

Técnicas

Instituto de Hematología e Inmunología

COMPARACIÓN DEL ULTRAMICROMÉTODO INMUNOCITOQUÍMICO (UMICIQ) CON EL DE LA FOSFATASA ALCALINA-ANTI FOSFATASA ALCALINA (APAAP) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T

Lic. Beatriz Socarrás Ferrer, Dra. Vianed Marsán Suárez, Dra. Miriam Sánchez Segura, Lic. Anissa Gramatges Ortiz, Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco y Dra. Consuelo Macías Abraham

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre el método inmunoenzimático que emplea el complejo fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina (APAAP) y el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) utilizado para la detección de marcadores antigénicos y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T. Se estudiaron los antígenos celulares CD3, CD4 y CD8 en 30 individuos adultos supuestamente sanos. Al compararse los resultados por ambas técnicas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para una $p < 0,05$. Se concluyó que aún cuando la eficacia diagnóstica de ambos métodos es similar, el APAAP resultó más rápido, económico y menos laborioso que el UMICIQ, por lo que se recomienda como el procedimiento de preferencia para estos estudios celulares.

DeCS: FOSFATASA ALCALINA; INMUNOHISTOQUIMICA/métodos; ANTIGENOS CD3/ análisis; ANTIGENOS CD4/análisis; ANTIGENOS CD8/ análisis; SUBGRUPOS DE LINFOCITOS T/química; SUBGRUPOS DE LINFOCITOS/inmunología; SUBGRUPOS DE LINFOCITOS/enzimología.

La integridad de la respuesta inmune celular es importante en la defensa del organismo frente a las infecciones, y dentro de estas respuestas, desempeñan un papel central los linfocitos humanos, que se pueden clasificar en dependencia de

determinados marcadores presentes en su superficie celular.¹⁻⁶

Tanto el diagnóstico de las hemopatías malignas como la determinación de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con otras enfermedades, se puede realizar

por inmunofluorescencia directa e indirecta^{7,8} y por métodos inmunocitoquímicos que utilizan anticuerpos conjugados con enzimas como la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. En este trabajo se realizó una comparación entre el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) previamente introducido en nuestro laboratorio, y el método de la fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias T en sangre periférica humana.

MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre periférica de 30 individuos supuestamente sanos, 16 hombres y 14 mujeres, que acudieron al Departamento de Hemoterapia del Instituto de Hematología e Inmunología. El rango de edad osciló entre 23 y 46 años.

El estudio se realizó tanto por el UMICIQ como por la técnica APAAP.⁹⁻¹⁴ Los antígenos celulares fueron CD3, CD4 y CD8, determinados con anticuerpos monoclonales donados gentilmente por el Hospital Clínico de Barcelona y el Instituto de Inmunología Filatov de Rusia.

UMICIQ

Se extrajeron muestras de sangre periférica heparinizada y se realizó el aislamiento de la células mononucleares según el método de Boyüm modificado.¹⁵

La concentración celular se ajustó a 4×10^6 células/mL y se determinó la viabilidad (más del 95 %) según el método de exclusión con tripán azul.

Se emplearon las células no deshidratadas adheridas electrostática-

mente a las láminas porta objetos de cristal que contenían 21 pocillos tratados con poli-L- lisina fijados con vapores de formaldehído.

Para detectar la reacción antígeno anticuerpo se emplearon anticuerpos conjugados con peroxidasa, el peróxido de hidrógeno como sustrato y un agente cromógeno.⁹⁻¹²

APAAP

Se realizaron estudios de sangre proveniente de punción digital, en lámina porta objetos de cristal. El área del frotis a estudiar se delimitó con lápiz con punta de diamante. La láminas se fijaron con acetona pura. Posteriormente se distribuyó sobre cada lámina una fracción purificada de inmunoglobulina del antisuero de conejo anti-ratón (Linking) y luego se les añadió el complejo APAAP, que consistía en complejos solubles de fosfatasa alcalina-anti fosfatasa (monoclonal de ratón). Además se utilizó como sustrato el naftol-AX-MX fosfato y un agente cromógeno.^{13,14}

La lectura de ambos métodos se realizó en un microscopio óptico DIALUX 20EB. Se contaron al menos 100 células en cada lámina.

Se determinó la media aritmética y la desviación estándar para los diferentes grupos estudiados. Para la comparación se empleó la t de Student para muestras pareadas, para una $p \leq 0,05$.¹⁶

RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos para ninguno de los marcadores antigénicos estudiados (tabla).

TABLA. Resultados obtenidos en la comparación del método inmunoenzimático de la fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina (APAAP) con el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ).

Variables (%)	UMICIQ n = 30 $\bar{X} \pm DE$	APAAP n = 30 $\bar{X} \pm DE$	P
CD3	61,60 \pm 5,36	61,53 \pm 4,58	NS
CD4	44,13 \pm 3,13	42,73 \pm 3,43	NS
CD8	24,13 \pm 6,43	24,13 \pm 5,69	NS

\bar{X} : media aritmética; DE: desviación estándar; NS: no significativo, $p \leq 0,05$; UMICIQ: ultramicrométodo inmunocitoquímico; APAAP: método fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina.

El tiempo de procesamiento de las muestras por el método APAAP fue de 4 h, mientras que por el UMICIQ fue de 72 h.

DISCUSIÓN

Los métodos inmunocitoquímicos (APAAP y UMICIQ) se aplican con éxito en el estudio de las inmunodeficiencias y en la caracterización inmunológica de las células malignas en pacientes con leucemias, linfomas y otras enfermedades hematológicas.^{2,3,6,12,15} Estos métodos presentan algunas ventajas sobre los de inmunofluorescencia, como la posibilidad de visualizar las células con un microscopio óptico y además observar simultáneamente tanto la morfología celular como la reacción inmunológica de sus antígenos con los anticuerpos específicos.

La técnica APAAP permite el inmunofenotipaje celular con las siguientes

ventajas: se realiza de extendidos de sangre periférica o medular, por lo que no es necesario el aislamiento de las células mononucleares y el uso del Ficoll, mientras que en el UMICIQ las células mononucleares se obtienen a partir de un gradiente de Ficoll y se adhieren por atracción electrostática de cargas, a láminas portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, y esto provoca un mayor tiempo de ejecución y costo del sistema de diagnóstico.

El APAAP es más rápido, pues los resultados se obtienen a las 4 h de extraídas las muestras, y el UMICIQ es un método más largo y laborioso. Por último, en el método APAAP se pueden conservar las láminas sin procesar, durante largos períodos de tiempo, lo que permite estudios retrospectivos; esto no es posible con el UMICIQ. Tiene la desventaja de que necesita una lámina para cada anticuerpo monoclonal, mientras que con el UMICIQ se pueden realizar 21 determinaciones en cada lámina portaobjeto.

Por los resultados alcanzados, podemos concluir que el método APAAP es un procedimiento más rápido, menos laborioso y tan eficaz como el UMICIQ, aplicable con confiabilidad para la clasificación inmunológica de los síndromes linf y mieloproliferativos, en la evaluación de poblaciones y subpoblaciones celulares en nuestro laboratorio, por lo que pudiera hacerse extensivo a otros centros del país.

SUMMARY

A comparative study was conducted on the immunoenzymatic method based on the alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase complex and the immunocytochemical ultramicromethod used for detecting antigen markers and for the quantification of T-lymphocyte subsets Cell antigens CD3, CD4 and

CD8 from 30 apparently healthy adults were studied. When comparing the outcome of both techniques, statistically significant differences were found, ($p < 0,05$). It was concluded that although the diagnostic efficiency of both methods are similar, the alkaline phosphatase – anti-alkaline phosphatase method is quicker, more economical and less laborious than the immunocytochemical ultramicromethod, so it is recommended as a procedure of choice for these cell studies.

Subject headings: ALKALINE PHOSPHATASE; IMMUNOHISTOCHEMISTRY/methods; ANTIGENS, CD4/analysis; ANTIGENS, CD3/analysis; ANTIGENS, CD8/analysis; T-LYMPHOCYTE SUBSETS/chemistry; T-LYMPHOCYTE SUBSETS/immunology; T-LYMPHOCYTE SUBSETS/enzyme.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez- Madrid F. Linfocitos T: diferenciación, subpoblaciones, activación. En: Larraga V, Fresno M, Enjuanes L. (eds). Inmunología. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1987:129-30 (Edición Revolucionaria).
2. Boffill M, Janossy G, Lee CA. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 1992;88:242-52.
3. Rivero RA, Aranda RE, Cruz C, Lorigados LC, Hernández P. Subpoblaciones de linfocitos en la anemia drepanocítica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1986;2(1):90-92.
4. Knapp W, Dorken B, Rieber P, Schidt RE, Stein H, von Borne AEG. CD Antigens-1989. *Am J Pathol* 1989;135:420-1.
5. Schlossman SF. CD Antigens 1993. *Immunol Today* 1994;5:98-9.
6. Fournier AM, Sosenko JM. The relationship of total lymphocyte count to CD4 in patients infected with human immunodeficiency virus. *Am J Med Sc* 1992;304:79-82.
7. Lorigados LC, Aranda RE, Rivero RA, Palma 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.
8. Landay A, Gartland GL, Abo T, Cooper MO. Enumeration of human lymphocyte subpopulations by immunofluorescence: a comparative study using automated flow microfluorometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods*. 1983;58:337-47.
9. Rivero R, Bello M, Suárez L, 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.
10. 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):71-72.
11. Cruz C, Pérez L, Rivero R, González C, Pérez J. Ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ): su aplicación para cuantificar linfocitos T CD4 + en portadores del VIH y en pacientes con SIDA. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1996;12(1):41-46.
12. Suárez L, Cruz C, Rivero R. Ultramicrométodo inmunocitoquímico. Titulación de anticuerpos utilizados para el inmunofenotipaje celular. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995; 11 (1):57-62.
13. Cordell F, Falini B, Erber WN. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complex of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase. *J Histochem* 1984;32:219-29.
14. Houmand A, Abrahamsen B, Tinggaard Perdensen N. Relevance of Ki-67 expression in the classification of non-Hodgkin's lymphomas: A morphometric and double-immunostaining study. *Histopathology* 1992;20:13-20.
15. Boyüm A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21 (suppl 97):77-89.
16. Freund JE. Estadística elemental moderna. 2da. ed. Londres: Universidad de Cambridge, 1960:85-89.

Recibido: 14 de noviembre del 2001. Aprobado: 24 de noviembre del 2001.

Lic: *Beatriz B. Socarrás Ferrer*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu