

Instituto de Hematología e Inmunología

MÉTODO FOSFATASA ALCALINA ANTI-FOSFATASA ALCALINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE INMUNODEFICIENCIAS CELULARES

Lic. Berta B. Socarrás Ferrer, Dra. Vianed Marsán Suárez, Dra. Miriam Sánchez Segura, Lic. Yamilka González de Armas y Dra. Consuelo Macías Abraham

RESUMEN

Para el estudio de 25 pacientes con infecciones recurrentes y un grupo control de 25 individuos supuestamente sanos, se aplicó, en nuestro laboratorio, el método inmunocitoquímico de fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina, para la cuantificación de las principales subpoblaciones de linfocitos T identificados con los anticuerpos monoclonales: anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. Se obtuvieron diferencias significativas para las subpoblaciones TCD3 y CD4 positivos ($p < 0,05$). Por su bajo costo y rapidez, este método puede aplicarse a otros laboratorios de inmunodiagnóstico del país.

DeCS: TESTS INMUNOLOGICOS/métodos; SUBGRUPOS DE LINFOCITOS T/inmunología; ANTICUERPOS MONOCLONALES/inmunología.

La utilización de anticuerpos monoclonales (AcMo), dirigidos contra antígenos celulares permite la caracterización de las diferentes subpoblaciones linfocitarias T auxiliaadoras/inductoras y supresoras/citotóxicas.¹⁻⁴ Diversos métodos de inmunofluorescencia e inmunocitoquímicos se utilizan para la determinación del fenotipo celular.⁵⁻¹⁰

En nuestro trabajo se evalúa la introducción del método inmuno-citoquímico fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina modificado, para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias T en pacientes con infecciones recurrentes, en los cuales se sospecha una posible inmunodeficiencia celular.

MÉTODOS

Se estudiaron en total 25 pacientes con infecciones recurrentes, 10 del sexo femenino y 15 del masculino, con un rango de edad de 2 a 36 años, atendidos en las consultas de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología.

Como grupo control se utilizaron muestras de 25 individuos supuestamente sanos, con características similares en cuanto a edad y sexo.

Tanto en el grupo control como en los pacientes se cuantificaron las subpoblaciones linfocitarias TCD3, CD4 y CD8, mediante la utilización de un método inmunocitoquímico de fosfatasa alcalina-

anti-fosfatasa alcalina (APAAP) modificado en nuestro laboratorio (tabla 1).

A cada individuo se le extrajeron 10 mL de sangre periférica en tubos de heparina y se centrifugó a 1 500 rpm durante 10 min, se extrajo la capa blanca que contiene los linfocitos y se hicieron extensiones en láminas portaobjetos de cristal. El área del frotis a estudiar se delimitó con lápiz con punta de diamante. Las láminas fueron fijadas en acetona pura a temperatura ambiente (TA). Fueron añadidos los AcMo específicos para los antígenos a estudiar, previamente diluidos (1:20) (tabla 1); posteriormente antisuero de conejo anti-ratón (*Linking 6*) (1:50) y anticuerpos conjugados a la enzima fosfatasa alcalina (complejo APAAP). Se realizaron lavados en solución amortiguadora de tris hidroximetilaminometano 0,5 M, pH 7,6 entre cada uno de los diferentes pasos. Las láminas fueron procesadas en cámara húmeda. Finalmente se llevó a cabo la coloración con naftol (200 µL), levamisol

5 µL, rojo violeta (1 µL) y la contracoloración con hematoxilina de Gill (200 mL). La lectura se realizó en un microscopio óptico DIALUX 20 EB (Leitz, RFA). Se contaron 100 células por lámina y se consideró positivo cuando el número de células marcadas es igual o mayor al 20 %.

Para el grupo de pacientes y de control se realizó la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estándar (DE). Se utilizó para el análisis estadístico la t de Student para muestras independientes, con un nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS

Al comparar los valores entre pacientes y controles se obtuvieron diferencias significativas para las subpoblaciones TCD3 y CD4 positivos, con $p=0,01$ y $p=0,001$, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el subtipo TCD8 positivo (tabla 2).

TABLA 1. *Panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) para el inmunotipaje celular*

CD Dirigidos contra células T	AcMo	Fuente
CD3	OKT3	Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España
CD4	OKT4	Filatov, <i>Institute Immunology</i> , Rusia
CD8	OKT8	Filatov, <i>Institute Immunology</i> , Rusia

TABLA 2. *Comparación de los marcadores celulares entre pacientes y controles*

Marcador	Pacientes ($\bar{X} \pm DS$)	Controles ($\bar{X} \pm DS$)	P
CD3	55,48 \pm 10,85	61,8 \pm 4,61	< 0,05
CD4	40,92 \pm 8,30	52,6 \pm 9,37	< 0,05
CD8	21,84 \pm 8,78	23,72 \pm 5,53	ns

X: Media; DS: desviación estándar; CD: *Cluster* de diferenciación; ns: no significativo.

DISCUSIÓN

La integridad de la respuesta inmune celular es importante en la defensa frente a las infecciones.^{5,11}

Los linfocitos T desempeñan un papel central en la inmunidad adaptativa, dentro de éstos los de fenotipo CD4 positivo estimulan a las células B a secretar anticuerpos a través de la producción de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5).¹² Por otra parte, aquellos de fenotipo CD8 positivo realizan funciones citotóxicas, liberando perforinas y granzimas B;¹³ sin embargo, esta relación fenotipo-función no es un dogma, ya que subpoblaciones TCD4 positivas pueden realizar funciones citotóxicas y las TCD8 positivas producir ciertas citocinas, fundamentalmente interleucina-2 (IL-2), que estimulan a su vez la respuesta inmune humoral.¹⁴

La cuantificación de las subpoblaciones de células T en pacientes con infecciones recurrentes es útil para el diagnóstico de diferentes estados de inmunodeficiencia celular.

En nuestro estudio, la subpoblación de células TCD4 positivas muestra mayor afectación en relación con las CD8 positivas,

cuando se comparan con el grupo control. Este grupo de pacientes presenta infecciones más severas que aquellos cuyas poblaciones T están dentro de límites normales.

La introducción del método inmunocitoquímico APAAP demuestra ser útil para el diagnóstico de las inmunodeficiencias y la modificación de este realizado en nuestro laboratorio, con uso del *buffy coat*, y no de sangre periférica como se plantea en la técnica original, permite una mejor visualización de las células marcadas, y por lo tanto, un menor rango de error, porque se cuentan en las láminas solo células mononucleares.

A diferencia de otros métodos utilizados en nuestra institución para estos fines,^{1,3,4} esta técnica permite llegar a un diagnóstico seguro en un breve período de tiempo, la conservación de las láminas a TA con fines docentes e investigativos, y sobre todo, prescinde del uso del Ficoll para el aislamiento de células mononucleares. Por su bajo costo y rapidez, este método puede aplicarse a otros laboratorios de inmunodiagnóstico del país.

SUMMARY

For the study of 25 patients with recurrent infections and a control group of 25 supposedly healthy individuals, our Laboratory applied the immunocytochemical method of alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase for the quantitation of the main T-lymphocyte subgroups identified with monoclonal antibodies: anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8. There were significant differences in positive TCD3 and CD4 subsets ($p < 0.05$). Because this is a low cost and quick method, it may be applied by other immunodiagnosis labs throughout the country.

Subject headings: IMMUNOLOGIC TESTS/methods; T- LYMPHOCYTE SUBSETS/immunology, ANTIBODIES, MONOCLONAL/immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorigados Pedré LC, Aranda Rivero RE, Rivero Jiménez RA, Palma Salgado LE. Estandarización de la técnica de la inmunofluorescencia indirecta para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias con anticuerpos monoclonales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1985;1(2):185-92.
2. Rivero Jiménez RA, Aranda Rivero RE, Cruz Sotolongo C, Lorigados Pedré LC, Ramírez Hernández P. Subpoblaciones de linfocitos en la anemia drepanocítica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1986;2(1):90-2.
3. Aranda Rivero RE, Cruz Sotolongo C, Rivero Jiménez RA, Lorigados Pedré LC, Ramírez Hernández P. Estudio comparativo de las subpoblaciones de linfocitos T humanos mediante anticuerpos monoclonales y técnicas de formación de rosetas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1986;2(2):153-7.
4. Rivero RA, Bello M, Suárez LE, Cruz C, Martínez M, Palma L. Introducción de un ultramicrométodo inmunocitoquímico para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias identificadas con anticuerpos monoclonales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11(1):46-56.
5. Sánchez-Madrid F. Linfocitos T: diferenciación subpoblaciones. Activación. En: Larraga V, Fresno M, Enjuanes. *Inmunología*. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1987:129-30. (Edición Revolucionaria).
6. Boffill M, Janossy G, Lee CA. Laboratory control values for CD4 and CD8 T Lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 1993;88:243-52.
7. Cordell F, Fallini B, Erber WN. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase. *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.
8. Cruz C, Rivero R, Suárez L. Detección mejorada del antígeno CD2 por un ultramicrométodo inmunocitoquímico en células T no-deshidratadas unidas a láminas recubiertas con poli-L-Lisina y fijadas con vapores de formaldehído. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11(1):71-2.
9. Cruz C, Pérez L, Rivero R, González C, Pérez J. Ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ): su aplicación para cuantificar linfocitos TCD4+ en portadores del VIH y en pacientes con SIDA. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1996;12(1):41-6.
10. Rivero R, Bello M, Suárez L, Cruz C, Martínez M, Palma L. Introducción de un ultramicrométodo inmunocitoquímico en células T no-deshidratadas unidas a láminas recubiertas con poli-L-Lisina y fijadas con vapores de formaldehído. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11(1):57-62.
11. Moses RD, Winn HJ, Auchincloss H. Evidence that multiple defects in cell-surface molecule interactions across species differences are responsible for diminished xenogeneic T cells responses. *Transplantation* 1992;53:203.
12. Moses RD, Pierson RN, Winn HJ, Auchincloss H. Xenogeneic proliferation and lymphokine proliferation and lymphokine production are dependent on CD4+ helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J Exp Med* 1990;172:567.
13. Sprent J, Schaefer M. Antigen-presenting cells for CD8+ T cells. *Immunol Res* 1990;117:213.
14. Kawagishi N, Möler E, Satake M. Human CD8 responder cells can be directly activated to proliferate and to produce IL-2 following stimulation by allogenic, but not by xeno geneic, porcine blood mononuclear cells. *Xenotransplantation* 1997;4:95-102.

Recibido: 9 de noviembre del 2000. Aprobado: 11 de enero del 2001.

Lic. **Berta B. Socarrás Ferrer**. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537)578268. Fax:(537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu