

**DETERMINACIÓN DE VALORES DE LINFOCITOS T CD3+, CD4+ Y
CD8+ POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN 60 DONANTES DE SANGRE
ADULTOS DE BOGOTÁ**

LIBIA SUSANA BARRERO BUITRAGO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ, DICIEMBRE 1 DE 2000**

**DETERMINACIÓN DE VALORES DE LINFOCITOS T CD3+, CD4+ Y
CD8+ POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN 60 DONANTES DE SANGRE
ADULTOS DE BOGOTÁ**

LIBIA SUSANA BARRERO BUITRAGO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar el título de

BACTERIÓLOGA

DIRECTOR

JOHN MARIO GONZALEZ M.D. Ph.D.

CO-DIRECTOR

NELLY SUSANA RUEDA Ms. C

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, DICIEMBRE 1 DE 2000

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

**DETERMINACIÓN DE VALORES DE LINFOCITOS T CD3+, CD4+ Y
CD8+ POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN 60 DONANTES DE SANGRE
ADULTOS DE BOGOTÁ**

LIBIA SUSANA BARRERO BUITRAGO

DR. CARLOS CORREDOR
DIRECTOR FACULTAD DE
CIENCIAS

DRA. AURA ROSA
MANASCERO
DIRECTORA CARRERA DE
BACTERIOLOGÍA

DRA. NELLY LUPE MARTÍNEZ
JURADO

DRA. DIANA PATIÑO
JURADO

DR. JOHN MARIO GONZALEZ
DIRECTOR

DRA. NELLY SUSANA RUEDA
CODIRECTORA

DRA. ADRIANA CUELLAR
ASESORA

A DIOS POR HABERME TOMADO SIEMPRE DE SU MANO,
GUÍANDOME POR EL CAMINO QUE CONDUCCIÓN A ESTA
META ALCANZADA.

A MIS PADRES QUIENES CON SU ESFUERZO
PERMITIERON LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS DE
BACTERIOLOGÍA BRINDANDOME ASÍ LA MEJOR
HERRAMIENTA DE VIDA: EL SABER.

A MI FAMILIA POR SUS CONTINUAS VOCES DE ALIENTO
Y POR ESTAR SIEMPRE DISPUESTA A COLABORARME.

A ISMAEL POR SU PACIENCIA, SU GRAN
COLABORACIÓN, POR SER MI APOYO EN LOS MOMENTOS
DE DIFICULTAD Y PERMANECER SIEMPRE A MI LADO.

GRACIAS . . .

Al Doctor John Mario Gozalez, del grupo de investigación de Inmunobiología de la Pontificia Universidad Javeriana, y Director del trabajo, por haberme permitido trabajar a su lado, por sus valiosas orientaciones y los conocimientos transmitidos.

A la Doctora Nelly Susana Rueda, del grupo de investigación de Inmunobiología, por su constante motivación, por el constante apoyo brindado en este trabajo y por la amistad brindada.

A la Doctora Adriana Cuellar, del grupo de investigación de Inmunobiología de la Pontificia Universidad Javeriana, por el gran interés que demostró en este trabajo estando dispuesta a colaborar en lo que fuese necesario en aras de un buen desarrollo del mismo.

A la Doctora Claudia Cardozo, Directora del Laboratorio Clínico y Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio, por haber permitido obtener de su laboratorio las muestras para la realización de este estudio.

Al personal del Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio por la colaboración prestada en el proceso de recolección de muestras para este trabajo.

A las personas que hacen parte del Laboratorio de Inmunobiología, por toda la colaboración que me ofrecieron y por ser una mano amiga que brinda apoyo y ayuda a quien lo requiera.

A Olga Peña por todos los años compartidos a su lado, porque a pesar de las diferencias es una gran amiga y ha estado dispuesta a apoyarme, a compartir mis alegrías y tristezas; luchando juntas hombro a hombro durante 16 años de nuestra vida por el cumplimiento de cada meta que nos proponemos alcanzar.

A Diana Benavides por la amistad que me brindó durante estos 5 años de la carrera, por ser esa buena amiga difícil de encontrar, dispuesta a colaborar, a escuchar y a brindar lo mejor de sí por los demás.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. LINFOCITOS T	4
2.1.1. Morfología	5
2.2. MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS T	6
2.2.1. Expresión de CD4 y CD8	11
2.2.1.1. Estructura y función del CD4	11
2.2.1.2. Estructura y función del CD8	12
2.2.2. Evolución de los marcadores CD4 y CD8	14
2.2.3. Selección Tímica	16
2.3. CITOMETRÍA DE FLUJO	18
2.3.1. Antecedentes	18
2.3.2. Fundamentos	19
2.3.3. Componentes de un citómetro de flujo	22
2.3.4. Aplicaciones de la citometría de flujo	23
2.4. VARIACIONES DE LOS LEUCOCITOS	25
2.4.1. Variaciones de los linfocitos	28
2.4.2. Linfocitopenia de célula T CD4	32
3. JUSTIFICACIÓN	36

4. OBJETIVOS	38
4.1. OBJETIVO GENERAL	38
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5. MATERIALES Y METODOS	40
5.1. TIPO DE ESTUDIO	40
5.2. MUESTRA	40
5.2.1. Obtención de la muestra	40
5.2.2. Criterios de selección	41
5.3. EQUIPOS	43
5.4. METODOS	43
5.4.1 Recuento Total de leucocitos	43
5.4.2 Recuento diferencial de leucocitos obtenidos por el método manual	44
5.4.3. Marcación por citometría de flujo	45
5.4.4. Conteo de leucocitos por citometría de flujo según tamaño y granularidad, y los marcadores CD14 vs. CD45	47
5.4.5. Citometría de flujo para obtener subpoblaciones CD3, CD4 y CD8	50
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
6. RESULTADOS	54
7. DISCUSIÓN	63
8. CONCLUSIÓN	67
9. RECOMENDACIONES	68

10.	ANEXOS	69
11.	BIBLIOGRAFÍA	70

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Codiciones que alteran los linfocitos T.	31
Tabla 2. Valores de Leucocitos, Linfocitos, Linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+.	59
Tabla 3. Percentiles 5 al 95 de Leucocitos, Linfocitos, Linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+.	62
Tabla 4. Comparación de percentiles 5 y 95 en los diferentes estudios realizados.	66

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Moléculas CD4 y CD8.	14
Figura 2. Leucocitos según Tamaño (FSC) vs. Granularidad (SSC).	48
Figura 3. Leucocitos según marcadores CD14 Vs. CD45.	49
Figura 4. Control negativo	50
Figura 5. Linfocitos T CD3+	51
Figura 6. Linfocitos T CD4+ y CD8+	52

ABREVIATURAS

- ?: Porcentaje.
- ADN: Acido desoxirribonucleico.
- APC: Célula presentadora de antígeno.
- ARN: Acido ribonucleico.
- c.c. Centímetros cúbicos.
- CD: Cluster of designation.
- CDC: Centro de control de enfermedades.
- C-Kit: Receptor de factor de crecimiento de la célula germinal hematopoyética.
- CPDA: citrato, fosfato, dextrosa, adenina.
- DS: Desviación estándar.
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
- FSC: Forward Scatter.
- HUSI: Hospital Universitario San Ignacio.
- Ig: Inmunoglobulina.
- LB: Linfocitos B.
- LT: Linfocitos T.
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- ml: mililitro.
- NK: Células asesinas naturales.

nm: nanómetros.

PBS: Buffer salino fosfato.

PE: Ficoeritrina.

PerCP: Peridin chlorophyl protein.

PTá: Cadena α pre- T.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

R²: Coeficiente de correlación.

SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida.

Sp: Simple positiva.

SSC: Side Scatter.

Th: Linfocitos T ayudadores.

Tc: Linfocitos T citolíticos.

TCR: Receptor de la célula T.

TriTest: Tree- color direct immunoflorescence.

μ l: Microlitro.

Vs.: Versus

RESUMEN

Los linfocitos T son células que juegan un papel importante en la función y regulación del Sistema Inmune. La medición de estas poblaciones celulares con anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores específicos, es importante como ayuda diagnóstica y comprensión de la fisiología de ciertas enfermedades que se caracterizan por alteración en el número de linfocitos; como es el caso del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En el SIDA, para la clasificación, el manejo del paciente, tratamiento y progresión de la enfermedad, se utiliza la medición de subpoblaciones de linfocitos T por Citometría de Flujo. El propósito de este estudio fué determinar los valores de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ en una población adulta sana (18-45 años de edad) en Bogotá por el método de citometría de flujo. Se seleccionaron 60 muestras de sangre periférica de donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá (HUSI) según criterios preestablecidos para el estudio. A las muestras de sangre se les analizó la población de leucocitos mediante los métodos de recuento manual total y diferencial; así como recuento de linfocitos totales utilizando anti-CD14.PE y anti-CD45.PerCP (Becton Dickinson) y de las subpoblaciones CD3+, CD4+ y CD8+ con TRITest™ (Becton Dickinson). Las muestras fueron adquiridas y

analizadas en un citómetro de flujo (FACS Calibur Becton Dickinson) con el programa Cell Quest.

A los diferentes valores obtenidos, se les aplicaron medidas estadísticas como rango estadístico de Dixon para observar valores aberrantes, coeficiente de correlación entre los diferentes tipos de recuento leucocitario, media, desviación estándar y percentiles 5 y 95. A partir de esta última medida estadística, se establecieron los valores de linfocitos, obteniéndose que los linfocitos T CD3+ expresados en porcentaje presentan un promedio de 64.9, con percentiles 5 y 95 de 50.1 - 79.4 y en microlitros, el promedio es 1358.8, con percentiles 5 y 95 de 743.7 - 2259.8. Para los linfocitos T CD4+ expresados en porcentaje presentan un promedio de 52.5 con percentiles 5 y 95 de 34.8 - 65.2 y en microlitros un promedio de 702 y percentil 5 y 95 de 349.3 - 1256.3. Finalmente los linfocitos T CD8+ expresados en porcentaje presentan promedio de 40.1 y valores en percentiles 5 y 95 de 27.3 - 56.5 y en microlitros, media de 555.6 y percentil 5 y 95 de 225.7 y 1011.2. Estos valores son similares a los reportados tanto a nivel nacional como internacional.

ABSTRACT

T-lymphocytes are cells playing a significant role for Immune System function and regulation. The count of those cell populations by using monoclonal antibodies targeted to specific markers, is important as a diagnostic aid and to understand the physiology of some diseases featured by the alteration of the number of lymphocytes, such as in Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The purposes of this study was to determine T CD3+, CD4+ and CD8+ lymphocytes in an adult population (18- 45 age) in Bogotá, by using flow cytometry method. Sixty samples of peripheral blood from donors of the Blood Bank in San Ignacio University Hospital (HUSI) were singled out to the criteria previously set out for the study. Lymphocyte population of the blood samples were analyzed by manual total and differential count, as well as lymphocytes total count using Anti-CD14.PE and anti-CD45.PerCP (Beckton Dickinson) and CD3+, CD4+ and CD8+ subpopulation with TRITest™ (Becton Dickinson, by using flow cytometry.

Lymphocytes values were established and it was found that T CD3 lymphocytes expressed in percentage, show 64.9 average, with

percentiles 5 and 95 from 50.1- 79.4 and in microliters 1358.8 average, with percentiles 5 and 95 from 743.7- 2259.8. For CD4+ lymphocytes expressed in percentage show 52.5 average, and percentiles 5 and 95 from 34.8- 65.2 and in microliters 702 average and percentiles 5 and 95 from 349.3- 1,256.3. Finally, T CD8+ lymphocytes expressed in percentage show an average of 40.1 and percentiles 5 and 95 from 225.7 and 1,011.2. Such values are similar to those reported both at national and international level.

1. INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T son un grupo heterogéneo de células cuyos precursores provenientes de la médula ósea presentan una maduración posterior en el timo. Los linfocitos T juegan un papel importante en la función y regulación del sistema inmune y poseen características comunes como la expresión de la molécula CD3 y el receptor específico (TCR). (Janeway, 1996).

Existen dos subtipos de linfocitos T que representan el mayor porcentaje: los linfocitos T ayudadores (Th) que expresan en su membrana la molécula CD4 y los linfocitos T citolíticos (Tc) que expresan en su membrana la molécula CD8. (Lee, 1995).

A su vez estas los linfocitos T interaccionan con los linfocitos B o con otros linfocitos ayudando a su división, diferenciación y a la síntesis de anticuerpos, como también a la destrucción de patógenos a través de la generación de señales sobre la célula con la que cooperan. Además, interaccionan con las células diana o blanco y liberan sustancias que lisan células tumorales o infectadas. (Regueiro, 1997).

La medición de esta población celular a través de anticuerpos monoclonales contra sus marcadores específicos es muy importante para el diagnóstico y esclarecimiento de ciertas enfermedades que se caracterizan por alteración en el número de linfocitos. Dichas alteraciones en los valores de los linfocitos se observan en enfermedades crónicas, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias primarias o secundarias, y especialmente en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) producido por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). En el SIDA se usa la medición de los linfocitos T CD4+ / CD8+ para clasificar la enfermedad, determinar el manejo del paciente, monitorear la eficiencia del tratamiento y la progresión de la enfermedad. (Centres for Disease Control, 1997; Loboguerrero, 1986).

Actualmente en la unidad de Citometría de Flujo de la Pontificia Universidad Javeriana se realiza la tipificación de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ para pacientes que presentan alteraciones en las cifras de estas células, especialmente personas que tienen SIDA, y debido a la importancia de este exámen, se planteó como objetivo primordial de este estudio determinar los Valores de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ en una población sana entre 18 y 45 años en Bogotá por la técnica de Citometría de Flujo, valiéndose de los equipos que la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana posee en este campo, con el fin de obtener valores para el laboratorio de estos linfocitos y poder determinar

si se asemejan o no a los valores publicados por la literatura nacional e internacional (Avila, 1996; Salgado, 2000).

2. MARCO TEÓRICO

Los linfocitos se dividen en tres grandes grupos: los linfocitos T (LT), los linfocitos B (LB) y los linfocitos asesinos naturales (NK). (Janeway, 1996).

2.1. LINFOCITOS T

Una parte de las células precursoras linfoides de la médula ósea emigra al timo donde prolifera y se diferencia para adquirir las características celulares de los LT, y migrar hacia los órganos linfoides periféricos. El timo funciona de manera primaria durante la vida fetal y los primeros años de existencia, por tanto, el sistema linfoide T se desarrolla en su totalidad al nacer (McKenzie, 1991).

Los linfocitos y otros leucocitos, expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie. Algunas de estas moléculas aparecen en determinados estadios de la diferenciación o activación celulares durante breves períodos de tiempo, mientras que otras son características de distintas líneas celulares. Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores de superficie celular, y en muchas de ellas esta identificación se puede

realizar mediante anticuerpos monoclonales. Se ha desarrollado una nomenclatura para estas moléculas de la superficie celular que corresponde al sistema CD – *cluster of designation*). (Roitt, 1991). Es así como las células T se identifican mediante anticuerpos monoclonales contra sus antígenos específicos.

Algunos anticuerpos monoclonales detectan antígenos como el CD3 presente en todos los linfocitos T, y otros contra el CD4 que reconocen a las células colaboradoras y el CD8 que interactúan con las células citotóxicas. Los otros antígenos importantes son el CD2 y el CD5. Los timocitos y las células activadas expresan marcadores que no se observan en los linfocitos T en reposo y son relevantes en la evaluación de los pacientes con leucemia, infección o patología autoinmune. (Lee, 1995).

2.1.1. MORFOLOGÍA

El linfocito es una célula esférica o discretamente ovoide, de 8 a 12 micras de diámetro. Estas células muestran relación núcleo-citoplasma alta y núcleo compacto grande con indentaciones poco acentuadas. El núcleo que ocupa el 90% del volumen de la célula está formado por densos grumos de cromatina que se tiñen intensamente de púrpura. El citoplasma de la célula es delgado y forma un anillo alrededor del núcleo

que se tiñe de azul claro. La movilidad de estas células se hace por prolongaciones citoplasmáticas en el sentido del movimiento de la célula y simultáneamente presenta discretos movimientos ameboides de su membrana celular. En esta célula los distintos organelos celulares están representados en forma mas o menos rudimentaria. El aparato de Golgi es escaso, se encuentran algunos ribosomas libres y un esbozo de retículo endoplásmico; los microtúbulos y las microfibrillas están presentes pero en menor cantidad que los polimorfonucleares como corresponde a su menor capacidad de movilidad. (Rojas,1995).

2.2. MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS T

El proceso de maduración de las células T consta de tres etapas estrechamente relacionadas como son: migración y proliferación, diferenciación del timocito y selección positiva y negativa.

El esbozo del timo humano aparece a los 40 días de gestación y se coloniza con células linfoides en el primer trimestre, entre los 70 a 75 días o tres semanas antes de la llegada de los linfocitos a los órganos linfoides periféricos. Las células hematopoyéticas pluripotenciales abandonan el saco vitelino y el hígado entre la séptima y cuarta semana para alojarse posteriormente en el timo. (Lee,1995).

Los timocitos más inmaduros no expresan TCR, CD3 ni cadenas ζ y son incapaces de reconocer o responder a antígenos, no ejercen funciones efectoras, pero si expresan moléculas de superficie como son C-Kit (receptor de un factor de crecimiento de la célula germinal hematopoyética llamado ligando de C-Kit), el CD44 (molécula de adhesión formada por una glucoproteína sulfatada), y el CD25 (cadena α del receptor de interleuquina 2). La mayoría de los precursores tempranos de los linfocitos T no expresan CD4 ni CD8 (timocitos doble negativos). Los timocitos más inmaduros y doble negativos se hallan en el seno subcapsular del timo. Estas células son más grandes que los timocitos maduros y proliferan activamente en este estadio. Desde la región subcapsular, los timocitos migran a través de la corteza en donde tienen lugar la mayoría de los procesos subsecuentes de maduración y donde expresan por primera vez el TCR y maduran hacia linfocitos CD4+ restringidos por la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o hacia linfocitos CD8+ restringidos por la clase I del MHC. Durante la migración los linfocitos establecen contacto físico estrecho con una gran variedad de células no linfoides que expresan dos tipos de moléculas importantes para la maduración de las células T, como son las moléculas del MHC clase I y II. La interacción de los timocitos en proceso de maduración con estas moléculas del MHC dentro el timo es esencial para la selección del repertorio maduro de las células T. Otras moléculas

importantes son las hormonas tímicas: timocinas, timulina y timopoyetina como también las citoquinas secretadas por las células del estroma del timo, las que favorecen la maduración de las células T. (Abbas, 1999; Robey y Cols., 1994; Sebzda y Cols., 1999).

El complejo TCR es un conjunto de proteínas o cadenas polipeptídicas que forman parte integral de la membrana del linfocito T con un doble propósito: reconocer fragmentos de antígenos presentados por las moléculas de histocompatibilidad de otras células y transmitir la señal de ese reconocimiento al linfocito T. (Regueiro, 1997; Boehmer, 1997).

Existen dos formas distintas de TCR – TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ -, las cuales definen el linaje. Las cadenas α y β del TCR juegan un papel crucial no solo en el reconocimiento de antígeno, sino también en la supervivencia, crecimiento y diferenciación de las células T $\alpha\beta$. El TCR $\alpha\beta$ contrario a las inmunoglobulinas, no interactúa con antígenos intactos; requiere procesamiento de las proteínas en péptidos cortos y su asociación con las moléculas polimórficas de clase I o clase II del MHC (Jacobs y Cols., 1997).

De esta forma, el desarrollo temprano del linaje célula T $\alpha\beta$ está controlado por un complejo pre-TCR/CD3 que comprende una unión

covalente del complejo pre-TCR α (pT α)/TCR β que está asociado no covalentemente con componentes CD3. La glicoproteína gp33 (pT α) es posteriormente reemplazada por la cadena TCR α , y el convencional complejo TCR $\alpha\beta$ /CD3 controla las subsecuentes etapas de desarrollo dependientes de MHC (Jacobs y Cols., 1997).

Los genes del TCR de los primeros precursores de la célula T presentan una configuración de línea germinal no funcional que se caracteriza por la separación espacial de los segmentos génicos variable (V), de diversidad (D), de unión (J) y constante (C) en los cromosomas 14 y 7 humanos.

Durante la maduración de las células T en el timo los segmentos génicos del TCR se reordenan en un orden definido dando lugar a la formación de los genes funcionales α y β del TCR, en los que los segmentos V, D, J y C se encuentran muy próximos entre sí. Este proceso de reordenamiento somático es un requisito previo para la expresión de los genes TCR y es importante para la generación de la diversidad. (Abbas, 1999; Kisielow y Cols., 1997).

Una vez que un gen TCR se ha reordenado funcionalmente, no se producen alteraciones genéticas posteriores que conduzcan a cambios de

la afinidad o la función del receptor proteico, es decir, no hay cambios en el isotipo del TCR. (Abbas, 1999).

El desarrollo temprano del linaje de las células $T\alpha\beta$ es controlado por un complejo pre-TCR α (pT α)/CD3 asociado no covalentemente con componentes CD3 (γ , δ , ϵ) y proteínas ζ / η . (Jacobs y Cols., 1997).

Este complejo CD3 desempeña un papel importante en la transducción de señales hacia el interior de las células porque atraviesa la membrana y posee dominios citoplasmáticos largos. El CD3 humano y murino consta de por lo menos cinco cadenas polipeptídicas, designadas con las letras γ , δ , ϵ , ζ y η . Su peso molecular oscila entre 16000 y 25000. Solo los complejos CD3/ TCR ensamblados se transportan a la superficie. Los polipéptidos CD3 forman parte del mecanismo de reconocimiento, y el nivel de expresión del complejo TCR $\alpha\beta$ - CD3 en un timocito va cambiando durante los estadios posteriores de maduración, empezando por niveles bajos que van aumentando tras la selección positiva y la migración hacia la médula. (Kisielow y Cols., 1995; Lee, 1995).

2.2.1. EXPRESIÓN DE CD4 Y CD8

El CD4 y el CD8 son glicoproteínas de la superficie de la célula T y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Sirven como moléculas accesorias que facilitan las interacciones de las células T con las células presentadoras de antígeno (APC) y de las células diana con los linfocitos T citolíticos. Estas moléculas se utilizan como marcadores para caracterizar las diferentes subpoblaciones de timocitos y definir la secuencia de maduración dentro del timo. (Ellmeier y Cols., 1999).

2.2.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CD4

El CD4 es una glucoproteína transmembranosa, de 55 kd compuesta por una sola cadena polipeptídica. Que se ubica en el cromosoma 12 del gen humano. El CD4 está compuesto por cuatro dominios extracelulares similares a los de las inmunoglobulinas, dos de ellos similares a los variables (V) y los otros dos no se parecen a los constantes (c) ni a los V. También tienen una región transmembranosa hidrofóbica y una cola citoplasmática de 38 aminoácidos de longitud. (Paul, 1993). (Figura 1).

La molécula CD4 sirve como molécula de adhesión debido a su afinidad específica por las moléculas de clase II del MHC. Estabiliza la interacción

de una célula T restringida por esta clase del MHC con una APC que transporta un antígeno unido a la clase II del MHC.

El correceptor CD4 se une a través de sus dos dominios N-terminales similares a los de las inmunoglobulinas al dominio $\beta 2$ de la molécula de clase II del MHC. La mayor parte de las células T CD4+ restringidas por la clase II muestran el fenotipo funcional de las células colaboradoras productoras de citoquinas. También la molécula CD4 puede transducir señales o facilitar la transducción de la señal mediada por el complejo TCR al unirse a las moléculas de clase II del MHC. A partir de la estimulación de las células T por el antígeno, más el MHC se produce la fosforilación de los residuos serina de la cola citoplasmática de la molécula de CD4. Este dominio citoplasmático está asociado a una proteína cinasa de la familia Src llamada Lck (o p56 Lck) contribuyendo esta unión en una activación completa de la célula T puesto que está involucrada en el proceso de señalización dependiente del TCR. (Paul, 1993; Yasutomo, 2000).

2.2.1.2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CD8

La molécula CD8 de los linfocitos circulantes humanos consta de un heterodímero unido por un enlace disulfuro de dos glucoproteínas

diferentes de 32 a 34 kd. (CD8 α y CD8 β), o de un homodímero de cadenas CD8 α . Estas dos glucoproteínas son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas con dominios extracelulares terminales similares al dominio variable (V) de las inmunoglobulinas, a péptidos de conexión a regiones transmembranas hidrofóbicas y a colas citoplasmáticas muy básicas de 25 a 27 aminoácidos de longitud. (Paul, 1993). (Figura 1).

Esta molécula tiene funciones de adhesión célula-célula, mediante la unión a los dominios $\alpha 3$ no polimórficos similares a las inmunoglobulinas de las moléculas de clase I del MHC, estabilizando así la interacción de una célula T restringida por la clase I del MHC (habitualmente un LTC) con una célula diana que lleva un antígeno asociado a la clase I del MHC. La forma heterodimérica del CD8 es más eficaz en la realización de sus funciones adhesivas que la forma en homodímero. Otra función de las moléculas CD8 es transducir señales o facilitar la transducción de señales mediadas por el TCR: CD3 tras la unión a moléculas de clase I del MHC, promoviendo por lo tanto las respuestas funcionales posteriores de las células T restringidas por la clase I. Así, el dominio citoplasmático de este correceptor se fosforila tras la unión al ligando del TCR, además su asociación con la proteína cinasa Lck conlleva a la producción de una activación completa de la célula T. (Paul, 1993; Kisielow y Cols., 1995).

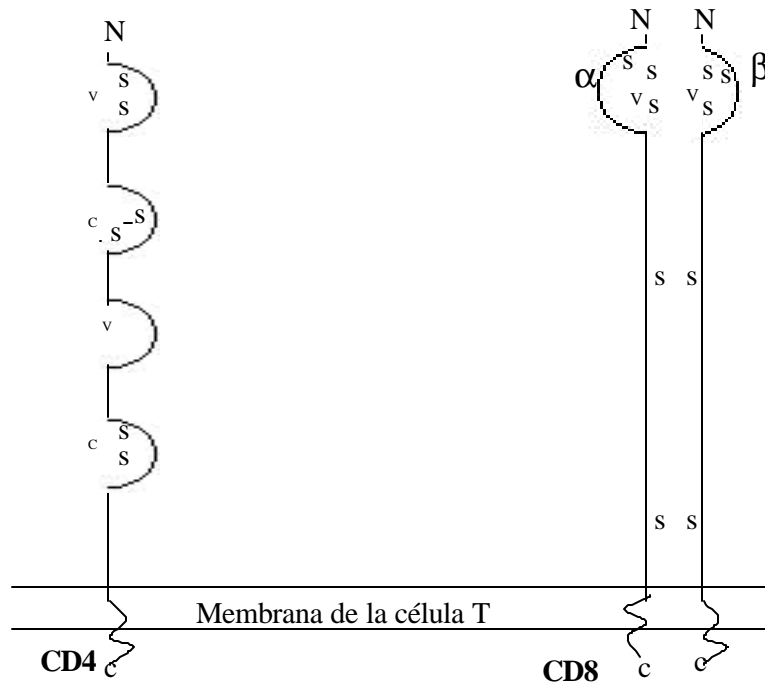


Figura 1. Moléculas CD4 y CD8.

(Paul, 1993)

2.2.2. EVOLUCIÓN DE LOS MARCADORES CD4 Y CD8

Las células T doblemente negativas (CD4⁻ CD8⁻) son un grupo heterogéneo que representa el 5% del total de timocitos en el adulto. La

mayoría de estas células (80%) son timocitos corticales inmaduros que se están dividiendo activamente, y están reordenando activamente sus genes TCR, pero todavía no expresan complejos TCR. El resto de las células doblemente negativas son más maduras y son principalmente timocitos $\gamma\delta$ (no expresarán CD4 o CD8). (Chan, 1993).

La mayoría de los timocitos doblemente negativos maduran finalmente a células T con el TCR $\alpha\beta$, restringidas por el MHC y que pueden expresar CD4 o CD8, pero no ambos a la vez. Durante esta vía de maduración, las células doblemente negativas pasan por un estadio en el que expresan de forma transitoria cantidades muy bajas de CD4 o CD8 solos, para convertirse posteriormente en células doblemente positivas. Estas células CD4+ CD8+ constituyen el 80% del timo en ratones adultos y para que se realice la transición de células doble negativas a células doble positivas es preciso el reordenamiento y la expresión de los genes de la cadena β del TCR y la expresión de los receptores pT $\alpha\beta$. (Williams y Cols., 1997; Sebzda y Cols., 1999).

Las células doble positivas dan lugar a las células T maduras CD4+ y CD8+ (sp) periféricas, que también expresan niveles altos de complejos TCR y los timocitos CD4+CD8- TCR $\alpha\beta$ + representan un 12% de los timocitos adultos; éstas células tienen actividad funcional colaboradora y

migran a la circulación y a los tejidos linfoides periféricos para constituir la subpoblación de células T colaboradoras restringidas por el MHC de clase II. Por otro lado, las células CD4-CD8+ TCR $\alpha\beta$ + representan un 3% de los timocitos en el adulto; éstas migran fuera del timo y se convierten en la periferia en pre- CTL maduros restringidos por el MHC de clase I. (Abbas, 1999; Davis y Cols., 1993).

2.2.3. SELECCIÓN TÍMICA

La selección positiva de las células T es un proceso de desarrollo complejo en el que se generan células CD4+ CD8- y CD4-CD8+ de larga vida y funcionalmente maduras, a partir de precursores de vida corta e inmaduros CD4+ CD8+ (Kisielow y Cols, 1995; Fairchild, 1995).

El proceso se inicia en el timo por interacción de TCR $\alpha\beta$ con moléculas codificadas por el MHC, ocurre fuera de la división celular, involucra el rescate de la muerte celular programada e induce a la diferenciación y maduración de precursores seleccionados. (Kisielow y Cols, 1995).

Este proceso da lugar a linfocitos T maduros que expresan únicamente TCR restringidos por el MHC. Una vez que un timocito expresa un receptor de célula T, éste no puede cambiar su especificidad; así la

selección positiva actúa favoreciendo la supervivencia y expansión selectivas de los timocitos con TCR restringidos por el MHC propio y permitiendo la muerte de aquellos cuyos TCR no están restringidos. (Abbas, 1999; Anderson, 1999). Además se debe a un reconocimiento débil de los complejos péptido-MHC propio presentados por las células epiteliales del timo, y ello ocurre cuando la afinidad de la interacción entre los TCR y los complejos péptido-MHC es baja. Tal reconocimiento débil se determina tanto por la afinidad del TCR por su ligando péptido-MHC como por el número de parejas TCR-péptido-MHC formadas al reconocerse el antígeno. A su vez, la densidad de moléculas correceptoras, CD4 o CD8 en la superficie del timocito puede influir en la intensidad de la señal generada por el TCR e influir en este tipo de selección. (Paul, 1993; Abbas, 1999).

Por otra parte, mientras que las células corticales del epitelio tímico median la selección positiva, la selección negativa en el timo puede ser mediada por varios tipos celulares. (Janeway, 1996). Mediante este proceso, se eliminan clones de células T que reaccionan contra antígenos propios, siendo importante para mantener la tolerancia a las proteínas propias del timo. (Regueiro, 1997).

Dicho proceso es producido por señales externas al timocito en las que intervienen las células presentadoras de antígenos como macrófagos,

células dendríticas de la médula del timo con sus moléculas de histocompatibilidad que presentan péptidos propios.

En sí lo que decide el rescate o muerte de los timocitos es la mayor o menor afinidad del TCR por su ligando, en este caso, debido a la alta afinidad entre los timocitos doblemente positivos y los complejos péptido propio-MHC expresados en las APC tímicas se da la selección negativa. (Baldwin, 1999).

2.3. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una de las técnicas de análisis celular más avanzadas que existen en la actualidad que permite la medición simultánea de múltiples características físicas de una célula, realizándose dicha medición de célula por célula en suspensión, en un promedio aproximado de 500 a 4000 células por segundo. (Becton Dickinson, 1999).

2.3.1. ANTECEDENTES

El desarrollo y evolución de esta técnica se encuentra unido al de los contadores de células. El primer intento para contar células automáticamente fue realizado por Moldovan en 1939 al describir un

instrumento en el que la suspensión de hematíes era contabilizada a su paso por un capilar mediante un sistema fotoeléctrico. En 1941 Kielland patentó un instrumento basado en idénticos principios que los de Moldovan, y después de los primeros pasos los problemas ocasionados por el flujo celular (obstrucciones del capilar debido a su estrecho diámetro) fueron solventados con la aplicación a las células de un flujo laminar envolvente, cuyos principios fueron descritos por Reynolds en 1883. A partir de esta creación Crusland y Taylor en 1953 diseñaron un canal para recuento óptico de las células sanguíneas. Posteriormente, Coulter en 1956 desarrolló sistemas de recuento celular automático basados en gradientes de impedancia magnética y en 1965 introdujo el uso de espectrofotómetro para cuantificar constituyentes específicos celulares en combinación con el procesamiento de los datos mediante ordenadores; luego, en 1968 Dittrich y Gotide desarrollaron el procedimiento de detección basado en la fluorescencia y en 1969 Van Dilla aplica el láser como fuente luminosa en citometría de flujo, momento a partir del que quedaron establecidas las bases de la citometría de flujo moderna. (Viguer,1995).

2.3.1. FUNDAMENTOS

Un citómetro de flujo puede proveer información concerniente al tamaño de la célula (FORWARD SCATTER), granularidad o complejidad interna

(SIDE SCATTER), e intensidad de fluorescencia relativa, dada por FL1, FL2, FL3, FL4 o FL5, dependiendo del fluorocromo que se utilice. Es así como al combinar los parámetros de tamaño y de granularidad es posible observar tres tipos de poblaciones: linfocitos (menor tamaño, menor granularidad), monocitos (mayor tamaño granularidad intermedia) y granulocitos (tamaño intermedio, mayor granularidad). (Goetzman, 1993).

Mediante el forward scatter (FSC ó dispersión frontal) la luz proveniente del láser es difractada en ángulos bajos (entre 2 y 8 grados). La información proporcionada por este parámetro depende del tamaño de la célula, es decir, está relacionado con el área de superficie celular y se detecta a lo largo del eje de luz incidente en dirección frontal. Mediante el Side Scatter (SSC ó dispersión lateral) la luz proveniente del láser es reflejada en ángulos de 90 grados y su valor está relacionado con la complejidad intracelular o granularidad (Becton Dickinson, 1999).

Otra característica de la citometría de flujo es la fluorescencia que es una forma de luminiscencia, es decir, la emisión de luz producida a partir de una fuente de energía no térmica. La intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a los sitios de unión. La fluorescencia primaria o autofluorescencia es la que presenta determinadas sustancias de forma espontánea, sin necesidad de ser modificadas. La fluorescencia secundaria se presenta en células donde mediante tinción histológica con

moléculas fluorescentes denominadas fluorocromos, o uniendo fluorocromos a anticuerpos dirigidos frente a antígenos tisulares se induce fluorescencia. (Viguer, 1995).

Los fluorocromos son sustancias químicas capaces de emitir fluorescencia que tienen la propiedad de absorber fotones de alta energía procedentes de la radiación ultravioleta (láser rojo 635 nm) o del espectro visible (448 nm), lo que produce una redistribución de sus electrones corticales de forma que alguno de ellos pasaría a ocupar una órbita más alejada del núcleo. A dicho desplazamiento se le llama excitación. Como la situación creada es inestable, el electrón tiende a volver a su estado fundamental o primitivo emitiendo la energía absorbida en una o varias etapas intermedias. (Viguer, 1995).

En citometría se usan varios fluorocromos como son: el isotiocianato de fluoresceína (FITC) con una absorción máxima a los 495 nm (color azul) y emisión a 520 nm (color verde), siendo éste uno de los más utilizados en citometría de flujo; también existe la ficoeritrina (PE), que presenta una excitación máxima a los 495 nm (color azul) y una emisión de 576 nm (color naranja).

Existen otros fluorocromos que se unen directamente a estructuras celulares, por ejemplo a ácidos nucleicos, tales como el bromuro de etidio

y el yoduro de propidio, que se unen a ADN y ARN y pueden ser excitados tanto por la luz ultravioleta como por el láser, emitiendo luz roja. También se encuentra el naranja de acridina que se intercala en ácidos nucleicos de doble cadena emitiendo fluorescencia roja y en ácidos nucleicos monocatenarios emitiendo en este caso fluoresceína verde, por lo que se puede utilizar para el estudio diferencial entre ADN y ARN.

A su vez, ciertas sustancias como DiOC5, DiOC6 y rodamina 123 son capaces de emitir fluorescencia dependiendo del potencial de membrana de la célula. (Viguer, 1995; Beckton Dickinson, 1999).

2.3.3. COMPONENTES DE UN CITÓMETRO DE FLUJO

De forma genérica un citómetro de flujo se compone de 3 sistemas instrumentales: componentes fluhídricos, ópticos, e informáticos o electrónicos (Beckton Dickinson, 1999; Viguer, 1995).

El sistema fluhídrico tiene como misión recoger la muestra y a través de una corriente coaxial de solución salina conducirla hasta el canal de flujo para el recuento en forma de elementos alineados, sobre los que incidirá la luz del sistema óptico.

El sistema óptico se compone de láser y lentes que regulan y focalizan el rayo láser en el sitio y tamaño exacto; además la colección óptima de la luz emitida luego de la excitación del láser está dada por lentes, espejos y filtros, los cuales poseen como finalidad dirigir la luz hacia detectores ópticos designados. (Viguer, 1995; Beckton Dickinson, 1999).

Existen diferentes tipos de láser siendo el más utilizado el del ión argón, que emite a una longitud de onda de 488 nm. La luz producida por los láser tiene como características poseer una sola longitud de onda, alta intensidad, ser unidireccional y estar en fase, es decir, las ondas de la luz son homogéneas e intensas. (Becton Dickinson, 1999).

Finalmente, existe el sistema electrónico que consta de diversos amplificadores de señal, un transformador analógico digital para convertir los pulsos electrónicos en información digital, y un ordenador de gran capacidad que almacena y analiza los datos proporcionando estudios estadísticos y una representación gráfica de los mismos.(Viguer, 1995; Beckton Dickinson, 1999).

2.3.4. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La posibilidad de estudiar células de forma individualizada y multiparamétrica hace de la citometría de flujo una herramienta de gran

utilidad en citología, inmunología, hematología, y anatomía patológica, tanto a nivel clínico como para la investigación.

Con el primer caso, el desarrollo progresivo de las técnicas y su simplificación ha traído como consecuencia un auge de la citometría en los últimos años y su incorporación al laboratorio de forma rutinaria. Entre las aplicaciones más frecuentes se encuentran:

- Análisis y separación de subpoblaciones de linfocitos T por anticuerpos fluorescentes monoclonales.
- Separación de varias clases de células linfoides por el tamaño y marcación de anticuerpos.
- Separación de células vivas y muertas.
- Análisis de la cinética del ciclo celular mediante diversas tinciones de DNA.

Las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo consisten en:

- Tipificación del fenotipo de leucocitos en casos de diagnóstico de enfermedades por inmunodeficiencia congénita, evaluación del pronóstico de pacientes positivos HIV, vigilancia de la inmunoterapia o quimioterapia en enfermedades por inmunodeficiencia y vigilancia de la reconstitución inmunitaria en receptores de trasplante de médula ósea.
- Tipificación del fenotipo de células tumorales en casos de diagnóstico y clasificación de leucemias y linfomas, determinación de clonalidad de células que posean Inmunoglobulinas (Ig) provenientes de linfomas y leucemias, diferenciación de tumores o células hematopoyéticas de las no hematopoyéticas y evaluación del pronóstico de los cánceres.
- Análisis del DNA para determinación de aneuploidía y determinación de la cinética del ciclo celular.
- Análisis de la función de neutrófilos, cuenta de reticulocitos, detección de autoanticuerpos en el suero y citogenética entre otros. (Stites, 1994).

2.4. VARIACIONES DE LOS LEUCOCITOS

En la etapa de crecimiento y desarrollo se pueden dar diferentes variaciones fisiológicas, así que entre los 4 y 8 años el recuento diferencial se aproxima al del adulto. A su vez se discute la existencia de

discrepancias significativas en el número de leucocitos debidas al sexo o la edad, y los datos documentan recuentos más altos en las mujeres.

Aunque en el sujeto sano los niveles leucocitarios se mantienen dentro de ciertos límites, se aprecian fluctuaciones diarias y de un día a otro, sin existir un ritmo horario aunque la luz influye en las variaciones diurnas. En condiciones de relajación física y mental completa la cifra basal habitual es de 5 a 7×10^9 células/L. La actividad usual podría asociarse a cierto aumento y el ascenso leve es común por la tarde; pero las condiciones tienden a permanecer en el rango normal. (Lee y Cols, 1994).

Existen condiciones que aumentan los leucocitos sanguíneos tales como:

- Efectos del clima o la estación.
- Calor y sol intenso.
- Incremento artificial de la temperatura.
- Radiación ultravioleta.
- Esfuerzo agotador.
- Convulsiones.
- Epinefrina.
- Inyección intramuscular.
- Dolor, náuseas, vómitos y ansiedad.
- Anestesia por éter.

- Embarazo y trabajo de parto.
- Ovulación.

(Lee y Cols., 1995; Fitzgerald, 1998; Khansari y Cols., 1990).

Por otra parte, las siguientes condiciones disminuyen los leucocitos sanguíneos:

- Frío.
- Lugar de gran altitud.
- Narcosis con barbitúricos.
- Stress.

(Khansari y Cols., 1990; Lee y Cols., 1995).

La leucocitosis es el aumento total de leucocitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{l}$. En algunas patologías los recuentos alcanzan cifras mas allá de 15 a $25 \times 10^3/\mu\text{l}$, y en ocasiones se elevan a $100 \times 10^3/\mu\text{l}$. En general este proceso se debe a la elevación de los neutrófilos y menos a menudo resulta, de ascenso de los linfocitos siendo la leucocitosis por eosinofilia, monocitosis y basofilia inusual.

La leucopenia es la disminución del número total de leucocitos a menos de $3.5 \times 10^3/\mu\text{l}$. Casi siempre se reducen los neutrófilos, pero en la

leucopenia grave también se afectan los linfocitos y otras líneas celulares. (Williams, 1990).

Las concentraciones de varios tipos de leucocitos puede modificarse de manera simultánea y en la misma dirección o en dirección opuesta, por eso se ve en muchas infecciones agudas que los neutrófilos se incrementan y los linfocitos y eosinófilos declinan. Pueden producirse cambios significativos de eosinófilos, basófilos y monocitos sin variación del recuento total. Por estas razones y porque ahora se sabe que cada sistema celular posee funciones y mecanismos propios, es preferible determinar el número absoluto de cada una de las células, siendo posible identificar así las variaciones de cada una de las líneas celulares. (Lee y Cols., 1995).

2.4.1. VARIACIONES DE LOS LINFOCITOS

Entre las causas de linfocitosis se tienen: infecciones agudas: coqueluche, linfocitosis infecciosa aguda, mononucleosis infecciosa, hepatitis; ciertas infecciones crónicas: brucelosis, tuberculosis, sífilis secundaria y congénita; alteraciones hematopoyéticas como leucemia linfoblástica aguda y linfocítica crónica, algunos linfomas enfermedades por cadenas pesadas, leucemia de células vellosas, linfocitosis relativa; en exantemas después del estadio inicial, en particular parotiditis y

rubéola, estas de convalecencia de infecciones agudas, tirotoxicosis, cuadros asociados a neutropenia. (Williams, 1996; Lee y Cols, 1995; Bello, 1983).

La linfocitopenia se presenta en casos de: condiciones hereditarias: enfermedad por inmunodeficiencia congénita (inmunodeficiencia combinada subaguda), aplasia de células precursoras linfopoyéticas (deficiencia de adenosina deaminasa, ausencia de antígenos de histocompatibilidad, ausencia de linfocitos auxiliares CD4+, alinfoplasia tímica con aleucocitosis, ataxia-telangectasia, Síndrome de Wiskott-Aldrich, Inmunodeficiencia con enanismo acondroplásico, Inmunodeficiencia con timoma, inmunodeficiencia celular con inmunoglobulinas, deficiencia de la fosforilaza de nucleósido de purina, Inmunodeficiencia con enfermedad venooclusiva del hígado. Causas adquiridas como: Anemia aplásica, enfermedades infecciosas, entre estas, enfermedades virales (SIDA, hepatitis, influenza); enfermedades bacterianas (Tuberculosis, fiebre tifoidea, neumonitis, sepsis); yatrógenas (agentes inmunosupresores, administración de globulina antilinfocítica, - glucocorticoides, PUVA en altas dosis como tratamiento, quimioterapia antineoplásica, métodos de aféresis plaquetaria, radiación, cirugía, drenaje del conductotorácico-; enfermedad sistémica que acompaña a enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide, LES, miastenia graves), enfermedad de Hodgkin, enteropatía con pérdida proteínica,

insuficiencia renal, sarcoidosis, lesión térmica; nutricional / de la dieta (abuso de etanol, deficiencia de cinc); idiopática (linfocitopenia T idiopática CD4+. (Williams, 1996). (Un resumen de variaciones de linfocitos CD4 y CD8 se encuentra en la Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones que alteran los linfocitos T

CONDICION	LINFOCITO ALTERADO	VARIACION
VIDA DIARIA		
Edad	CD4+	D
Género : Femenino	CD4+	A
Embarazo	CD4+	D
Práctica Sexual	CD8+	A
Fumar	CD4+	A
Deportes	CD8+	A
Stress Agudo	CD8+	A
Stress Crónico	CD8+	D
DROGAS Y HORMONAS		
Cimetidina	CD4+CD8+	A
Ciclosporina A	CD8+	A
Endotoxina	CD4+	D
Epinefrina	CD8+	A
Factor VIII / IX concentrado	CD8+	A
Glucocorticosteroides	CD4+	D
PROCEDIMIENTOS MEDICOS		
Anestesia y Cirugía	CD4+	D
ENFERMEDADES		
PIEL :		
Candidiasis	CD4+	D
Kala Azar	CD4+	D
SISTEMA NERVIOSO :		
Síndrome de Down	CD4+	A
Esclerosis Múltiple	CD4+	D
SISTEMA RESPIRATORIO :		
Neumonía	CD4+	D
Sarcoidosis Pulmonar	CD8+	A
SISTEMA DIGESTIVO :		
Enfermedad Celíaca	CD4+	D
Enfermedad de Crohn	CD8+	D
SISTEMA URINARIO :		
Pilonefritis	CD4+	D
SISTEMA INMUNE :		
SIDA	CD4+	D
SISTEMA ENDOCRINO :		
Tiroiditis de Graves	CD8+	A
Tiroiditis de Hashimoto	CD4+	A
SISTEMA HEMATOPOYETICO :		
Púrpura Trombocitopénica idiopática	CD4+	D
TEJIDO CONECTIVO :		
Lupus eritematoso sistémico	CD4+	D

D → Disminuye A → Aumenta

(Westerman, 1999).

2.4.2. LINFOCITOPENIA DE CÉLULA T CD4+

Generalmente este tipo de alteración linfocitaria se presenta en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El virus ingresa a las células humanas utilizando el CD4 como receptor principal. La infección altera los linfocitos de tal forma que se produce disminución de sus niveles en circulación y se reduce su vida media al orden de 2 días. (Moore, 1997; Wolthers y Cols, 1998).

El espectro clínico de la infección por VIH comienza aproximadamente 2 a 4 semanas siguientes a la infección primaria con el virus experimentando una cierta proporción de individuos un síndrome agudo y limitado caracterizado entre otros por una declinación en los niveles de células T CD4+, descendiendo también los niveles de células T CD3, CD8+ y células B. Sin embargo los niveles de células T CD3+ y CD8+ ascienden a niveles normales entre las 3 y 4 semanas siguientes al comienzo de la enfermedad para posteriormente los linfocitos T CD8+ elevarse hasta tal punto de superar los niveles de linfocitos T CD4+, ello durante fases tardías del síndrome agudo siguiendo la resolución del síndrome.

El tiempo medio entre la infección primaria HIV y el desarrollo de la enfermedad SIDA es de aproximadamente 11 años. La infección del VIH da lugar finalmente a un deterioro de la función de los sistemas inmunitarios

específico y natural siendo una característica particular de la progresión de la enfermedad inducida por el VIH, la reducción del número de células T CD4+ en sangre periférica, desde un recuento normal de unos 1000/ml a menos de 100/ml. en el SIDA plenamente desarrollado. Debido a que las células T cooperadores son esenciales para las respuestas inmunitarias celulares y humorales frente a varios microorganismos, la pérdida de estos linfocitos es la razón principal por la que los pacientes con SIDA se hacen susceptibles a muchas infecciones siendo alto el riesgo de contraer enfermedades oportunistas. (Paul, 1993; Abbas,1999).

La medición por recuentos de linfocitos T CD4+ en pacientes con infección VIH se han considerado importante para el pronóstico y para tomar decisiones clínicas terapéuticas. En la historia natural de la enfermedad se aceptan 3 puntos de corte, que son clínicamente relevantes: a. Por debajo de 500 células por microlitro es indicación para iniciar tratamiento con zidovudina. b. Por debajo de 200 células por microlitro aumenta el riesgo de tener neumonía por pneumocistis carinii y, por tanto se recomienda iniciar profilaxis primaria con trimetoprim sulfametoxazol, y c. Cuentas menores de 100 células por microlitro se encuentran en personas con infección por micobacterium avium intracellulare, por lo que también se ha recomendado profilaxis contra este patógeno. Además, a partir de 1993 la definición de caso de SIDA utilizada por los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, incluye a personas infectadas

con VIH con cuentas de células CD4 inferiores a 200 por microlitro, (Guarner y Cols, 1996).

A partir de 1992 en los países desarrollados se han establecido una serie de lineamientos para la realización correcta del conteo de células CD4 proponiéndose el uso de anticuerpos monoclonales en citometría de flujo. (Guarner y Cols, 1996). Las correctas y confiables mediciones de linfocitos T CD4+ son esenciales para el estudio o valoración del sistema inmune en personas infectadas con el VIH, y el servicio de salud pública ha recomendado que los niveles de linfocitos T CD4+ sean monitoreados cada 3 a 6 meses en las personas infectadas con dicho virus.

Muchos laboratorios miden los niveles de células TCD4+ en sangre completa mediante 3 técnicas de laboratorio: conteo de glóbulos blancos, porcentaje de glóbulos blancos que son linfocitos (diferencial), y el porcentaje de linfocitos que son células T CD4+, procesos que en conjunto reciben el nombre de inmunofenotipificación por citometría de flujo. Es así como el CDC ha creado unas guías para llevar a cabo la determinación de células T CD4+ en personas infectadas con el VIH ello con el fin de proveer a todos los laboratorios que procesan estas muestras la más completa información acerca de esta medición de linfocitos T CD4+ usando citometría de flujo. (MMWR 46 (RR-2); 1-29). A su vez, diversos grupos de investigación han obtenido unos valores de referencia para el monitoreo de células CD4+ en

pacientes con infección VIH, y es así como en Colombia, se han establecido por la técnica de citometría de flujo unos valores de referencia de acuerdo a diferentes grupos de edad (Avila y Cols., 1996).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en la Pontificia Universidad Javeriana en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular se trabaja en Citometría de Flujo y uno de los servicios que éste presta a la comunidad es la tipificación de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+. En el momento no se cuenta con Valores de Referencia propios que representen las cifras normales de estas células en individuos sanos en Bogotá utilizando las facilidades de citometría de flujo de 4 colores que ofrece la Pontificia Universidad Javeriana.

Este trabajo pretende establecer valores normales de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ en 60 individuos sanos entre 18 y 45 años de edad en Bogotá. La obtención de tales cifras empleando tecnología de avanzada se constituye en un pilar de inicio a partir del cual se pueden tomar en consideración fluctuaciones potenciales en las mismas, con relación a un determinado proceso o evento fisiopatológico. El establecer niveles normales en el recuento linfocitario proporciona información valiosa para la detección, clasificación, comprensión, evolución y estudio de una patología específica, así como la respuesta a medicamentos o una terapia aplicada, (Centers for Disease Control, 1997).

La aplicación de los resultados obtenidos cobraría una apreciable y particular importancia dado las pruebas de laboratorio que al respecto se encuentran realizando a diario, suministrando información de alta calidad y confiabilidad para una adecuada correlación clínica con el beneficio consecuente de la comunidad que a la institución acude y respondiendo así con suficiente convicción al por qué de la ejecución de esta investigación.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer los valores de los Linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ en una población de individuos sanos en Bogotá por citometría de flujo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Escoger la muestra de la población de donantes del Banco de Sangre del HUSI basándose en los criterios de selección estipulados para el presente estudio.
- Realizar recuento diferencial de leucocitos por los métodos de coloración de Wright, citometría de flujo según tamaño y granularidad y por citometría de flujo según marcadores de superficie celular CD, así como determinar cuál es el óptimo entre estos.
- Determinar frecuencias absolutas y relativas de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ por citometría de flujo.

- Definir la presencia y exclusión de valores aberrantes por medio del método estadístico de Dixon, aplicar medidas estadísticas (media, desviación estándar, percentiles) a las subpoblaciones de linfocitos T obtenidas y realizar distribución por sexo.

- Analizar los resultados obtenidos y la aplicación de las medidas estadísticas a éstos, para con base en ellos definir los valores de referencia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDIO

En este trabajo se realizó un estudio de tipo descriptivo, poblacional, de corte transversal.

5.2. MUESTRA

De un total de 78 donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) se descartaron 18 por no cumplir con los criterios de selección del estudio, quedando en total 60 muestras de trabajo. A su vez el número limitado de donantes se escogió debido a la limitada cantidad de reactivo con la que se contaba para realizar el estudio.

5.2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

A partir de la bolsa de sangre extraída de cada donante del Banco de sangre previamente homogeneizada con el anticoagulante CPDA, se cortó un piloto

con aproximadamente 500 μ l. de la muestra que se rotuló con el número de la bolsa, el número consecutivo del estudio y la fecha.

En el laboratorio se trabajó dentro de la cabina de flujo laminar tomando una lanceta por muestra para cortar por ambos extremos cada piloto y así poder evacuar el contenido de los pilotos (sangre total) en viales previamente marcados.

5.2.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Los individuos que hicieron parte del estudio fueron seleccionados a partir de parámetros establecidos por el Banco de Sangre de HUSI (encuesta) según los siguientes criterios:

- Edad entre 18 y 45 años.
- Adecuada relación peso/talla, hemoglobina y hematocrito normal, así como presión arterial, pulso y temperatura corporal.
- Encontrarse en buen estado de salud.
- No haber sido declarado alguna vez no apto para donar sangre.
- No haber tenido fiebre en los 8 días anteriores a la donación.
- No haber sufrido en los últimos 6 meses algún accidente, intervención quirúrgica o haber estado hospitalizado.

- No tener ni haber tenido hepatitis.
- No inyectarse drogas alucinógenas y / o estimulantes.
- No haber recibido transfusiones de sangre o sus componentes en los últimos 6 meses.
- No haber tenido malaria.
- No haber tenido convulsiones, ataques epilépticos, desmayos y / o mareos frecuentes.
- No perder peso sin razón alguna.
- No tener ni estar en contacto en las 3 últimas semanas con personas que padezcan alguna enfermedad contagiosa.
- No haber sufrido alguna enfermedad grave.
- No haber tenido extracción de dientes o cirugía en la encía en los últimos 3 días.
- No tener enfermedades venéreas.
- En el caso de las mujeres, no estar en embarazo ni haber tenido hijos en los últimos 6 meses o estar en período de lactancia.
- Presentar resultados negativos en las pruebas para detectar HIV, hepatitis B, hepatitis C, sífilis y chagas.

5.3. EQUIPOS

Para el desarrollo de los diferentes procedimientos llevados a cabo en este estudio se utilizaron los siguientes equipos:

- Cámara de Neubauer de luz blanca, marca Boeco.
- Microscopio de luz, marca Olympus CH-BI45-2, con objetivos de 10X, 40X y 100X.
- Citómetro de flujo FACS Calibur, marca Becton Dickinson, USA.
- Cabina de flujo laminar, marca Jouan, Francia.
- Centrífuga, marca Jouan MR22, Francia.
- Nevera de refrigeración de 4°C, marca supernórdico.
- Vortex, marca thermolyne (Maxi Mix II).

5.4. MÉTODOS

5.4.1. RECUENTO TOTAL DE LEUCOCITOS

En un tubo de ensayo se hizo dilución 1:20 de la sangre agregando 380 μ l. de líquido de Turk y 20 μ l. de sangre completa anticoagulada. Se mezcló y se montó la cámara de Neubauer, para hacer conteo de leucocitos en los cuatro cuadrantes de los extremos de ésta y utilizando para su cálculo la fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{N}^{\circ} \text{ cuadrantes contados} \times \text{Vol. cámara}} = \text{N}^{\circ} \text{ leucocitos} / \mu\text{l.}$$

A partir de este conteo de leucocitos se seleccionaron para el estudio las muestras cuyos valores fueran iguales o superiores a 5.000 leucocitos / μl , e inferiores a 15.000 leucocitos / μl .

5.4.2. RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO MANUAL

Se estandarizó la tinción con colorante de Wright (Disproquillab, Ltda.), utilizando diferentes tiempos del colorante sobre el frotis, y diferentes tiempos de agua destilada, con el objetivo de obtener una buena tinción y morfología de cada población celular. Se escogió como tiempos para colorear las muestras 2 minutos y 30 segundos para el colorante y 3 minutos para el agua destilada y desionizada.

Una vez estandarizada la tinción para cada muestra se tomó una gota de sangre completa anticoagulada y se hizo un extendido de ésta sobre una lámina portaobjetos previamente marcada. Luego de haberse secado el extendido se procedió a colorearlo cubriendo la lámina con colorante de

Wright durante 2 minutos y 30 segundos y adicionando posteriormente agua destilada y desionizada durante 3 minutos, intervalo de tiempo en el que se observó un brillo metálico. Finalmente se lavó cada lámina con agua destilada y desionizada y se dejó secar completamente.

A las láminas coloreadas se les realizó un recuento diferencial empleando objetivo de 100 X y contando hasta 100 células para obtener de esta forma un porcentaje de cada tipo celular de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos). Posteriormente un evaluador seleccionó láminas al azar para realizar un control de este recuento.

El sistema manual de conteo absoluto y diferencial de glóbulos blancos fue seleccionado debido a la facilidad para llevarse a cabo y al bajo costo que representa en comparación con el método automatizado; a su vez por características como el tamaño y la granularidad y por marcadores CD, el recuento diferencial se realizó también por citometría de flujo.

5.4.3. MARCACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se realizó marcación celular mediante anticuerpos monoclonales a cada una de las muestras.

Se utilizaron por cada muestra dos tubos para citometría de flujo marcados con el número del donante y la fecha, además el número 1 como CD14 / CD45, y el número 2 como Tritest (CD3 / CD4 / CD8).

Al tubo N° 1 se le adicionó 1 µl. de anticuerpo monoclonal anti- CD14 marcado con el fluorocromo ficoeritrina (PE) (Becton Dickinson) y 2 µl. del anticuerpo monoclonal anti- CD45 marcado con PerCP (Becton Dickinson).

Al tubo N° 2 se le adicionó 5 µl. del reactivo TriTEST (CD4 FITC / CD8 PE / CD3 PerCP) (Becton Dickinson). Se agregó en ambos tubos 50 µl. de la muestra, se agitó suavemente para que sangre y anticuerpos se mezclaran completamente y se llevaron a incubar a 4 °C en oscuridad durante 30 minutos.

Posterior a la incubación se agregó a cada tubo 1 ml. de solución de lisis 1X previamente preparada (900 µl. de agua filtrada y 100 µl. de FACS LYSING SOLUTION, 10X, Becton Dickinson), se agitaron y se llevaron a incubar durante 10 minutos exactos en oscuridad a 4 °C.

Luego de estos 10 minutos de incubación se interrumpió el proceso de lisis agregando en cada tubo 1.5 ml. de la solución PBS 1X - azida de sodio al 0.1 %, y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 r.p.m. constituyendo ello un

primer lavado. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y se realizó un segundo lavado agregando a cada tubo 2 ml. de la solución anterior y bajo las mismas condiciones de centrifugación.

Finalmente se resuspendió el botón de células de cada tubo y se agregó a cada uno solución fijadora PBS 1X - Paraformaldehído 0.5 %.

Se guardaron los tubos correspondientes a cada muestra procesada a 4°C en oscuridad para realizar el proceso de adquisición en el citómetro de flujo 24 horas después.

En algunas ocasiones se utilizó un tubo número 3 para realizar control de isotipo. En éste se agregó 1 µl de anticuerpo anti mouse Ig G1-PE y 1 µl de anticuerpo anti mouse Ig G1 FITC; realizando en él el mismo procedimiento efectuado con los dos tubos anteriores.

5.4.4. CONTEO DE LEUCOCITOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO SEGÚN TAMAÑO Y GRANULARIDAD, Y LOS MARCADORES CD14 vs. CD45.

Las muestras procesadas se retiraban de la nevera y se adquirían en el citómetro de flujo, usando el programa Cell Quest.

Se creó un archivo para cada muestra, con la identificación correspondiente, y luego se procedió a hacer la adquisición del tubo N° 1 que contenía la muestra con los anticuerpos anti- CD14 PE y anti- CD45 PerCP, se seleccionó la región de linfocitos usando una gráfica de puntos con FSC y SSC para obtener el % de estas células según tamaño y granularidad respectivamente. (Figura 2). En otra gráfica se demarcó una región para identificar la distribución de las subpoblaciones de linfocitos de interés de acuerdo al grado de expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD45, (FL2 vs. FL3) para posteriormente realizar análisis de porcentajes. (Figura 3).

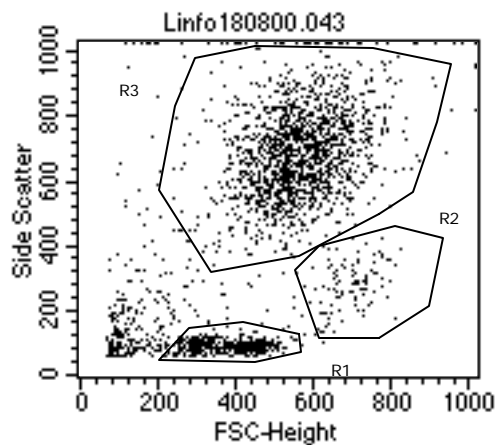


Figura 2. Leucocitos según Tamaño (FSC) vs. Granularidad (SSC).

R1 corresponde a linfocitos.

R2 corresponde a monocitos.

R3 corresponde a granulocitos.

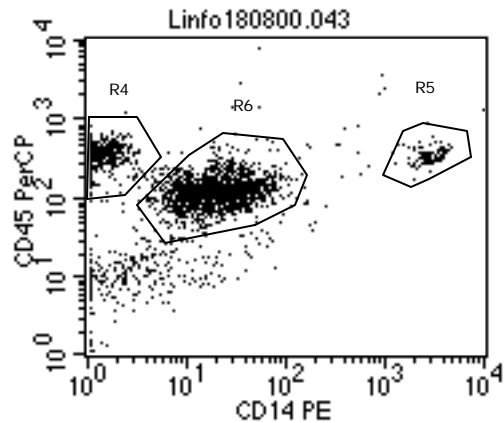


Figura 3. Leucocitos según marcadores CD14 vs. CD45.

R4 corresponde a linfocitos CD45 altos, CD14 negativos.

R5 corresponde a monocitos CD45 altos, CD14 altos.

R6 corresponde a granulocitos CD45 alto, CD14 bajos.

A partir del tubo N° 3 se realizó una gráfica de Ig G1 anti-ratón.PE vs. Ig G1 anti-ratón.FITC. Estos son anticuerpos que no se unen a ninguna superficie de las células dando por lo tanto resultados negativos utilizándose como control negativo para el estudio. (Figura 4).

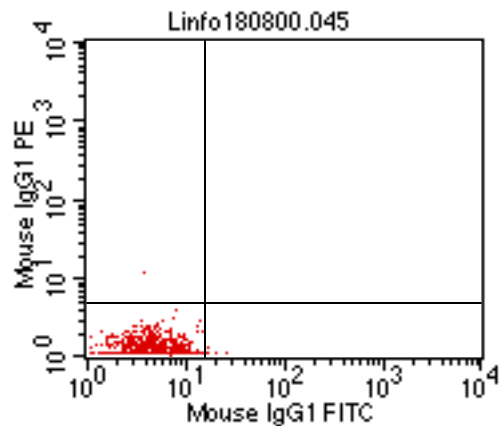


Figura 4. Control Negativo.

Gráfica de puntos que muestra el control de isotipos. Cerca del 100% de la población se localizó en el cuadrante inferior izquierdo.

5.4.5. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA OBTENER SUBPOBLACIONES CD3, CD4 Y CD8.

Para obtener las subpoblaciones CD3, CD4 y CD8 se hizo lectura del tubo N° 2 seleccionando la región de los linfocitos. Se realizaron 2 gráficas de puntos una con fotomultiplicador para PerCP (FL3), obteniéndose de ésta la región CD3+ de la población total reconocida como R7, (Figura 5), realizando con base en ella la segunda gráfica con los fotomultiplicadores para fluoresceína (FL1) y para ficoeritrina (FL2), mostrando finalmente las poblaciones CD3+ / CD4+ y CD3+ / CD8+. (Figura 6).

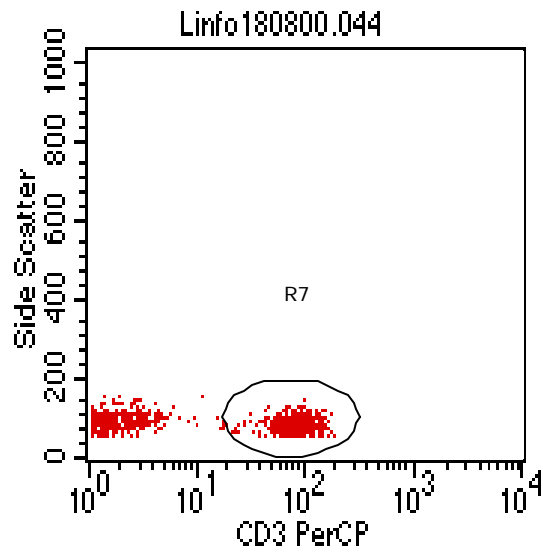


Figura 5. Linfocitos T CD3+.

Gráfica de puntos que muestra la granularidad FL3 donde se seleccionan las células que fluorescen con el anticuerpo CD3 PerCP.

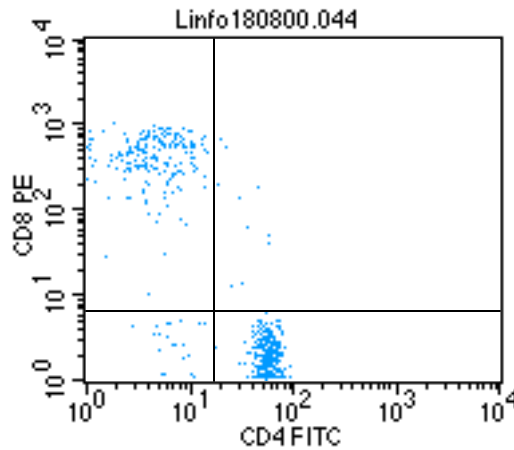


Figura 6. Linfocitos T CD4+ y CD8+.

Gráfica de puntos FL1 vs. FL2 que muestra en 4 cuadrantes la distribución de las células CD3 marcadas con CD4- FITC (cuadrante inferior derecho) y CD8- PE (cuadrante superior izquierdo).

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la presencia de valores aberrantes y su posible exclusión en los resultados obtenidos de leucocitos totales y linfocitos expresados tanto en porcentaje como en microlitro (μ l). se aplicó a éstos la fórmula del rango estadístico de Dixon. (NIÑO, 1993).

Se estudió la existencia o no de correlación lineal entre los diferentes tipos de recuento diferencial de leucocitos [(por tamaño y granularidad, manual y por marcadores CD (CD14 y CD45)] mediante el hallazgo del coeficiente de correlación y los límites de confiabilidad al 95 %.

Se realizó la prueba estadística de Kruskal- Wallis con el fin de comparar las variables edad y género y la prueba T- student a dos colas para datos no pareados a los valores de leucocitos, linfocitos y sus subpoblaciones, con el fin de observar si existían diferencias significativas entre las diferentes cifras obtenidas para cada sexo.

Los resultados obtenidos se expresaron en frecuencias absolutas (μ l) y frecuencias relativas (%), y se interpretaron a través de medidas de tendencia central como la media y medidas de dispersión como desviación estándar (DS) y percentiles 5 y 95; cálculos estadísticos obtenidos a partir del empleo de bases de datos en Excel 7.0 y el programa EpiInfo 6.04 (CDC, Atlanta, U. S. A., 1997).

6. RESULTADOS

De una muestra de 78 individuos, 18 no fueron incluidos por ser de edades diferentes al objeto del estudio o por presentar conteo bajo de leucocitos, seleccionándose entonces 60, que presentaron las condiciones exigidas. Se encontró que 25 (41.7%) fueron de sexo femenino y 35 (58.3%) de sexo masculino, con un promedio de edad de 29.8 años para las mujeres (+/- 9.4) y de 28.4 años para los hombres (+/- 6.6).

Cuando se compararon las variables edad y género mediante la prueba estadística de Kruskal- Wallis, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la población.

A partir de los resultados del recuento de leucocitos totales en la población estudiada, se obtuvo un promedio de 7,367.5 / μl , (+/-1,742.1) presentando las mujeres un promedio de 7,020 / μl (+/-1,691.1); y los hombres 7,587.1 / μl (+/-1,791.8). Al comparar los promedios de leucocitos totales de los individuos de sexo masculino y los de sexo femenino se observaron valores más altos (7,587.1 / μl) en los hombres que en las mujeres (7,020 / μl), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.22$).

Con el objetivo de saber si existía o no asociación lineal entre los diferentes tipos de recuento diferencial de leucocitos, se halló el coeficiente de correlación (r^2) entre éstos. Al asociar el porcentaje de linfocitos obtenido por marcadores CD y el porcentaje de linfocitos obtenido manualmente, se obtuvo un r^2 de 0.27 con intervalo de confianza (CI) del 95 % entre 0.02 y 0.49, y entre estos dos tipos de recuento expresados en microlitros (μl) fue 0.43 con CI (95% 0.20; 0.62). Al hallar el r^2 entre el porcentaje de linfocitos obtenido por marcadores CD y el porcentaje de linfocitos por tamaño y granularidad, se obtuvo una correlación de 0.91 con CI (95% 0.85; 0.94) y entre estos dos tipos de recuento en μl . fue 0.95 con CI (95% 0.91; 0.97). El r^2 entre el porcentaje de linfocitos obtenido por tamaño y granularidad y el porcentaje de linfocitos obtenido manualmente fue de 0.28, con CI (95% 0.03; 0.50); y entre estos dos tipos de recuento en μl fue de 0.44 con CI (95% 0.21; 0.62). A partir de estos coeficientes de correlación se tiene que sí existe asociación lineal entre los 3 tipos de recuento diferencial de leucocitos, pero que ésta es mayor entre los linfocitos hallados a través de marcaje con CD y los linfocitos determinados por tamaño y granularidad según indica el coeficiente de correlación 0.91 al expresarlos en porcentaje, y 0.95 al expresarlos en μl . Al realizar la gráfica de dispersión de los datos, la forma de ésta tiende a ser lineal, y el hecho que este valor se acerque a 1 expresa que los dos tipos de conteo son directamente proporcionales y por lo tanto un

91 o 95 % de variación en los valores de linfocitos obtenidos por tamaño y granularidad puede explicarse si se conocen los valores de linfocitos a partir de marcadores CD.

Una vez escogido el método de recuento diferencial para poder continuar con el análisis de los resultados fue necesario saber si existían o no valores aberrantes o extremos que pudiesen interferir en los cálculos posteriores; para ello se aplicó la fórmula del rango estadístico de Dixon a los datos de leucocitos totales en porcentaje, de leucocitos totales expresados en $\mu\text{l.}$, y a los datos de linfocitos en porcentaje y en $\mu\text{l.}$ obtenidos con los marcadores de superficie celular CD; encontrándose que ningún dato debía ser recalculado o excluido puesto que la diferencia entre los dos valores más pequeños o los más grandes no es mayor que un tercio de la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de cada uno de los resultados.

Basándose en los valores de linfocitos totales se tiene que el promedio de estos expresado en porcentaje mediante el recuento diferencial por marcadores CD (CD14 y CD45) fue de 28.4 (+/- 6.8), y el expresado en $\mu\text{l.}$ presentó una media de 2,082 (+/- 670.6). Al distribuir por sexos estos valores, se obtuvo que el promedio de los linfocitos totales expresados en porcentaje en los individuos de sexo masculino fue 29.7 (+/- 7.7), y en individuos de sexo femenino fue 26.2 (+/- 5.1), siendo el promedio de los

valores expresados en μl . 2,216 para el sexo masculino (+/- 688.3), y 1,856.2 para el sexo femenino (+/- 633.9). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ya que en los valores expresados en % se obtuvo una $p = 0.09$, y en μl . $p = 0.08$.

Con los valores de linfocitos CD3+ expresados en porcentaje se obtuvo una media de 64.9, (+/- 9.0); y éstos expresados en μl presentaron una media de 1,358.8 (+/- 506.3). Si estas medidas de tendencia central y de dispersión se obtienen según el género de los individuos, los de sexo masculino presentaron una media de 64.4 (+/- 9.5) y 1,440.4 (+/- 529.5) para los datos expresados en porcentaje y en μl respectivamente, y los de sexo femenino presentaron medias de los datos dados en porcentaje y en μl de 65.9 (+/- 8.1) y 1,229.3 (+/- 476.4) respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, ya que se obtuvo para los datos expresados en porcentaje, un valor $p = 0.5$ y para los expresados en μl . un valor $p = 0.11$.

Con base en los valores de linfocitos CD3+ se hallaron los de los linfocitos CD4+. Estos expresados en porcentaje presentaron una media de 52.5, (+/- 9.7); y expresados en μl presentaron una media de 702.0 (+/- 262.3). Según el género de los individuos, los de sexo masculino presentaron una media de 49.7 (+/-10.3) y 709 (+/- 289.5) para los datos expresados en porcentaje y en μl respectivamente, y los de sexo femenino presentaron medias de los datos

dados en porcentaje y en μl de 55.3 (+/- 8.2) y 676.1 (+/- 246.1) respectivamente. Las diferencias de los valores expresados en porcentaje entre los dos sexos fue estadísticamente significativa $p = 0.027$, y en los valores expresados en μl . $p = 0.64$ no lo fue.

El promedio de linfocitos CD8+ expresado en valores relativos fue de 40.1 (+/- 9.3); y en valores absolutos éstos presentaron una media de 555.6 (+/- 265.6). Según el género de los individuos, los de sexo masculino presentaron una media de 43.1(+/- 9.8) y 627.3 (+/- 280.5) para los datos expresados en porcentaje y en μl . Respectivamente, mientras que los de sexo femenino presentaron promedios en porcentaje y en μl de 35.8 (+/- 6.8) y 449.9 (+/- 216.1) respectivamente. Estas diferencias de valores entre ambos sexos si fueron estadísticamente significativas pues para los valores expresados en porcentaje se obtuvo un valor de $p = 0.002$, y para los valores expresados en μl . $p = 0.010$. (Ver tabla 2).

Tabla 2. VALORES DE LEUCOCITOS, LINFOCITOS TOTALES, LINFOCITOS CD3+, CD4+ Y CD8+

TIPO DE CÉLULAS	HOMBRES				MUJERES				TOTAL			
	%		ml		%		ml		%		ml	
	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
Leucocitos Totales			7,587.1	1,791.8			7,020.0	1,691.1			7,367.5	1,742.1
Linfocitos Totales	29.7	7.7	2,216.0	688.3	26.2	5.1	1,856.2	633.9	28.4	6.8	2,082.0	670.6
Linfocitos CD3+	64.4	9.5	1,440.4	529.5	65.9	8.1	1,229.3	476.4	64.9	9.0	1,358.8	506.3
Linfocitos CD4+	49.7	10.3	709.0	289.5	55.3	8.2	676.1	246.1	52.5	9.7	702.0	262.3
Linfocitos CD8+	43.1	9.8	627.3	280.5	35.8	6.8	449.9	216.1	40.1	9.3	555.6	265.6

DS: Desviación Estándar.

μl : Microlitro.

X : Media.

El proceso final de análisis de resultados consistió en calcular los percentiles 5 y 95 para cada grupo de valores. Para linfocitos CD3+ expresados en porcentaje los percentiles 5 y 95 son 50.1 y 79.4 respectivamente. Estos linfocitos expresados en valores absolutos presentaron en el percentil 5 un valor correspondiente a 743.7 y en el percentil 95 un valor de 2,259.8. Al distribuir esta población celular por género se obtuvo para el sexo masculino percentil 5 de 49.8 para datos expresados en porcentaje, y 828.8 para datos expresados en μl ., siendo el percentil 95 de los datos expresados en valores relativos (%) 77.3 y en valores absolutos (μl) 2,308.8. Y para el sexo femenino, percentil 5 de 54.1 para datos expresados en porcentaje y 629.1 para datos expresados en μl ., siendo el percentil 95 de los datos expresados en valores relativos (%) 79.0 y en valores absolutos (μl) 1,992.4.

En los linfocitos CD4+ expresados en porcentaje los percentiles 5 y 95 corresponden a los valores 34.8 y 65.2 respectivamente y al expresarlos en μl los percentiles 5 y 95 corresponden a los valores de 349.3 y 1,256.3 respectivamente. Al separar esta población celular por género se obtuvo para el sexo masculino percentil 5 de 33.0 para datos expresados en porcentaje, y 348.7 para datos expresados en μl ., siendo el percentil 95 de los datos expresados en valores relativos (%) 63.2 y en valores absolutos (μl) 1,221.6. Se obtuvo para el sexo femenino, percentil 5 de 38.8 para datos expresados en porcentaje, y 361.3 para

datos expresados en $\mu\text{l.}$, siendo el percentil 95 de los datos expresados en valores relativos (%) 65.2 y en valores absolutos (μl) 1,174.

En los linfocitos CD8+ expresados en porcentaje los percentiles 5 y 95 corresponden a los valores 27.3 y 56.5 respectivamente y al expresarlos en $\mu\text{l.}$ 2,25.7 y 1,011.2 respectivamente. Al separar esta población celular por género se obtuvo para el sexo masculino percentil 5 de 30.1 para datos expresados en porcentaje, y 279.8 para datos expresados en $\mu\text{l.}$, siendo el percentil 95 de los datos expresados en valores relativos (%) 57.9 y en valores absolutos (μl) 1,058.7. Además se obtuvo para el sexo femenino percentil 5 de 26.8 para datos expresados en porcentaje, y 203.3 para datos expresados en $\mu\text{l.}$, siendo el percentil 95 de los datos expresados en valores relativos (%) 46 y en valores absolutos (μl) 682.5. (Ver Tabla 3).

Tabla 3. PERCENTILES 5 AL 95 DE LEUCOCITOS, LINFOCITOS TOTALES, LINFOCITOS CD3+, CD4+ Y CD8+

TIPO DE CÉLULAS	HOMBRES				MUJERES				TOTAL			
	%		ml		%		ml		%		ml	
	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95
Leucocitos Totales			5,185.0	10,970			5,110.0	10,330.0			5,150.0	10,870
Linfocitos Totales	19.9	40.1	1,462.6	3,468.6	19.1	34.6	1,018.3	3,104.1	19.7	39.2	1,137.2	3,371.7
Linfocitos CD3+	49.8	77.3	828.8	2,308.8	54.1	79.0	629.1	1,992.4	50.1	79.4	743.7	2,259.8
Linfocitos CD4+	33.0	63.2	348.7	1,221.6	38.8	65.2	361.3	1,174.0	34.8	65.2	349.3	1,256.3
Linfocitos CD8+	30.1	57.9	279.8	1,058.7	26.8	46.0	203.3	682.5	27.3	56.5	225.7	1,011.2

Pt 5: Percentil 5

Pt 95: Percentil 95

ml : Microlitro

7. DISCUSIÓN

Para la realización de este estudio se tomaron en consideración estrictos criterios de selección. El tamizaje inicial basado en aquellos parámetros estipulados por el HUSI excluye a individuos que se han encontrado expuestos a diferentes condiciones clínicas bien justificadas en la literatura como influyentes en la apreciación del número de células presentes en circulación. Patologías como hepatitis, malaria, enfermedades de transmisión sexual, HIV, inmunodeficiencias, entre otros; estados fisiológicos: embarazo, pérdida de peso que de hallarse presentes originarían un sesgo dentro de la obtención de la muestra. No obstante se incluyeron otros aspectos para descarte de individuos, como es el caso de la edad estipulada y el recuento total de leucocitos. Todas estas medidas se tuvieron en cuenta a favor de la consecución de una población homogénea y con la menor posibilidad de encontrarse con una patología de base o un estado fisiológico que interfiera alterando los niveles de linfocitos que podrían ser considerados como normales.

El empleo de equipos de alta tecnología es garantía de seguridad y confiabilidad en la obtención de resultados; además, al tratarse del mismo que se encuentra en funcionamiento actualmente en la Pontificia Universidad

Javeriana para el análisis de las pruebas que se llevan a cabo ofrecidas a la comunidad por parte de esta, le imprime un matiz de aplicación práctica y reproductibilidad estimadamente confiable a este trabajo en el ejercicio diario. Sin embargo respuesta de la posible obtención de datos aberrantes, se llevaron a cabo métodos estadísticos con la finalidad de confirmar la validez de los valores obtenidos, o rechazar aquellos que excedieran los límites de la permisividad estadística. El rango estadístico de Dixon obtenido fue una clara evidencia de la homogeneidad de distribución de los hallazgos resultantes.

Para determinar cuál de los tres métodos empleados en el recuento diferencial de leucocitos era el óptimo, se recurrió al coeficiente de correlación, siendo este parámetro mayor entre los linfocitos hallados a través del marcaje con CD y los linfocitos según tamaño y granularidad.

El sexo masculino constituyó el porcentaje más alto de este estudio al igual que el promedio de leucocitos totales. Las mujeres que hicieron parte del estudio presentaron un índice de mayor edad; sin embargo estas diferencias no fueron importantes desde el punto de vista estadístico y no interfieren en los resultados del objetivo principal.

Con base en los valores obtenidos en frecuencias relativas se observó que al distribuir por sexo los valores de linfocitos totales, linfocitos CD3+, CD4+ y

CD8+, los individuos de sexo masculino presentaron un promedio de linfocitos totales y linfocitos T CD8+ mayor que los de sexo femenino; sucediendo lo contrario para los datos de linfocitos T CD3+ y los CD4+.

Los percentiles 5 y 95 hallados a partir de los datos de cada subpoblación celular fueron mayores en las mujeres que en los hombres, excepto para el percentil 5 de los linfocitos T CD8+.

Es así como al observar los valores de percentiles obtenidos en este trabajo y los previamente hallados en otros estudios, tales como los utilizados por el Grupo de Patogénesis de las Inmunodeficiencias Primarias, de la Universidad de Antioquia que reportan para linfocitos CD3+ una media de 1200 y percentiles 5 y 95 de 700 – 2100; para linfocitos CD4+ una media de 700 y percentiles 5 y 95 de 300 – 1400; y para linfocitos CD8+, una media de 400 y percentiles 5 y 95 de 200 – 900. Así como los obtenidos por el Laboratorio de Inmunología Clínica del Hospital Militar Central, que reportan para linfocitos CD3+ valores de percentiles 5 y 95 de 545 – 2741; para linfocitos CD4+ percentil 5 y 95 de 338 – 1548; y para linfocitos CD8+ percentiles 5 y 95 de 80 – 1169. (Ver tabla 4).

Finalmente, la importancia que reviste el contar con unos rangos de normalidad dentro de datos proporcionados por ayudas de laboratorio es innegable. Estos, conforman de por sí un pilar de amplia utilización en la

práctica clínica y suministran elementos de juicio objetivo y preciado valor, para la evaluación y toma de decisiones frente a situaciones de trascendentales acciones por parte del personal de salud.

Tabla 4. Comparación de percentiles 5 y 95 en los diferentes estudios realizados

	P. U. J.	H/ MILITAR	U. ANTIOQ.
CD3+	743.7-2,259.8	545-2,741	700-2,100
CD4+	349.3-1,256.3	338-1,548	300-1,400
CD8+	225.7-1,011.2	80-1,169	200-900

P. U. J. : Pontificia Universidad Javeriana

H/ MILITAR: Hospital Militar

U. ANTIOQ.: Universidad de Antioquia

8. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron valores de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+, en donantes sanos que cumplieron con los parámetros de selección, apreciándose que estos valores de percentiles guardan similitud con los anteriormente obtenidos por otros estudios.

9. RECOMENDACIONES

Ampliar en un estudio posterior el número de individuos con el fin de que la muestra sea representativa de una población mayor y se logren extrapolar los resultados.

Realizar el estudio descriptivo y / o analítico de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ con el fin de estimar la significancia estadística que existe entre estos y los previamente existentes desarrollados por otros grupos de investigación.

Determinar el comportamiento de dichas células en otros grupos etáreos (infancia, seconetud) como un complemento al presente estudio.

10. ANEXOS

Anexo 1. PREPARACION DE REACTIVOS

Stock PBS 25X

188 gr. de K_2HPO_4

33 gr. de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

188 gr de NaCl

Para preparar 1 litro disolver totalmente en 900 ml. de agua destilada.

Estabilizar pH en 7.4 y completar volumen a 1000 ml con agua destilada.

Concentración utilizada de trabajo: 1x

Stock PBS - Azida de Sodio 1%

1 gr. de Azida de Sodio

Disolver en 100 ml de PBS 1x

Concentración utilizada para trabajo: 0.1%

Stock PBS - Paraformaldehído 5%

5 gr. de Paraformaldehído

Disolver en 100 ml. de PBS 1x

Concentración utilizada para trabajo: 0.5%

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A y Cols. 1999. *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid. Interamericana. McGraw- Hill.
2. Anderson, G y Cols.. 1999. *Positive Selection of thymocytes: the long and winding road*. Immunology Today. 20: 463- 468.
3. Avila, L y Cols. 1996. *Estandarización de valores normales de linfocitos CD3, CD4, CD8 y relación CD4/ CD8 por citometría de flujo en individuos sanos colombianos*. Acta Médica colombiana. 21: 158- 161.
4. Baldwin, K y Cols. 1999. *Negative Selection of T Cells Occurs Throughout Thymic Development*. The Journal of Immunology. 163: 689- 698.
5. Becton Dickinson. 1999. *Citometría de flujo. Análisis Celular Multiparamétrico*. Inmunolab. Laboratorios, C. A. Colombia.
6. Beltz, L. 1999. *Thymic involution and HIV progression*. Immunology Today. 20: 429.
7. Bello, A. 1983. *Hematología Básica*. Mexico. Ediciones médicas del Hospital infantil de Mexico.
8. Boehmer, H y Cols. 1997. *Aspects of lymphocyte developmental biology*. Immunology Today. 18: 260- 262.

9. Centers for Disease control. 1997. *Revised Guidelines for Performing CD4+ T- Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. MMWR 46 (RR- 2): 1- 29.
10. Chan, S y Cols. 1993. *Another View of the Selective Model of Thymocyte Selection*. Cell. 73: 225- 236.
11. Daniel, W. 1996. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Mexico. Uteha Noriega editores.
12. Davis, C y Cols. 1993. *Evidence for a Stochastic Mechanism in the Differentiation of Mature Subsets of T Lymphocytes*. Cell. 73: 237- 247.
13. Dawson, B y Cols. 1993. *Bioestadística Médica*. México. El Manual moderno S. A..
14. Ellmeier, W y Cols. 1999. *The Regulation of CD4 and CD8 Coreceptor gene expression during T Cell developmental*. Annual Review Immunology. 17: 523- 554.
15. Fairchild, P y Col. 1995. *Developmental Changes Predispose the Fetal Thymus to Positive Selection of CD4+ CD8+ T Cells*. Immunology. 85: 292- 298.
16. Fitzgerald, L y Cols. 1988. *Exercise and the immune system*. Immunology Today. 11: 337- 339.
17. Goetzman, E. 1993. *Flow Cytometry: Basic Concepts and Clinical Applications in immunodiagnosics*. Clinical Laboratory Science. 6: 177- 182.

18. Guarner, J y Cols. 1996. *Simplificación en el conteo de linfocitos T CD4 positivos en personas con infección por HIV/ SIDA en México*. Salud Pública de México. 38: 207- 211.
19. Henry, J y Cols. 1990. *Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio*. Barcelona. Salvat editores S. A.
20. Lacobs, H. 1997. *Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 decamers with differential signalling properties?*. Immunology Today. 18:565-568.
21. Janeway, C y Cols. 1996. *Immunobiology*. U. S. A. Current Biology Ltda. Gorrland Publishing INC.
22. Kisielow, P y Col. 1995. *Developmental and Selection of T Cells: Facts and Puzzles*. Advances in immunology. 58: 87- 175.
23. Kisielow, P y Col. 1995. *Positive Selection of T Cells. Rescue from Programmed Cell Death and Differentiation Requier Continual Engagement of the T Cell Receptor*. Journal Experimental Medical. 181: 1975- 1984.
24. Lee, G y Cols. 1995. *Wintrobe Hematología Clínica*. Buenos Aires. Inter Médica.
25. Loboguerrero, J y Cols. 1986. *Subpoblaciones de linfocitos T en individuos con riesgo de contraer Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida*. Acta Médica Colombiana. 11: 248- 252.
26. McKenzie, S y Cols. 1991. *Hematología clínica*. México. Editorial El Manual Moderno S. A.

27. Moore, J. 1997. *Coreceptors: Implications for HIV pathogenesis and therapy*. Science. 276:51- 52.
28. Niño, H y Col. 1993. *Garantía de calidad en el laboratorio clínico*. Santafé de Bogotá. Panamericana. 44-67.
29. Paul, W. 1993. *Fundamental Immunology*. New York. Reven Press Ltda.
30. Rojas, W. 1995. *Inmunología*. Medellín. Corporación para Investigaciones Biológicas CBI.
31. Regueiro, J. 1997. *Inmunología, Biología y Patología del Sistema Inmune*. Madrid. Editorial Médica Panamericana.
32. Robey, E y Col. 1994. *Selective events in T Cell developmental*. Annual Review Immunology. 12: 675- 705.
33. Stites, D y Col. 1994. *Inmunología Básica y clínica*. México. El Manual Moderno.
34. Salgado, H y Col. 2000. *Guía de estudio y manejo del paciente sospechoso de presentar alteraciones en la respuesta inmune celular específica*. Asociación Colombiana. Alergia, Asma e inmunología. 9: 9-13.
35. Sebzda, E y Col. 1999. *Selection of the T Cell Repertoire*. Annual Review Immunology. 17: 829- 874.
36. Vigner, J y Cols. 1995. *Laboratorio y Atlas de Citología*. Madrid. Interamericana Mc Graw Hill.

37. Westermann, J. 1990. *Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system?*. Immunology Today. 11: 124-128.
38. William, J. 1990. *Hematology*. New York. Mc Graw- Hill, INC.
39. William, J. 1996. *Manual Williams de Hematología*. Mexico. Mc Graw-Hill Interamericana.
40. Williams, O y Cols. 1997. *The agonist - antagonist balance in positive selection*. Immunology Today. 18: 121- 126.
41. Wolthers, K. 1998. *Rapid CD4+ T- Cell turnover HIV-1 infection: a paradigm revisited*. Immunology Today. 19: 44-48.
42. Yasutomo, K y Cols. 2000. *The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-Cell lineage fate*. Nature. 404: 506-510.

