

# EL TEST DE TRANSFORMACION DE LOS LINFOCITOS (TTL): ALGUNAS APLICACIONES DEL MISMO EN EL LABORATORIO DE ANALISIS BIOLOGICOS

C. VIADER (1), JOSEFINA SOLER, (1), F. ECHEVARNE (2),  
J. V. GARCIA CALDERON (2), P. A. GARCIA CALDERON (2)

## INTRODUCCION

En términos generales, la respuesta inmune de un organismo tras aparición de un determinado tipo de proteínas séricas, conocidas con el nombre de anticuerpos y/o que segregan los denominados mediadores de inmunidad celular o linfoquinas.

Actualmente y gracias a los experimentos realizados por varios grupos de investigadores: DIXON (1), GOWANS (2, 3, 7), Mc GREGOR (4, 5, 6), MILLER (8 a 23), se ha profundizado en el estudio de los linfocitos, estableciéndose su diferenciación en dos poblaciones principales: linfocitos T y linfocitos B, los cuales tienen a su cargo las reacciones de inmunidad retardada cuerpos, respectivamente.

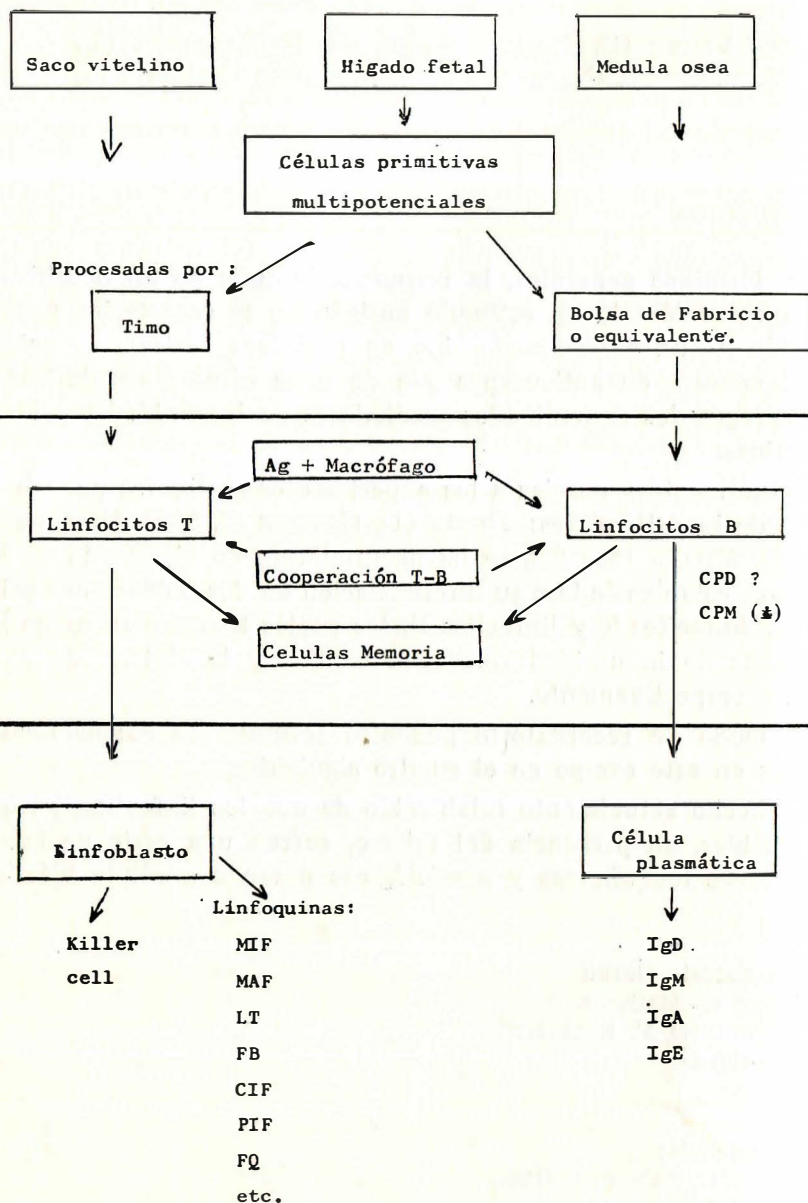
A modo de recordatorio podemos resumir los conocimientos actuales en este campo en el cuadro siguiente:

El hecho actualmente establecido de que los linfocitos, antígeno sensibles, formaciones

- 
- (1) Laboratorio Garau  
Palma de Mallorca  
(2) Laboratorio F. Echevarne  
Barcelona

---

Correspondencia:  
Carlos Viader. Lab. C. GARAU  
C/ Caro, 1-2.º  
Palma de Mallorca



( ⚡ ): Célula precursora de las células que sintetizan IgM.

se utiliza en el laboratorio como test "in vitro" de la existencia de determinado o determinados antígenos, constituyendo lo que se conoce con el nombre de "Test de transformación o TTL".

### *Sustancias activadoras o estimuladoras*

1) En 1959, NOWELL et al. (24 a 27), demostraron que la hemaglutinina (PHA), sustancia extraída de la *Phaseolus vulgaris*, capaz de aglutinar los eritrocitos humanos, inducía la transformación blástica de los linfocitos (28 a 31).

Con este fin, se utilizan en el laboratorio dos preparados de la misma: PHA-P y PHA-M, siendo la primera el extracto protéico y la segunda el mucoprotéico. Existen también sustancias vegetales como el Pokeweed (Americana)

también inducen la transformación blástica de sustancias como la toxina estafilocócica, estreptolisina S, lipopolisacáridos bacterianos e incluso iones Hg son capaces de provocar al ponerse en contacto con los linfocitos su pase a célula blástica, incluso en ausencia de sensibilización previa.

También se han empleado como agentes mitogénicos inespecíficos antisue

Las sustancias mitogénicas pueden ser estimulantes inespecíficos de la población T (Concanavalina A, PHA), B, (PWM) de ambos (PWM en el hombre).

Actualmente se tiende a cambiar los términos de mitógeno o blastógenos específicos o inespecíficos.

2) Además de este primer grupo de estimuladores inespecíficos, cabe distinguir a partir de las experiencias de PEARMAN, un segundo grupo de estimuladores específicos.

PEARMAN et al. en 1963 (33), HIRSCHHORN (32) y SHERK (34), demue

stran que el tuberculín + sufren "in vitro" la transformación blástica a PD. Esta

transformación se produce en individuos, tuberculosos o no, tuberculín negativos.

Ultimamente se realizaron con éxito pruebas de transformación linfoblástica con una amplia gama de antígenos: protozoos, bacte-

rias, hongos, virus, pólenes, proteína  
medicamentos, sustancia

La estimulación con este tipo de agentes tiene como fin primordial la puesta en evidencia de una hipersensibilidad del individuo frente a un determinado antígeno al medir una respuesta de tipo secundario.

En consecuencia, el TTL podemos emplearlo de manera rutinaria  
mentos, sustancias alimenticias, alérgenos inhalantes, etc.

Técnica esta que nos da una correlación aproximada del 90 por ciento entre los resultados de la misma y la historia clínica, en el ca

3) Por último, cabe destacar que otra aplicación de esta prueba se conoce con el nombre de cultivo mixto de linfocitos (MLC) y que en líneas generales consiste en el enfrentamiento de la población linfoide de un posible donante previamente tratada con mitomicina o irradiación con los linfocitos del presunto receptor. En el caso de existir histoincompatibilidad entre ambas poblaciones celulares, apar

Otra variante de esta última faceta, sería la de células tratadas como en el caso anterior, derivadas de tejidos neoplásicos, con linfocitos del sujeto que la  
que también registraríamos un mayor o menor índice de transformación según el estado de respuesta inmune anti-tumor.

Todas estas transformaciones blásticas incluyen un gran número de cambios bioquímicos y morfológicos en el linfocito (49). Bioquímicamente, tras la adición de histonas nucleares precedida de la síntesis de RNA mensajero, aparición de nuevas enzimas lisosómicos e incremento de la síntesis de DNA con posterior replicación celular.

Morfológicamente, el linfocito pasa a célula grande pironinofílica, conocida con el nombre de linfoblasto, yendo acompañado con cambios en la cromatina nuclear durante la siguiente mitosis (50).

## MATERIAL Y METODOS

### 1.—SEPARACION DE LOS LINFOCITOS

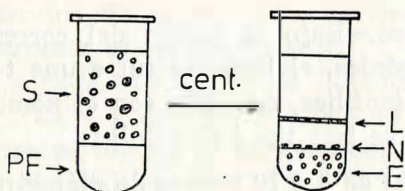
La separación de los linfocitos se efectúa a partir de sangre venosa previamente desfibrinada en condiciones estériles.

Una vez desfibrinada la sangre se mezcla con igual volumen de solución salina isotónica.

Volúmenes de 6 ml de esta sangre diluida se depositan en tubos estériles que contienen 3 ml de Picoll-Urografín.

Los tubos se centrifugan durante veinte minutos a temperatura ambiente a 1.800 rpm en centrífuga horizontal. Los linfocitos aparecen en una interfase perfectamente delimitada (ver figura n.º 1), recogién dose con una pipeta Pasteur. Ulteriormente se lavan x3 con medio de cultivo. Se cuentan y ajustan en el mismo medio a  $5 \times 10^6/\text{ml}$ .

FIG-1



## 2.—PREPARACION DEL FICOLL-UROGRAFIN

Se añade Urografín (Shering) al 76 por ciento a una solución acuosa de Ficoll (Pharmacia) al 8 por ciento hasta lograr una densidad de 10.80. Esta mezcla se esteriliza en autoclave.

## 3.—PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Se mezclan:

- 50 ml de "Medium 199" 10 X con Earle's Salts (Gibco)
- 450 ml de agua destilada estéril
- 10 ml de anti-PPLO (Gibco)
- 12 ml de Hepes 1 M (Gibco) pH = 8

El pH del medio así preparado debe ser de 7,2 a 7,4.

## 4.—CULTIVO DE LOS LINFOCITOS

Volúmenes de 0,1 ml de la suspensión linfoide serie de tubos que contienen:

- a) solo
- b) medio de cultivo y PHA
- c) Diluciones del alergeno en medio de cultivo: 1/1.000, 1/5.000, 1/10.000 y 1/50.000.

Toda esta serie de tubos contarán además con un 10 por ciento de suero fetal de ternera (FCS) (66).

La serie de tubos se montará en duplicado.

Los tubos se incuban durante 96 horas a 37°C.

A partir de aquí, pueden seguirse de los resultados. Por una parte, se puede estudiar la transformación blástica morfológicamente o empleando, por otra parte, marcadores

A) *Lectura morfológica.*—Bajo la acción del correspondiente mitógeno o sustancia antigénica, el linfocito sufre una transformación o célula grande pironínofílica, conocida con el nombre de linfoblasto, pudiendo observarse

- El típico linfocito normal de 8 a 10 micras de diámetro.
- La célula blástica con diámetro de 20 a 30 micras.
- Tipos intermedios de células de apariencia linfoblástica y diámetro entre 12 y 20 micras.

El método de tinción a emplear puede ser:

- Resuspensión de las células una vez centrifugado el tubo y decantado el sobrenadante en 0,1 ml de medio de cultivo.
- Agregar 0,1 ml de azul tripán al 0,16 por ciento.
- Incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Añadir 1 ml de citrato sódico al 1 por ciento.
- Centrifugar durante 5 minutos y decantar el sobrenadante.
- Resuspender la

Pasados 10 minutos centrifugar, decantar efectuar extensiones.

- También pueden teñirse las preparaciones con Giemsa.

Se consideran como positivos aquellos linfocitos que presentan coloración eucromática, dando como resultado positivo de sensibi-

lización frente a antígenos los valores ciento de los linfocitos contados.

B) *Método isotópico*.—En esta variante se mide la cantidad de timidina o leucina  $^3\text{H}$  o  $\text{C}^{14}$  incorporada por las células (65). El modo operativo es el siguiente:

- Tras incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 96 horas se añade a cada tubo  $2\ \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada (actividad específica  $20,5\ \text{Ci}/\text{mmol}$ . The Radiochemical Center. Amersham, England).
- Incubar nuevamente durante 12 horas a  $37^\circ\text{C}$ .
- Centrifugar durante 10 minutos a 3.000 rpm y decantar sobrenadante.
- Resuspender el sedimento celular en solución salina fría.
- Filtrar sobre filtros Whatman GF/C  $2,4\ \text{cm}\ \varnothing$  empleando un aparato de filtración Sartorius acoplado a una bomba de vacío.
- Tratar el depósito celular del filtro con 20 ml de ácido tricloro-  
a
- Depositar los filtros
- Secar durante 60 minutos a  $80^\circ\text{C}$ .
- Añadir a cada vial 10 ml de líquido de centelleo (0,0379 g de POPOP; 22,74 g de PPO y 3,79 l de tolueno).
- La lectura se verifica en un contador de centelleo líquido, expresándose el resultado en CPM o DPM de las que se obtiene un índice de transformación.

$$\text{IR} = \frac{\text{CPM o DPM en presencia de antígeno}}{\text{CPM o DPM sin antígeno}}$$

En la figura n.º 2 se encuentran esquematizados los pasos principales de esta técnica.

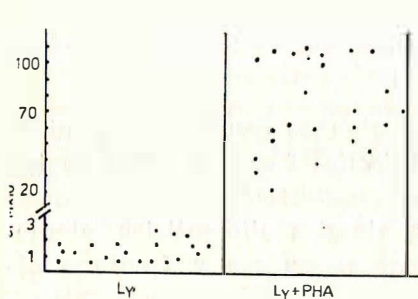
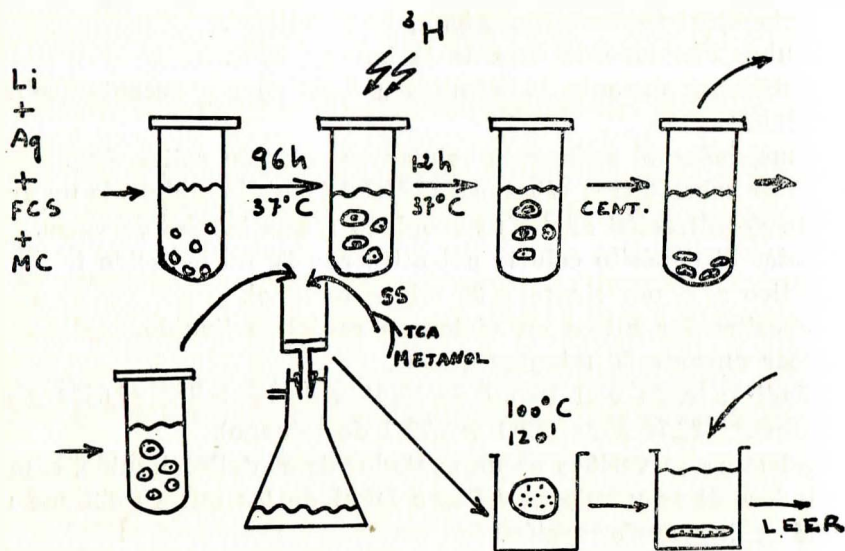
## RESULTADOS

A modo de ejemplo se pres en nuestro laboratorio al cultivar linfocitos frente a PHA, penicilina en sujetos no alérgicos, diversas sensibilizaciones medicamentosas causadas por fármacos varios, alergias alimenticias, alérgenos inhalant  
lulas autólogas.

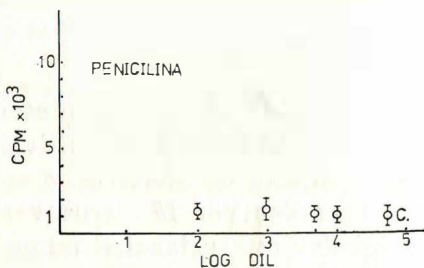
En abscisas se representa el loga  
pleadas y en ordenadas el número de CPM o índice obtenido.

La letra "C" representa  
linfoide cultivada

FIG. 2



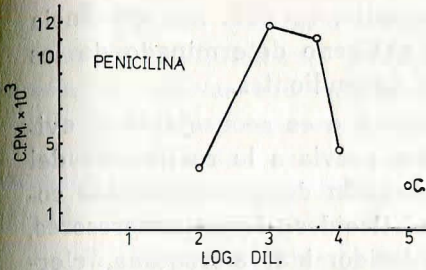
Medidas en un grupo de linfocitos de sujetos normales antes y la activación con PHA.



Medidas de CPM obtenidas al cultivar otros potenciales inhibidores de sustrato sobre en presencia de penicilina.

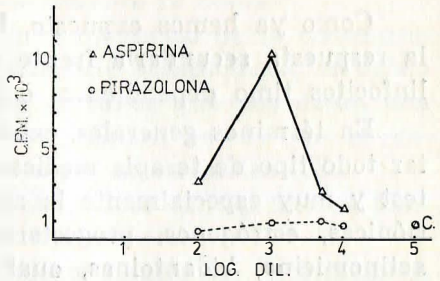


5



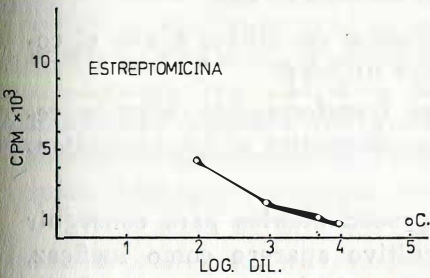
Respuestas obtenidas al cultivar linfocitos de sujeto alérgico a la Penicilina.

6



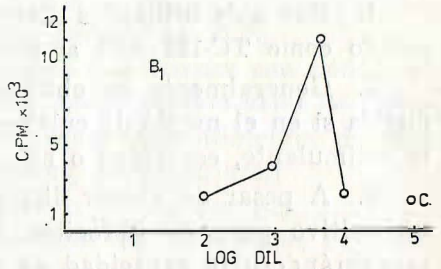
Respuestas obtenidas al cultivar linfocitos de sujeto alérgico a la Aspirina. También de del mismo sujeto frente a la Pirazolona en la que claramente observamos su negatividad.

7

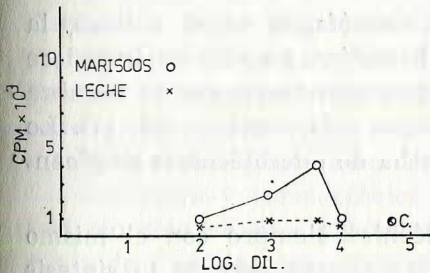


Respuestas obtenidas al cultivar linfocitos de sujeto alérgico a la Estreptomycina.

8

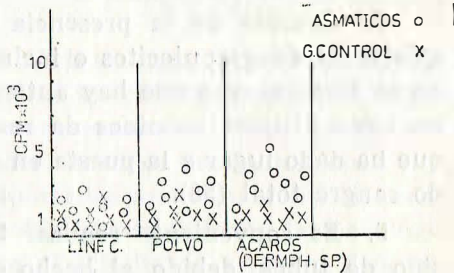


Respuestas obtenidas al cultivar linfocitos de sujeto alérgico a B<sub>1</sub>.



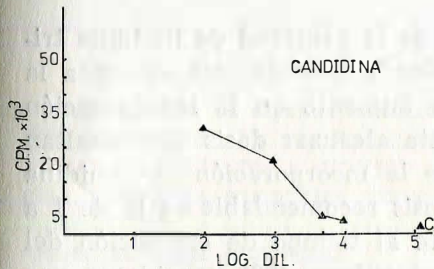
Reacción alérgica alimentaria positiva a los mariscos (○) y negativa (×) a la leche de vaca.

10



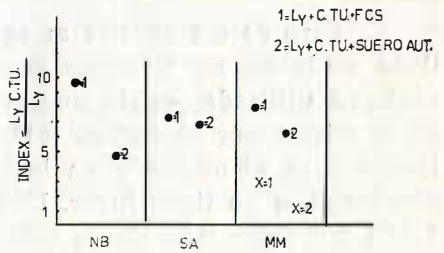
TTL reactiva (○) a extracto de polvo de casa y Acaros (Dermatophagoides sp.) en un grupo de 10 asmáticos asmáticos. TTL negativa (×) a los mismos alérgenos en una población control normal.

11



Hipersensitividad a la estimulación específica con Candidina.

12



Resultados del TTL al ser sometido linfocitos de enfermos con neuroalergia (NB), seroma (SA) y dermatitis atópica (MM) con células linfocitos autólogo (seromas) en (1) y con (2) suero autólogo.

## CONSIDERACIONES GENERALES

Como ya hemos expuesto, la respuesta secundaria frente a un antígeno determinado de los linfocitos timo dependientes o bursa dependientes.

En términos generales, cabe indicar que es aconsejable todo tipo de terapia medicamentosa previa a la realización del test y muy especialmente ríonicas, estrógenos, progesterona, corticoides, inmunosupresores, actinomicina, hidantoinas, ouabaina, talidomida, cloroquina, clorpromacina, etc. (51 a 55) (64).

En la práctica del TTL es preciso considerar que:

1. Han sido utilizados diversos medios de cultivo y que el conocido como TC-199 está ampliamente utilizado.

2. Generalmente se obtiene una transformación blástica reducida si en el medio de cultivo no se encuentra el correspondiente estimulante, específico o no.

3. A pesar de existir distintos procedimientos para conseguir un cultivo puro de linfocitos, tal cultivo aparece como ineficaz, recuperándose la capacidad de respuesta de los mismos al añadir macrófagos al cultivo.

4. Además de la presencia de macrófagos en el cultivo, la existencia

en la técnica, sino que hay autores que consideran que la siembra en estos últimos términos da resultados más precisos (56, 57). Lo que ha dado lugar a la puesta en marcha de microtécnicas empleando sangre total (58).

5. Es conveniente realizar la técnica siempre con el mismo tipo de tubos, debido al hecho de las alteraciones de la síntesis de DNA según el (59, 60).

6.—Otro dato a considerar es el de la cantidad de timidina tritiada utilizada. En términos generales, cantidad utilizada, existe un mayor aumento en la incorporación de la misma por el cultivo (61) hasta alcanzar dosis que resultan letales para el mismo y en las que la incorporación de timidina disminuye, o no tiene lugar. Una dosis recomendable es la de 1 a 2  $\mu\text{Ci}$  por tubo (62). En lo referente al tiempo de exposición del cultivo a la timidina tritiada, algunos autores (62), consideran

alrededor de 4 horas es suficiente. En nuestra práctica, es preferible exponer los cultivos

7. En lo que hace referencia a la influencia de la concentración de estimuladores ya sean específicos o inespecíficos, se deben efectuar curvas con concentraciones variables que nos darán una idea más completa del funcionamiento celular, por lo que la realización de estas curvas resultan siempre aconsejables (63).

En cuanto a los estimuladores específicos (antígenos) es también necesario la utilización de diluciones varias.

8. La utilización enfermos (procesos autoinmunes, neoplásicos, infecciosos) la aparición de una inhibición de la transformación, al existir factores séricos bloqueantes, por lo que, en consecuencia y a menos que quieran

Existen toda una serie de procesos que cursan inmunidad celular y que por lo tanto darán bajos niveles de transformación (síndrome de Di-George, agammaglobulinemia de tipo suizo, neoplasias, procesos

Otra se  
una depresi  
frente

También existe una reducción de la transformación en sujetos durante la etapa

Finalmente, también se ha demostrado una pérdida en la capacidad de respuesta de los linfocitos en enfermos de edad avanzada y por el contra  
mentada en las poblaciones linfoides de niños recién nacidos.

Los datos y consideraciones aportadas  
test, no sólo en el diagnóstico  
cas

rios inmunes y patológicos varios (67, 68).

## RESUMEN

Se estudió el test de transformación de linfocitos (TTL) analizándose algunos de los resultados obtenidos en sujetos no alérgicos y enfermos sensibilizados a diferentes sustancias: alergias alimenticias, alergias inhalantes, sustancias nitrogenadas específicas, sensibilizaciones medicamentosas y frente a células tumorales irradiadas empleando poblaciones linfoides autólogas.

Se realizan finalmente unas consideraciones generales a las técnicas.

## SUMMARY

The test transformation lymphocyte (TTL) was studied, and the results obtained were analyzed in subjects with different substances (foods, specific mitogens, inhalants allergens, drugs) and against irradiated tumor cells using autologous linfoide population.

Finally general considerations to the technique were made.

## RÉSUMÉ

On a étudié le test de transformation de lymphocytes (TTL) analysant plusieurs des résultats obtenus en sujets non allergiques et malades sensibilisés à différents substances: allergies alimentaires, allergènes inhalants, substances mitogènes spécifiques, médicaments et cellules de tumeur irradiées employant populations lymphoïdes autologues.

On effectue finalement une considération générale de la technique.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—DIXON, F. J.; WEIGLE, W. C. and ROBERTS, J. C.: *J. Immunol.* 78: 56 (1957).
- 2.—GOWANS, J. L.; MCGREGOR, P. D.; GOWAN, P. M. and FORD, C. E.: *Nature*, 196: 651 (1962).
- 3.—GOWANS, J. L.; MCGREGOR, P. D., and COWEN, P.: Ciba Foundation Study Group n.º 16, London (1963).
- 4.—MCGREGOR, P. D. and GOWANS, J. L.: *J. exp. Med.* 117: 303 (1963).
- 5.—MCGREGOR, P. D. and GOWANS, J. L.: *Lancet* i: 629 (1964).
- 6.—GOWANS, J. L. and UHR, J. W.: *J. exp. Med.* 124: 1017 (1966).
- 8.—MILLER, J. F. A. O.: *Lancet* i: 748 (1961).
- 9.—MILLER, J. F. A. O.: *Ann. N. Y. acad. Sci.* 99: 300 (1965).
- 10.—MILLER, J. F. A. P.: *Nature* 195: 1318 (1962).
- 11.—MILLER, J. F. A. P.: *Nature* 208: 1337 (1965).
- 12.—MILLER, J. F. A. P.: *Brit. med. Bull.* 22: 21 (1966).
- 13.—MILLER, J. F. A. P.: in *Modern Trends in Pathology*. Butterworths. London, p. 140 (1967).
- 14.—MILLER, J. F. A. P. and DAVIS, A. J. S.: *Ann. Rev. Med.* 15: 23 (1964).
- 15.—MILLER, J. F. A. P. and HOWARD, J. G.: *J. Reticuloend. Soc.* 1: 369 (1964).
- 16.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: *Nature*, 216: 659 (1967).
- 17.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: *J. exp. Med.* 128: 801 (1968).
- 18.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: *Adv. exp. Med. Biol.* 5: 455 (1969).
- 19.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: *Trans. Rev.* 1: 3 (1969).
- 20.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: *Transplan. Proc.* 1: 535 (1969).
- 21.—MILLER, J. F. A. P. and OSOBA, D.: *Physiol. Rev.* 47: 437 (1967).
- 22.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: *Nature*, 214: 992 (1967).

- 23.—MILLER, J. F. A. P. and MITCHELL, G. F.: in Ciba Foundation Symp. London (1970).
- 24.—HUNGERRORD, D. A.; DONNELLY, A. J.; NOWELL, P. C. and BECK, S.: Amer. J. hum. Gen. 11: 215 (1959).
- 25.—NOWELL, P. C.: Cancer Res. 20: 462 (1960).
- 26.—NOWELL, P. C.: Cancer Res. 21: 1518 (1961).
- 27.—NOWELL, P. C.: Cancer Res. 20: 562 (1960).
- 28.—CARSTAIRS, K.: Lancet ii: 984 (1961).
- 29.—HASTINGS, J.; FREEDMAN, S.; RENDON, O.; COOPERMAN, H. L. and HIRSCHORN, K.: Nature, 192: 1214 (1961).
- 30.—MCKINNEY, Jr.; STOHLMAN, F. and BRECHER, G.: Blood, 19: 349 (1962).
- 31.—MARSHALL, W. H. and ROBERTS, K. B.: J. exp. Physiol. 48: 146 (1963).
- 32.—HIRSCHHORN, K.; BACH, F.; KOLODNY, R. L.; FIRSCHEIN, I. L.: and HASHEM, N.: Science, 142: 1185 (1963).
- 33.—PEARMAN, G.; LYCETTE, R. R. and FITSGERALD, P. H.: Lancet i: 637 (1963).
- 34.—SAREK, R.: Amer. Rev. Resp. Dis. 87, 734 (1963).
- 35.—BOURENG, R.; GARDELL, S.; KOW, B. and NOR EN, A.: Scand. J. Haemat. 4: 125 (1967).
- 36.—CARON, G. A. and SARKANY, I.: Brit. J. Derm. 77: 556 (1965).
- 37.—CARON, G. A. and SYARKANY, I.: Int. Arch. Allergy, 31: 521 (1967).
- 38.—COWLING, D. C. and QUAGLINO, D.: J. Path. Bact. 89: 63 (1965).
- 39.—COWLING, D. C. and QUAGLINO, D.: Lancet ii, 1091 (1963).
- 40.—FELLNER, N. J.; BAER, F. L.; RIPPS, C. S. and HIRSCHHORN, K.: Nature, 216: 803 (1967).
- 41.—GANDEINI, E. and GARTLER, S. M.: Nature, 203: 898 (1964).
- 42.—GILL, F. A.: J. Immunol. 98: 778 (1967).
- 43.—HALPERN, B.; KY, N. T. and AMACHE, N.: J. Allergy, 40: 168 (1967).
- 44.—KELLEY, J. B.; STANFIELD, A. B. and DUKESM, C. D.: Amer. Rev. Res. Dis. 97: 1131 (1968).
- 45.—LYCETTE, R. R. and PEARMAN, G. E.: Lancet ii: 386 (1963).
- 46.—STULBARG, M. and SCHOLSSMAN, S. F.: Immunol. 101: 764 (1968).
- 47.—DOBOZY, A.; HUNYADI, J. and SIMON, N.: Lancet ii: 1319 (1972).
- 48.—HALPERN, B.: in New Concepts in Allergy and Clinical Immunology. Excerpta Medica, Amsterdam (1971).
- 49.—NEUWISSEN, H. J.; STUTMAN, O. and GOOD, R. A.: Sem. Hem. 6: 28 (1969).
- 50.—CHALMERS, D. G.; COOPER, E. H.; COULSON, A. S.; INMAN, D. R. and TOPPING, N. E.: Int. Arch. Allergy, 30: 83 (1966).
- 51.—PISCIOTTA, A. V. and DE PREY, C.: Blood, 30: 457 (1967).
- 52.—JENKINS, E. C.: Lancet 2: 437 (1972).
- 53.—MCLLVABUE, S. K.: Lancet 1: 323 (1972).
- 54.—PURTILO, D. T.; HALLGREN, H. M. and YUNIS, E. J.: Lancet 1: 769 (1972).
- 55.—HAGEN, C. and FROLANND, A.: Lancet 1: 1185 (1972).
- 56.—DEAN, J. H.; MCKOY, J. L.; BALOUGH, L.; RUBIN, D. J. and HERBERMAN, R.: Fed. Proc. 32: 1034 (1973).

- 57.—HAN, T.; MOORE, G. E. and SOKAL, J. E.: Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 136: 976 (1971).
- 58.—KISSLING, M. and SPECK, B.: Lancet 1: 452 (1972).
- 59.—CHAPMAN, N. D. and DUTTON, R. W.: J. exp. Med. 121: 85 (1965).
- 60.—MOORHEAD, J. F.; CONNELLY, J. J. and MCFARLAND, W. M.: J. Immunol. 99: 413 (1967).
- 61.—HARTOG, M.; CLINE, M. J. and FRODSKY, G. M.: Clin. exp. Immunol. 2: 217 (1967).
- 62.—SAMPLE, W. F. and CHRETIEN, P. B.: Clin. exp. Immunol. 9: 419 (1971).
- 63.—FITZGERALD, M. G.: J. Clin. Path. 25: 161 (1972).
- 64.—FAUCI, A. S.: Immunology, 28: 669 (1975).
- 65.—KATAOKA, Y. and SADO, T.: Immunology, 29: 131 (1975).
- 66.—GREGERSON, D. S.; BARBARA KELLY and JULIA G. LEVY: Immunology, 29: 237 (1975).
- 67.—GIMENEZ-CAMARASA, J. M., D. D., GARCIA-CALDERON, P. M. D., MORAGAS, J. M. de, M. D.: New England J. of Medicine: n.º 292: 819-821 (1975).
- 68.—GIMENEZ-CAMARASA, J. M., M. D., GARCIA-CALDERON, P. M. D., ASENSIO, J., M. D., MORAGAS, J. M. de, M. D.: Brit. J. Derm. 92: 8 (1975).