 y P-24 fue diferen-

te en los dos grupos estudiados, siendo mayor el número de células positivas para estos marcadores en el halo I en las amigdalas atróficas. Este resultado pudiera reflejar un defecto en la proliferación y/o diferenciación en este tipo de amigdalas.

8ª) Demostramos la positividad del Ac Mo GR2110 en el epitelio críptico amigdalar y en los centros gérminales de los folículos.

9ª) Demostramos además, que en amigdala, la expresión de los antígenos P-24 y CALLA tienen lugar en células de estirpe B.

10ª) Desde el punto de vista inmunológico, la amigdalitis recurrente sin hipertrófia amigdalar, tiene un comportamiento similar a la amigdalitis focal. Y la amigdalitis recurrente con hipertrófia amigdalar tiene un comportamiento similar a la hiperplásia amigdalar simple.

# B I B L I O G R A F I A

# B I B L I O G R A F I A

ABO T, CHARLES M, BALCH CM. " A differentiatión antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1)". J. Immunol. 1.981 ; 127: 3

ABO T, COOPER MD, BALCH CM. Characterization of HNK-1 (+) (Leu-7) human lymphocytes I. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. J.Immunol. 1.982; 129:1752.

ABRAMSON C, KERSY J, LE BIEN T. A monoclonal antibody (BA-1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. J. Immunol. 126: 83-88, 1.981.

ADES EW, DONGHERTY P, SHORE SL, et al.: E rosette receptors induced by PHA on human K cells expressing T cell surface antigens Cell. Immunol. 1979; 44: 179-185.

AIUTI F, WIGZELL H. Function and distribution pattern of human T lymphocytes. I.- Production of anti-T lymphocyte specific sera as estimated by cytotoxicity and elimination of function of lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 1973; 13: 171-181.

AIUTI F, CEROTTINI J.C, COOMBS RRA, et al.: WHO/IARC Workshop: Identification enumeration and isolation of B and lymphocytes from human peripheral Blood. Scand. J.Immunol. 1974; 3:521-532.

ALEXOPOULOS C, PAPAYANNIS A.G, and GARDIKAS C. Increased proportions of B-lymphocytes in human tonsils and appendices. Acta Haematol. 1976; 55: 95.

ANTONI F, and STAUB M., DNA Syntesis and DNA polymerases in tonsillar lymphocytes. In A Castellani (Ed). Lymphocyte stimulation Pleum. New York. 1980 pp ; 53-72.

ATUL K, BHAN, LEE M, NADLER, STASHENKO P, ROBERT T, McCLUSKEY and SCHLOSSMAN SF. Stages of B cell differentiation in human limhhoid tissue. J.Exp. Med. 1.981; 154: 737-749.

BACH MA, BACH JF,. The use of monoclonal anti T-cell antibodies to study T cell imbalances in human diseases. Clin. Exp.Inmunol._ 1.981; 45: 449.

BACIGALUPO A, MINGARI MC, MORETTA L,. Imbalance of T cell subpopulations and defective pokeweed mitogen induced B cell differentiation after bone marrow transplantation in man. Clin. Immunol. Immunopathol. 1981; 20: 137-145.

BALLET JJ, and MERLER E. The separation and reactivity in vitro of a subpopulation of human lymhocytes which bind nistamine.Correlation of histamine reactivity which cellular maturation.Cell Immunol . 1976; 24: 250-69.

BANERJEE D, ROBERT F.THIBERT,. Natural Killer-Like cells found in B-cell compartments of human lymphoid tissues. Nature. 1983;v.304

BERTOGLIO J, THIERRY C, FLORES G, et al. Monse red cell rosete_ formation by subpopulations of human lymphocytes. Clin.Exp.Immu-_ nol. 1977; 27: 172-177.

BHAN AK, REINHERZ EL, POPPEMA S, CLUSKEY RT, SCHLOSSMAN SF. Location of T cell and major histocompatibility complex antigens in _ the human thims. J.Exp. Med. 1980; 152: 771.

BHAN, ATUL K, NADLER L.M, STASHENKO P, MACCLUSKEY R, and STUART F, SCHOLOSSMAN. Stages of B cell diffetentiation in human lymphoid tissue. J. Exp. Med. 1981; 154:737-749.

BIANCO C PATRICK R, NUSSENZWEIG V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor of antigen antibody complement complexes: I separation and characterization. J. Exp. Med. 1970; 132: 702-720.

BILLING R, MINOWADA J, CLINE M, CLORK B, LEE K. Acute lymphocytic leukemia associated cell membrane antigens. J. Natl.Cancer Inst. 1978; 61: 423-429.

BLATT J, REAMAN G, POPLACK DG. Biochemical markers in lymphoid malignances. N. Empl. J. Med. 1980; 303: 918.

BLOOM Y FAWCETT. Tratado de Histologia IX edición. Editorial Labor S. A. 1983. pag. 428-456.

BOYUM A,. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Insest. 1968; 21: (suppl.) 97:77.

BRADSTOCK KENNETH F, ARNA KERR, and BOLLUM FJ,. Antigenic Phenotype of TdT-positive cells in human peripheral blood. Cellular Inmunology. 1985; 90: 590-598.

BRAIN P, GORDON J WILLETTS W.A. Rosette formation by peripheral lymphocytes. Clin. Exp. Inmunol. G. 1970; 681-688.

BRANDTZAEG P, SURJAN Jr.L. and BREDAL P. Immunoglobulin systems in human tonsils I. control subjects of varions ages:quantification of Ig. producing cells tonsillar morphometry and serum Ig. concentrations. Clin. exp. Immunol. 1978; 31: 367-81.

BRANDTZAEG P., L. SURJAN. JR, and P. BERDAL. Inmunoglobulin producing cells in clinically normal, hiperplastic and inflamed human palatine tonsils. Acta Otolaryngol,. 1979; suppl.360:211-215.

BRAUN MP, MARTIN PJ, LEBDETTER JA, HANSEN JA. Granulocytes and cultured human fibroblasts express common acute lymphoblastic leukemia-associated antigen Blood. 1983; 61: 718.

BREARD J, REINHERZ EL, KUNG PC, GOLDSTEIN C, SCHLOSSMAN SF. A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. J. Immunol. 1980; 124: 1943-1948.

BROCHIER J, SAMARUT C, BICH THUNG LT and REVILLARD JP. Study of human T and B lymphocytes with heterologons antisera. IV.Subpopulation in toncil and adenoid cell suspensions. Immunology. 1978; 31: 827-35.

BRODER S.P.A., BUNN ES., JAFFE W., BLATTNER R,C., GALLO F, WONG-STAAL T.A.,WALDMANN, and VT DEVITA. T. cell leukemia lymphoma virus. Ann Intern. Med. 1984; 100:543.

BROSTORFF J., PAK S. and LYDYARD P.M. Histamine suppression of lymphocyte activation. Clin. Exp. Immunol. 1980; 39: 739-45.

CATOVSKY D GREAVES M.F., PAIN C, CHERCHIK, JSNOSSY G, KAY H.E. Acid-Phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukemia. Laucet 1978; 1: 749.

CAVAZZANI M, ZAMPIERI P. Specific local immunity of upper respiratory tract with particular reference to the tonsils. Nuovo Arch.Ital.Otol. 1978; 6: fasc.2: 197-202.

COOMBS R.R., GURNER BW, WILSON A.B., et al: Rosette formation between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunoglobulin receptors. Int. Arch Allergy Appl Immunol. 1970; 39: 658-663.

CORTE G., MORETTA L., DAMIANI G. et al: Surface antigens specifically expressed by activated T cells in humann. Eur J. Immunol. 1981; 11: 162-165.

CORTE G., MINGARI MC, MORETTA A., et al: Human T cell subpopulations defined by a monoclonal antibody I. A small subset is responsable for proliferation to allogenic cells and to soluble antigens and for helper activity for B cell differentiation. J.Immund 1982; 128:16-19.

CROCKER J. The enzyme histochemistry of lymphoid and non lymphoid cells of the human palatine toncil: a basis for the study of lymphomas. J. Pathol. 1981; 134: 81-95.

CURRAN RC and JONES E.L. Immunoglobulins contauring cells in human tonsils an demostrated by immunohistochemistry. Clin. exp. - humanol. 1977; 28: 103-115.

DAHA M.R., KOKDJ, ES LA VAN. Regulation of the C3 rephitic factor stabilized C3/C5 convertase of complement by purified human erytrocyte C36 receptor. Clin. Exp. Immunol. 1982; 50:209-214.

DHALIWAL HS, LING NR, BISHOP S, CHAPEL H, .Expression of immunpglobulin G blood lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia, Clin. and Exp. Immunol.1978;31:226-236.

DHALIWAL HS, LING NR, BISHOP S, CHAPEL H. Expression of immunoglobulin G blood lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia,. Clin. Exp. Immunol. 1978; 31: 226-236.

DONOVAN R, SOCTHILL J F,. Immunclogical studies in children undergoing tonsillectomy. Clin. Exp. Immunol. 1973; 14: 347.

EISEN SA, WEDNER HJ, PARKER CW,. Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. Immunol.--commun. 1972; 1: 571.

ENGLEMAN EG, WARNKE R, FOX R I, et al: Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981; 78: 1791-1795.

ENOMOTO T, KAKINDRI H, HAYASHI Y, and TABATA T. Pustulosis palmaris et plantaris, wth reference to the cross-reactivity betwen tonsillar epithelium antigen and skin antigen. Acta Otolaryngol. (Stockh) 1983; suppl. 401: 36.

EVANS R L, BREARD J M, LAZARUS H, et al: Detection, isolation and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens. J. Exp. Med. 1977; 145: 221-223.

EVANS R L, FALDETTA TJ, HUMPHREYS R E, et al.: Peripheral human T-cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens. J. Exp. Med. 1978; 148: 1440-1445.

FERRARINI M, MORETTA L, AHRILE R, et al: Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneus rosettes with sheep

red cells. Eur. J. Immunol. 1975; 5: 70-72.

FERRARINI M, HOFFMAN T, FU SM, et al: Receptor for IgM on certain human B lymphocytes. J. Immunol. 1977; 119: 1525-1529.

FERRARINI M, CADONI A, FRANZI AT, et al: Ultrastructure and cytochemistry of human peripheral blood lymphocytes. Similarities between the cells of the third population and Tg lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1980; 10: 562-569.

FROLAND SS, MICHAELSEN T E, WILSOFF, et al,: Specificity of receptors for IgG on human lymphocyte-like cells. Scand. J. Immunol. 1974; 3: 509-517.

FUNG-WIN SHEIN. Use of antisera and complement for the purification of lymphocyte subpopulations. Methods in Enzimology. 1984; 108: 249.

GAILILI U, POLLIACK A, OHON E, GAMBEL H, IZAK G,. Human prothymocytes: membrane properties, differentiation patterns, glucocorticoid sensitivity and ultrastructural feature. J. Exp. Med. - 1982; 148: 1423.

GALTON DAG, MACLENNA ICM,. Clinical patterns in B lymphoid malignancy. Clinics in haematology. 1982; 11: 561-587.

GARSON JA, BEVERLY PCL, COAKHAM HB, HARPER ET,. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinji neurones of many species. Nature. 1982; 298: 375.

GATHINGS WE, LAWTON AR, COOPER MD,: Immunofluorescent studies of the development of Pre-B cells, B-lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. Eur. J. Immunol. 1977; 7: 804-810.

GAUDECKER BV,. Ultrastructure of the Age-involuted adult human thymus. Cell Tiss. Res. 1978; 186: 507-525.

GAUDECKER BV, HAN KONRAD MULLER-HERMELINK. Ontogeny and organization of the stationary non lymphoid cells in the human thymus. Cell Tiss. Res. 1980; 207: 287-306.

GAUDECKER BV, HANS KONRAD MULLER-HERMELINK. The development of the human tonsilla palatina. Cell. Tiss. Res. 1982; 224: 579-600.

GAUDECKER BV, ULRICH PFINGSTEN, HANS KONRAD MULLER-HERMELINK. Localization and characterization of T-cell subpopulations and natural Killer cells (HNK 1 + cells) in the human tonsilla palatina. Cell and Tiss. Res. 1984; 238: 135-143.

GERGELY P, VANKY F and KLEIN E, Spontaneous and PHA-induced rosetting of human blood, tonsil lymphocytes and MLC blasts xth sheep, human and horse erytrocytes,. Clin. Exp. Immunol. 1976; 25: 23-27.

GITLIN D, and SASAKI T. Immunoglobulins G, A and M determined in single cells from human tonsils. Science. 1969; 164: 1532.

GOMEZ MORALES M, RUIZ CABELLO F, LOPEZ MA, COLLADO A, CABRERA T, SAN MIGUEL J y GARRIDO F. A monoclonal antibody GR2110 reactive with a P-24 antigen present in a subgroup of acute lymphoid leukemias. Hibridoma. 1985; 4: 369-378.

GONZALEZ M. Fenotipos celulares y correlaciones clínico biológicas en sindromes linfoproliferativos. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Universidad de Salamanca, 1.983.

GREAVES MF, OWEN JTT, RAFF MC,. T and B lymphocytes; origins, properties an roles in inmune responses. American Elsevier 1973; New York.

GREAVES MF, BROWN G, RAPSON N, LISTER TA,. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. Clin. Immunol. Immunopathol. 1975; 4: 67.

GREAVES MF, JANOSSY G,. PATTERNS OF GENE expression and the cellular origins of human leukaemias. Biochim. Biophys. Acta. 1978; 516: 193.

GREAVES MF, RAO J, HARIRI G, VERBI W, CATOVSKY D, KUNG P, GOLDSTEIN G,. Phenotypic heterogeneity and cellular origins of T cell malignancies. Leuk. Res. 1981; 5: 281.

GREAVES MF, VERBI W, FESTENSTEIN M, et al: "Ia-like" antigens on human T cells. Eur. J. Immunol. 1979; 9: 356-362.

GREAVES MF, HAURI G, NEWMAN RA, SUTHERLAND DR, RITTER MA, RITZ J,. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on inmature lymphoid cells and their malignant counterparts. Blood. 1983; 61: 628.

GROSSI CE, WEBB SR, ZICEA A, LYDYARD PM, MORETTA L, MINGARI MC, COOPER MD,. Morphological and histochemical analyses of two hu-

man T cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG. J. Exp. Med. 1978; 147: 1405-1417.

GUPTA S and GOOD RA,. Subpopulations of human T lymphocytes. III Distribution and quantitation in peripheral blood, cord blood, tonsils, bone marrow, thymus, lympho nodes and spleen. Cell. Immunol. 1978; 36: 263-270.

GY ENEY L, BOHM U and MERETEY K,. Tonsillectomiara Kerülö Betegek immunollapotanak nehany jellenzöje I.- Szerum immunoglobulin szintek vizsgalata. Füll-Orr-Gegegyog. 1977; 23: 37-44 in Theoretical and clinical aspects of the tonsillar function SIEGEL G (1983).

HARRIS NL, DATA RE: The distribution of normal B lymphoid cells in nodular lymphomas: Use of an immunoperoxidase technique on frozen sections. Human Pathol. 1982; 13: 610-617.

HARRISON BH. Tonsillar tissue implants in neonatally thymectomized mice. J. Immunol. 1970; 105: 38-42.

HARRISON BH. Antibody production in thymectomized mice with implants of rabbit tonsillar tissue. Transplantation. 1972; 14: 402-403.

HAYNES BF, KATZ P, FAUCI AS: Humane responses of human lymphocytes in vitro, in Schwartz RS (ed): Progress Clinical Immunology. New York, Grune Stratton. 1980, pp 23-62.

HAYNES BF, MANN DL, HEMLER ME et al. Characterization of a monoclonal antibody that defines an immunoregulatory T cell subset for immunoglobulin synthesis in human. Proc Natl Acad Sci. 1980; 77: 2914-2918.

HAYNES BF, HEMLER ME, MANN DL, et al. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) which binds to human monocites and to a subset of activated lymphocytes. J. Immunol. 1981; 126: 1409-1414.

HAYNES BF, BUNN P, MANN D, et al: Cell surface differentiation antigens of the malignant T cell in sezary syndrome and mycosis fungoides. J. Clin. Invest. 1981; 67: 523-530.

HEINEN E, LILET-LECLERCQ CH, MASON D Y, et al. Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. II. Immunocytochemical characterization. Eur. j. Immunol. 1984; 14: 267-273.

HENSON PM. Membrane receptors on neutrophils. Immunols. Commun. 1976; 5: 757.

HERBERMAN RB, ORTALDO JR. Natural Killer Cells: Their role in defenses against disease. Science. 1981; 214: 2-10.

HOFFMANN-FEZER G, ROOT HU, LOHRS U,. Immunohistochemical identification of T and B lymphocytes delineated by the unlabelled antibody enzyme method. Cell. Tiss. Res. 1981; 216: 361-375.

HOFFMANN-FEZER G, KNAPP N, THIERFELDER S,. Anatomical distribution of CALL antigen expressing cells in normal lymphatic tissue and in lymphomas. Leuk. Res. 1983; 6: 761.

HOLOWIEKI J, BAUMGARTNER G, and KNAPP N,. Distribution and characteristics of B and T Lymphocytes from tonsils. IRCS med. Sci. Cell Membr. Biol. 1975; 3: 226.

HOWARD IC, BUTCHER GW, GALFRE G, MILSTEIN C, MILSTEIN CP,. Monoclonal antibodies as tools to analyse the serological and genetic complexities of major transplantation antigens. Immunol Rev. 1983; 47: 139.

HSU SU-MING, COSSMAN J, JAFFE E. A comparation of ABC, umlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies. An examination of germinal center of tonsils. Am, J, Clin. Pathol. 1983; 80: 429-435.

HSU SU-MING, and JAFFE E,. Phenotypic expression of B-lymphocytes 2. Immunoglobulin expression of germinal center cells. Am. J. Pathol. 1984; 114: 396-402.

HUBER C,WIZELL H: A simple rosette assay for demonstration of complement receptor sites using complement coates zymosan beads. — Eur. J. Immunol. 1975; 5: 432-435.

HUBER H, FUNDENBERG H H. Receptor sites of human monocites for IgG. Int. Arch. Allergy Appl. Immune. 1976;34: 18.

HUHN D, THIEL E, RODT H,. Classification of normal and malignant lymphatic cells using acid phosphatase and acid esterase . Klin. Wochenschr. 1980; 58: 65.

HUMPHREYS RE, MC CUNE JM, CHESS L, et al: Isolation and immunologic characterization of a human, B-lymphocyte specific cell surface antigen. J. Exp. Med. 1976; 144: 98-112.

HURTADO RC, ROLA-PLESZYNSKI M and KARIDA MA: The immunologic role of tonsillar tissue in local cell-mediated immune responses. — J. Pediatrics. 1974; 86: 405-410.

JANOSSY G. and GREAVES M. Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets. Transplant Rev. 1975; 24: 177-236.

JANOSSY G, TIDMAN N, SELBY WS, THOMAS JA, GRANGER S, KUNG PC, GOLDSTEIN G. Human T lymphocytes of induce and supressor type occupy different microenvironments. Nature. 1980; 288: 81-84.

JANOSSY G, TIDMAN N, PAPAEEORGION ES, KUNG PC, GOLDSTEIN. Distribution of T lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: An analysis with monoclonal antibodies. The journal of Immunol. 1981; 126: 4.

JONDAL M, WIGZELL H, AINTI F,. Human lymphocyte subpopulations: Classification according to surface markers and for funtional characteristics. Transplant Rev. 1973; 16: 163-165.

KEHRL JH, MURAGUCHI A, BUTLER JL, FALKOFF RJM, FAUCI AS. Human B cell activation proliferation and differentiation. Immunol. Rev. 1984; 78: 75-96.

KERSEY JH, LE BIEN TW, ABRAMSON CS, NEWMAN R, SUTHERLAND R, GREAVES M. A human leukemia associated and lymphopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. J. Exp. Med. 1981; 153: 726-731.

KOCHMAN S, BERNARD J, SCHVARTZ H, CAZABAT A, THIERNESSE N, LAVAUD F, and CAULET T. Failure to distinguish ultrastructurally between T4 + (Helper) and T8 + (Supressor/cytotoxic) T-cells subsets. Scand. J. Immunol. 1984; 19: 165-173.

KOEHLER G, MILSTEIN C. Continous cultures of fused cells secreting antibody of predigited specificity. Nature. 1975; 256: 495.

KOEHLER G, MILSTEIN C. Continons cultures of fuses and lymphomas. Springer, Berlin, Heidel berg New-York. 1977.

KOHLER W, PROKOP O. Haptoglobintyp un F. Streptokokken Dtsch Gesundheitswes. 1977; 32: 1248. in Immunological aspects of the focus problem and the genetic type of haptoglobin. SIEGEL G. and GESERICK G. 1981.

KORSEMEYER SJ, HIETER PA, RAVETCH JV, POPLACK DG, WALDMAN TA LEDER P. Development hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. Proc. Natl.Acad sci USA. 1981; 78:796-7.100.

KORSRUD FR, BRANDTZAEG P. Immunohistochemical evaluation of J chain expression by intra and extrafollicular immunoglobulin producing human tonsillar cells. Scand J.Immunol.1981 13: 271-80.

KUKI K, TABATA T. Immunohistological studies on tonsils with recurrent tonsillitis and focus-tonsil with pustulosis palmaris et plantaris. Acta Otolaryngol.1984;416:20-29.

KUNG PC, GOLDSTEIN G, REINHERZ EL, SCHLOSSMAN SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T-cell surface antigens. Science. 1979; 206: 347.

KURITANI T, KISHIMOTO T, MORAGUDRI A, YAMAMURA Y. In vitro - immune response of human peripheral lymhocytes IV distribution and characterization of precursors for PHA and protein A-induced colony-forming B cells. J.Immunol.1980;125:2633-37

LAMELIN JP, THOMASSET N, ANDRE C, BROCHIER J, REVILLARD JP. Study of human T and B lymphocytes with heterologoos antisera.III Inmunofluorescence studies on tonsil selections. Immunology.1978; 35: 463.

LEDBETTER JA, EVANS RL, LIPIMSKY M, et al: Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper inducer and T cytotoxic suppressor subpopulations in monse and man. J.Exp. Med. 1981; 453: 310-318.

LEENE W. Origin and fate of lymphoid cells in the developing palatine tonsil of rabbit. Z Zellforsch.1971;116:502-522.

LENNERT K, MOHRI N, STEIN H, KAISERLING E: The histopathology of malignant limphoma. Brit J.Haemat. 1975; 31:193.

LEONARD WL, DEPPER JM, UCHIYAMA T, SMITH KA, WADMAM TA,and GREENE WV. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor:Partial characterization of the receptor. Nature. 1982; 300:267.

LEPRINI A, FRANZI AT, PALLESTRINI EA. Identificazione citochimica di aree T-E-B dipendenti nella tonsilla palatina humana. Nuovo Arch.Ital.Otol. 1979; 7:fasc.2. 169-176.

LILET-LECLERCQ CH, RADAUX D, HEINEN E, KINET DENUEL C, DEFRAIGNE JC, HOUBEN DEFRESNE MP, SIMAR LJ. Isolation of follucular dendritic cells from human tonsils and adenoids. I Procedure and morphological characterization. Journal of Inmunological Methods. 1984; 66: 235-244.

LINSE R, SIEGEL G. Nachweis der Aktivierning von F lymphocyten in der menschlichen tonsille. Allergie Immunol. 1982;28: 97-99.

LOPEZ NEVOT y COLS. Obtención y caracterización de Ac Mo frente a una leucemia prolinfocítica B. 1985; sometido a publicación

LUGER A, SZPEIN MB, SCHMITH JA, GRABNER G, SIRAGANAIN R, OPPENHEIN JJ. Characterization of human FTAF. J. Invest. Dermatol. 1982; 78: 337.

LUSHENG SI MD, ROSCOE G, WHITESIDE T. Selective distribution and quantitation of T lymphocyte subsets in germinal centers of human tonsils. Arch.Pathol.lab.med. 1983; 107.

LUSHENG SI, WHITESIDE T. Tissue distribution of human NK cells studied with anti-leu-7 monoclonal antibody. The Journal de Inmunology. 1983; 130:5.

MAEDA S, MCGI,G. Functional morphology of tonsillar crypts in recurrent tonsillitis. Acta Otolaryngol.1984; 416: 7- 19.

MARKGRAF R, VON GAUDEKER B, MULLER HERMELINK HK. The development of the human lymph node cell tissue res. 1982.

McCUNE JM, LINGAPPA VR, FU SM, et al.: J.Exp.Med. 1980; 152: 463-467.

McMILLAN EM, BRUBAKER DB, PERS SCOTT, JACKSON I, BEEMAN K, WASIK R, STONEKING LL.E, RESTER DR. Demonstration of cells bearing the OKT6 determinant in human tonsil and lymph node. Cancer Immunol Immunother. 1983; 15: 221- 226.

McMILLAN EM, BSC, M.B., MRCP., WASIK R, EVERETT. Identification of T lymphocytes and T subsets in human tonsil using Monoclonal antibodies and the inmunoperoxidase technic. A.J.C.P 1.981.

MINGARI MC, MORETTA L, MORETTA A et al.: Fc. receptors for IgG and IgM immunoglobulins on human T lymphocytes: mode of reexpression after proteolysis on interaction with immune complexes. J. Immunol. 1978; 121: 767-770.

MINGARI MC, MELIOLI G, MORETTA A, et al.: Human T cell clones with helper or supressor activity on the pokeweed mitogen driven B cell differentiation, in serron B (ed): current concepts in human immunology and cancer immunomodulation. Elseiver, North Holland. 1982: 49-54.

MIYAWAKI T, SHIGEHARU OHZEKI, IKUTA N, SEKI H, TAGA K, TANIGUCHI N, . Immunohistologic localization and immune phenotypes of lymphocytes expressing tac antigen in human limphoid tissues. The Journal of Immunol. 1984.

MOLLER G (ed): T cell stimulating growth factors. Immunol rev. 1980; 51 .

MORAG A, OGRA PL. Immunologic Aspect of tonsils. 1975. Ann. Otol. Rhin. Laryng., 84: 337.

MORETTA L., FERRARINI M, COOPER MD. Characterization of human T- cell subpopulations as defined by specific receptors for immunoglobulins. Contemp top. Immunobiol. 1978; 8:19-53.

MORETTA L., MINGARI MC, ROMANZI CA. Loss of Fc. receptors of

IgG from human T lymphocytes exposed to Ig.G immune complexes Nature. 1978; 272: 168-169.

MORETTA L, MINGARI Mc, MORETTA A. Human T cell subpopulations in normal and pathologic conditions. Immunol. 1979; 45: 163.

MORETTA L, MORETTA A, CANONICA GW et al. Receptors for immunoglobulins on resting and activated human T cells. Immunol. 1981; 56: 141-162.

MORETTA L, MINGARI MC, MORETTA A, FAUCI AS. Human lymphocyte surface markers. Seminars Hematology. 1982; 19: 4.

MORETTA A, CORTE G, MINGARI MC, et al.: Human T cell subpopulations defined by a monoclonal antibody. II Evidence for cell cooperation in the response to alloantigens and generation of cytolytic cells. J. Immunol. 1982; 128: 20-23.

MOZALEVSKY AF, BARILIAK LR, YUSTICHENKO GK, GULIDA LV. Hereditary predisposition of children to chronic tonsillitis and some accompanyns diseases.Z usn Gorlov Bolezn. 1978; 4: 31-35.in Theoretical and clinical aspects of the tonsillar function. SIEGUEL G. 1983.

MUELLER-HERMELINK HK. Characterization of the B-cell and T-cell regions of human lymphatic tissue thronch enzyme histochemical demostration of ATP ase and 5'nucleotidase activities. Virchows Arch (cell pathol).1974; 16: 371-378.

MUSLLER-HERMELINK HK, GAUDEKER B VON. Ontogenese des lymphatischeia systems beim meuschem. Verh. 1980; 74: 235-259.

MUNKER R, STUNKEL K, THIEL E, THIERFELDER S. Analysis with monoclonal antibodies of human lymphoid cells forming rosettes with rabbit red blood cells. Clin. Exp. Immunol. 1983;51: 479.

NACEM M, GERDES J, ABDULAZIZ A, STEIN H and MASON DY. J. Clin. Pathol. 1983; 36: 167.

NADLER LM, STASHENKO P, HARDY R, AGTHOVEN A, TERHOST C, SCHLOSSMAN SF. Characterization of a human B cell especific antigen (B-2) distinct from B1. J. Immunol. 1981; 120:1941.

NIEUWENHUIS P, KENNING FJ. Germinal centres and the origin of the B cell system II germinal centres in the rabbit spleen and popliteal lymph nodes. Immunology. 1974; 26: 509-519.

NOSSAL GJV, ABBOT A, MITCHELL J, LUMMUS Z. Antigens in immunity XV Ultraestructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. J.Exp.Med. 1968; 127: 277-290.

OLOFSSON T, GARTNER I, OLSSON I. Separation of human bone marrow cells in density gradients of polyvinypyrrolidone coated silica gel "percoll". Scand Haematol. 1980 24: 254-262.

OOSTERON R, KATER L , RODEMAKER LHPM. How unique is the thimus? conditioned media from thums and tonsil epithelial cultures share biological activities in T cell maduration. Clin.Immunol Immunopathol. 1981; 19: 428-36.

ORTS LLORCA. Tratado Anat. Humana. 4: 443-444. Editorial Científico Médica. 1972.

OWENS RL and NEMANIC P,. Antigen processing structures of the mammalial intestinal tract: on SEM study of lymphoepithelial organs. Scanning Electron Microscopy. 1978; 11: 367-378.

PEARL ER, VOGLER LB, OKOS AJ, CRIST WM, LAWTON AR, COOPER ME,. B lymphocyte precursors in human bone marrow an analysis of normal individuals and patients with antibody-defiency states. J. Immunol. 1978; 120: 1169.

PERLMANN H, PERLMANN P, PAPE GR, et al: Purification, fractionation and assay of antibody dependent lymphocytic effector - cells (K-cells) in human blood. Scand. J. Immunol. 1976; 5: 57.

PERNIS B, FORNI L, AMANTE : Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. J. Exp. Med. 1970; 132: 1001-1018.

PREUD'HOME JL, SELIGMANN M: Surface immunoglobulins on human lymphoid cells. Prog. Clin. Immunol. 1974; 118: 1010-1015.

PICHLER WJ, KNAPP W: Receptors for IgM-coated erytrocytes on chronic lymphatic leukemia cells. J. Immunol. 1977; 118: 1010-1015.

PIFKO P, KOTELES GJ, and ANTONI F,. Biochemical properties of tonsillar lymphocytes. Pract. Oto-rhino-laryng. 1970; 32: 350-55.

POPPEMA BS, BHAN AK, REINHERTZ EL, MC CLUSKEY, SCHLOSSMAN SF. Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. J. Exp. Med. 1981; 153: 30-41.

PULFORD KAF, KNIGHT PM, GATTER KC, and MASON DY. Immunocytochemical characterization of monoclonal antileucocite antibodies pag. 453, in Leucocyte Typing. Edited by A Bernard, L Pounsell, J Dausset, C Milstein, SF Slochssman. Edit. Springer Berlag 1984.

PRUSEK W, AGUPSOWICZ T, PODWYSOCKA M,. T and B lymphocytes in peripheral blood and tonsils of children after tonsillectomy. Arch. Immunol. Ther Exp. 1983; 31: 489-496.

RABELLINO E, GREY HM. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. III. Bursal origin of surface immunoglobulins on chicken lymphocytes. J. Immunol. 1971; 106: 1418.

RAFF MC, STERNBERT M, TAYLOR RB: Immunoglobulin determinant on the surface of mouse lymphoid cells. Nature 1970; 225: 553-554.

RAFF MC. Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. Immunology 1970; 19: 637-650.

REINHERTZ EL, KUNG PC, GOLDSTEIN G et al: A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocites and all peripheral human T cells. J. Immunol. 1979; 123: 1312-1317.

REINHERTZ EL, KUNG PC, GOLDSTEIN G, SCHLOSSMAN SF,. A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/supressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2. J. Immunol. 1980; 124: 1301-1307.

REINHERTZ EL, KUNG PC, GOLDSTEIN G, LEVEY RH and SCHLOSSMAN SF Discrete stages of human intrathimic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemia lymphoblasts of T cell-linea ge. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980; 77: 1588.

REINHERTZ EL, MORIMOTO C, PENTA AC, et al: Regulation of B - cell immunoglobulin secretion by functional subsets of T lymphocytes in man. Eur. J. Immunol. 1983;

RITZ J, PESANDO JM, NOTIS-McCONARTY J, LAZARUS H, SHLOSSMAN SF,. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. Nature 1980; 283: 583.

ROBB R, MUNCK JA, and SMITH KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. J. Exp. Med. 1981; 154: 1455.

ROBB RJ, and GREENE WC. Direct demostration of the identity of T cell growth factor binding protein and the Tac antigen. J. Exp. Med. 1983; 158: 1332.

RODT H, NETZEL B, THIEL E, JAGER G, HUHN D, HAAS R, et al. -- Classification of leukemic cells with T and O-ALL-Specific -- antisera. Hematol. Bluttransfus. 1977; 20: 87-95.

ROSS GC, POLLEY MJ,. Specificity of human lymphocyte complement receptors. J. Exp. Med. 1975; 141: 1163-1180.

ROUSE RV, JEFFREY A, LEDBETTER, WEISSMAN I. Mouse lymph node germinal centers contain a selected subset of T cells, the helper phenotype. J. Immunol. 1982; 128: 5.

RUIZ CABELLO MA, GONZALEZ M, LOPEZ MA, CABRERA A, SAN MIGUEL J, GARRIDO F. Estudio de un nuevo Ac Mo producido contra una leucemia humana que reconoce antígenos HLA de clase II. Sangre. 1985; 30: 190.

RUSCETTI FW, GALLO RC. Human T-lymphocyte growth factor: Regulation of growth and function of T-lymphocytes. Blood 1981; 57: 379.

RUTENBERG WD, AL-KHALIDI U, ROSEN F and MERLER E. Purification and biochemical characterization of human lymphocyte mitogenic factor (LMF) J. Immunol. 1979; 122: 723-27.

SALA O, GRAVINA E, GRAVINA-SANVITALE G. Amygdales et immunité Recherche clinico-immunologique chez des sujets tonsillectomises. Revue de laryngologie 1982; 103: 2.

SASAKI CT and KOSS N,. Chronic bacterial tonsillitis: fact or fiction. Otolaryngology. 1978; 86: 858-64.

SESTERHENN K, KRUEGER, GRF, and UHLMANN C. Percent distribution of T and B cells in tonsils of children, juveniles and adults. Arch Otorhinolaryng. 1977; 218: 37-44.

SIEGEL and WIDKE J. Concentration of immunoglobulins in the tonsils ORL. 1976; 38: 241-51.

SIEGEL G. Cell fractionation and cytological analysis of human lymphatic cells from tonsil and blood. Arch. Oto. 1978; 221: - 15-21.

SHORTMAN K. The separation of different cell classes from lymphoid organs. II. The purification and analysis of lymphocyte populations by equilibrium density gradient centrifugation. — Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1968; 46: 375-96.

SIEGEL G. Characterization of clinical tonsil stages by their T-cell count. Immunopathological description of tonsils after a peritonsillar abscess. Acta Otolaryngol. 1978; 86: 469-472.

SIEGEL G. Biochemical characterization of the proliferation pool of lymphatic cells in the human tonsil and demostration of the age-dependent pool size reduction. Acta Otolaryngol. 1979; 87: 560-566.

SIEGEL G, GESERICK G. Immunological aspects of the focus problem and the genetic type of haptoglobin. Arch. Otorhinolaryngol. 1981; 232: 263-264.

SIEGEL G, LINSE R, MACHELEIDT S,. Factor of tonsillar involution: Age-dependent changes in B-cells. Activation and Langerhans' cell density. Arch Otorhinolaryngol. 1982; 236: 261-269.

SIEGEL G. Theoretical and clinical aspects of the tonsillar - function. Int. Journal of pediatric Oto. 1983; 6: 61-75.

SIMAR LJ, LILET-LECLERQ C, HEINEN E, KINET-DENOEL C, RADOUX D. Functional study of human tonsillar follicular dendritic cells. Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica. 1984; 38: 3.

SPREKELSEN C. Relacion entre capacidad proliferativa linfoide y status inmunitario amigdalino. Determinación autorradiográfica en el niño. Arch. Oto-Rhino-Laryng. 1975; 221: 173-76.

SPRINKLE PM and VELTRI RW. Recurrent adenotonsillitis: a new concept. Laryngoscope. 1976; 86: 58.

STASHENKO P, NADLER LM, HARDY R, SCHLOSSMAN SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. J. Immunol. — 1980; 125: 4.

STATHOPOULOS G, ELLIOT EU: Formation of mouse or sheep and — red blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukemic individuals. Lancet. 1974; 1: 600-601.

STEIN H, LENNERT K, MASON DY, GERDES J and ZIEGLER A, in John DS and Belakeslec JR (Eds). Advances in comparative leukemis research. Elsevierf North Holland. New York 1982; p 479.

STOHR PH. Zur physiologie der tonsillen. Biol Centralbl, 2. - 1882; 368-70 in theoretical and clinical aspects of the tonsillar function. Siegel G 1983.

STUTMAN O. Two main features of T cell development: Thymic - traffic and post thymic maturation. Contemp Top Immunobiol. - 1977; 7: 1.

STUTTE HJ, MULLER-HERMELINK HK . Lysosomen in blutzellen als diagnostischer parameter Verh Dtsch Ges Pathol. 1976; 60: 155-175.

SUGIYAMA M, OHASHI K, SASAKI T, TAKENAKA K, NAKAI Y, KINOSHITA Y,. T cell subsets in the tonsil in relation to age analyzed with monoclonal antibodies (anti-leu-antibodies) and fluorescence activated cell sorter (FACS). Int. J. Pediatric Oto. 1983; 6: 195-204.

SUGIYAMA M, YAMAMOTO K, KINOSHITA Y and KIMURA S. Studies on the capacity of human lymphocyte subpopulations to produce interferon. Acta Oto-Laryng. 1976; 84: 296-305.

SUGIYAMA M, SASAKI T, NAKAI T, OTANI S and KINOSHITA Y,. Studies on the cell mediated inmune response of tonsillar lymphocytes wth regard to the clinical course and patient's age. Int. j. Pediat. Otorhinolaryng. 1982; 4: 193-208.

SUGIYAMA M, OHASHI K, SAKASHITA T, et al. Immunological and - biochemical properties of tonsillar lymphocytes. Acta Otolaryngol. (Stockh) 1984; Suppl. 416: 45-55

SURJAN L sen, SURJAN L jr; and SURJAN M. Further investigations into the immunological role of tonsils. Acta Oto-Laryng. 1972; 73:: 222-26.

SURJAN L jr. A new rapid method for the in vitro demonstration of tonsillar lymphocyte activation. Acta Oto-Laryngol. (Stockh) 1977; 83: 233.

SURJAN L Jr, BRANDTZAEG P and BERDAL P. Immunoglobulin system of human tonsils. II. Patients wth chronic tonsillitis or tonsillar hyperplasia: quantification of Ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum Ig concentrations. Clin. Exp. Immunol. 1978; 31: 382.

SURJAN L Jr. Reduced lymphocyte activation in repeatedly inflamed human tonsils. Acta Oto-Laryngol. 1980; 89: 187-194.

TABATA T, ENOMOTO T, FUJIMURA N and HIRAMATSU K. Immunologic function of human tonsils with special references to E and Eac rosette binding lymphocytes Acta Otolaryngol. 1974; 77: 150-56.

TADA T, ISHIZAKA K: Distribution of IgE forming cells in lymphoid tissue in human and monkey. J. Immunol. 1970; 104: 377.

TAKACS L, OSAWA H, TORO I, DIAMANTSTEIN. Immunohistochemical localization of cells reacting with monoclonal antibodies directed against the interleukin-2 receptor of murine, rat and human origin. Clin. Exp. Immunol. 1985; 59, 37-44.

TAKENAKA H., MIYOSHI O, MIZUKOSHI H SAITO. The effect of tonsillar T cell subpopulations in antigen specific lymphocyte - proliferative response: Evidence of T cell suppression. Acta Otolaryngol (Stockh) 1984; Suppl. 416: 38-44

TAX W J M, TIDMAN N, JANOSSY G, TREJDOSIEWICZ L et al. Monoclonal antibody (WT1) directed against a T cell surface glycoprotein: Characteristics and immunosuppressive activity. Clin. Exp. Immunol. 1984; 55; 427-436.

THIEL E. Biological and clinical significance of immunological cell markers in leukemia. In Recent Results in Cancer Research Leukemia. Edited by E. Thiel and S. Thierfeider. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo. 1984; pp 103-158.

THOMAS Y, SOSMAN J, IRIGOYEN O,. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. Collaborative T-T interactions in the immuno-regulation of B cell - differentiation. J. Immunol. 1980; 125: 2402.

THOMPSON LF, BOSS GR, SPIEGELBERG HL, et al. Ecto-5'Nucleotidase activity in T and B lymphocytes from normal subjets and patients with congenital X-linked agammaglobulinamia. J. Immunol. 1979; 123: 2475.

TIMONEN T, SAKSELA E. RANKI A, and HAYRY P. Cell. Immunol. 1979; 48: 133.

TIMONEN T, SAKSELA E,. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. J. Immunol. Methods. 1980; 36: 285.

TIMONEN T, ORTALDO JR, HERBERMAN R. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and "K cells". J. Exp. Med. 1981; 153: 569-582.

TUNG R, SILBER R, QUAGLIATA F, CONKLYN M, GOTTESMAN J, HIRSCHORN R. Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia relationship to B and T-cell subpopulations. J. Clin. Invest. 1976; 57: 756.

UCHIYAMA T, BRODER S and WALDMANN TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and funtionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. J. Immunol. 1981; 126: 1393.

VAN DER REIGDEN, THIEN SL, CATOVSKY D, OSCIER D, GOLDMAN JM et al. T chronic lymphocitic leukemia presenting as primary hipogammaglobulinaemia evidence of a proliferation of T supressor cell proliferation. Clin. Exp. Inmunol. 1982; 47 (3): 670-676.

VAN DER VALK P, VAN DER LOO EM, JANSEN J, DAHA MR, MEIJER C. Analysis of lymphoid and dendritic cells in human lymph node, tonsil and spleen. Virchows Arch. (Cell Pathol.) 1984; 45: 169-185.

VAN EWIJK W, VERZIGDEN JHM, KWASTTH H, et al. Reconstitution of the thymus-dependent area in the spleen of lethally irradiated mice. A light and electron microscopial study of the T cell micro-environment. Cell. Tiss. Res. 1974; 149: 43-60.

VERBI W, GREAVES MF, SCHNEIDER C, et al.: OKT11 and OKT11A: Monoclonal antibodies with pan T reactivity which block sheep erytrocyte "receptors" on T cells. Eur. J. Immunol. 1982; 12: 81.

VESSIERE LOUVEAUX FM, HIJMAIS W and SCHMIT MRE. Presence of multiple isotypes on the surface of human tonsillar lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1980; 10: 186-191.

VODINELICH L, TAX W, BAI Y, PEGRAM S, et al. A monoclonal antibody (WT1) for detecting leukemias of T cell presursors (T-ALL). Blood 1983; 62: 1103.

VOGLER LB, GROSSI CE, COOPER MD: Human lymphocyte subpopulations. Prog Hematology 1979; 11: 1-39.

WERNET P,. Human Ia-type alloantigens: Methods of detection aspects of chemistry and biology, and markers for disease states. Transplant. Rev. 1976; 30: 271-298.

WHITE RG, FRENCH VJ and STARK JM. A study of localization of

a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centers. J. Med. Microbiol. 1970; 3: 65-83.

WILKE J. Papierchromatographische Histaminbegtimmung im tonsillengewebe. Arch Ohr Nas u Kehlk Heilk 1969; 195: 33-40 in Theoretical and clinical aspects on the tonsillar function Siegel G 1983.

WINCHESTER RJ, FU SM, HOFFMAN T et al: IgG on lymphocyte surfaces: Technical problems and the significance of a third — cell population. J. Immunol. 1975; 114: 1210-1213.

WINCHESTER RJ, ROSS GD, JAROWSKI CI et al: Expression of Ia-like antigen molécules on human granulocytes during early phases of differentiation. Proc Natl Acad Sci. 1977; 74: — 4012-4016.

WODA BA, FENAGLIO CM, NETTE EG, KING DW . The lack of specificity of the sheep erythrocyte-T lymphocyte rosetting phenomenon. Am. J. Pathol. 1977; 88: 69.

YACHIE A, MIYAWAKI T, UWADANA N, et al. Sequential expression of T cell activation (Tac) antigen and Ia determinants on circulating human T cells after immunization with tetanus toxoid. J. Immunol. 1983; 131: 731.

YAMANAKA N, SAMBE S, HARABUCHI Y, KATAURA A. Immunohistological study of tonsil. Acta Otolaryngol. 1983; 96: 509-516.

YAMANAKA N, KATAURA A. Viral infections associated with recurrent tonsillitis. Acta Otolaryngol (Stockh) 1984; suppl. 416: 30-37.

YATA J, TSUKIMOTO J and TACHIBANA T. Human lymphocyte subpopulations. Human thymus-lymphoid tissue (HTL) antigen-positive lymphocytes forming rosettes with sheep erytrocytes and HTL antigen-negative lymphocytes interacting with antigen-antibody complement complexes. Clin. Exp. Immunol. 1973; 14: 3-9.

YU DTY, Mc CUNE JM, FU SM et al: Two types of Ia-positive T cells. Synthesis and exchange of Ia antigens. J. Exp. Med. - 1980; 152: 89-98.

ZUCKER-FRANKLIN D, ALBRIGHT JT: Celular development in the palatine tonsil of the fetal rabbit, with special emphasis on lymphoiesis. Tissue and Cell. 1970; 2: 1.