

Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales

Evaluación del desempeño de los conjugados anti-CD4/FITC y anti-CD8/FITC producidos en LABEX

MsC. Marlene Toledano Heredia,¹ Lic. Randelys Molina Castro,² Dra. Teresita Rodríguez Obaya,³ Dr. José M. Aviñó Marrades⁴ y Dr. Orlando R. Serrano Barrera⁵

La molécula CD4 es una glicoproteína de 55 kD presente en una subpoblación de linfocitos T con funciones centrales dentro de los mecanismos de defensa, pues proporcionan la cooperación para la dirección y regulación de las respuestas inmunes. Actúa como ligando de las moléculas de clase II del Sistema Principal de Histocompatibilidad en las células presentadoras de antígeno y ha sido identificado como el sitio receptor del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH),¹⁻⁴ lo cual significa que el tropismo y efectos del VIH tengan como consecuencias finales el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. El reactivo anti-CD4-FITC se utiliza en la evaluación cuantitativa de los linfocitos T cooperadores y, por ende, en los estudios de VIH/SIDA, enfermedades linfoproliferativas, otras inmunodeficiencias y enfermedades del tipo autoinmune.

El receptor CD8 es una proteína que se encuentra en la superficie de otra subpoblación de linfocitos, llamadas en otro momento células supresoras o T8, con funciones efectoras de carácter lítico, encargadas fundamentalmente de reconocer y eliminar células cancerosas o infectadas por virus.¹ El reactivo anti-CD8-FITC se utiliza en la cuantificación de linfocitos T CD8+ en sangre periférica. El valor del conteo de células T CD8+ radica en apoyar la caracterización del sistema inmunológico, pues el aumento de su concentración indica una respuesta inmune en marcha.⁵ Así, en la infección temprana por VIH, sus niveles se elevan para luego declinar en mayor o menor medida; cuando regresan a la normalidad, se ha perdido la batalla, como sucede en el SIDA.

El conteo de linfocitos T CD4+ ha sido recomendado por el Colegio Americano de Médicos como marcador en los análisis de ensayos clínicos en pacientes VIH/SIDA y es parte de los criterios de definición de caso y de asignación del paciente al estadio de su enfermedad.⁶ En general, se acepta como el principal marcador de laboratorio para medir el estado inmunológico de un individuo.⁷

Este ensayo en la actualidad se realiza por medio de un citómetro de flujo y posee como principio la especificidad de la reacción inmunológica al enfrentar los anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 con los linfocitos de una muestra de sangre periférica del sujeto en estudio. Las moléculas de anticuerpos han sido previamente conjugadas a isotiocianato de fluoresceína, una sustancia que tiene la particularidad de emitir fluorescencia a una longitud de onda de 525 nm. La cuantificación de los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ presentes en sangre periférica se realiza mediante el conteo por citometría de flujo de las células fluorescentes del total de linfocitos en la muestra del paciente y enfrentados al fluorocromo como agente revelador de la reacción.^{4, 8, 9} Para asegurarse de que se trata de linfocitos T, dado que otras células pueden expresar en superficie el CD4, se emplea como marcador adicional un anticuerpo anti-CD3, que identifica la molécula CD3, característica de las células T al formar parte de su complejo receptor específico y transductor de señales al interior celular.

En el presente trabajo se evaluó el desempeño de los conjugados primarios anti-CD4-FITC y anti-CD8-FITC producidos en los Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX) frente a sus similares de la casa comercial DAKO, ambos listos para el uso en la técnica de citometría de flujo.

Métodos

La evaluación del funcionamiento de estos reactivos se realizó mediante un estudio comparativo del porcentaje de reconocimiento de los diagnosticadores producidos en LABEX con los de la casa comercial DAKO, en muestras de sangre periférica de individuos supuestamente sanos (VIH negativos) y de pacientes en diferentes fases de la infección retroviral, tomados de manera aleatoria

en el período comprendido desde marzo del 2001 hasta enero del 2004. Se utilizaron frascos de tres lotes productivos de LABEX y otros de un lote de referencia de la firma comercial DAKO, con una inmunorreactividad celular entre: 33 y 59 % para CD4 y de 15 – 39 % para CD8.

En la evaluación de los primeros lotes (A1 y C1) se utilizaron muestras de 11 individuos supuestamente sanos y 62 pacientes VIH/SIDA; para los segundos lotes (A2 y C2), muestras de 11 individuos supuestamente sanos y 59 pacientes VIH/SIDA, para los terceros (A3 y C3), se procesaron muestras procedentes de 24 individuos supuestamente sanos y de 58 pacientes VIH/SIDA.

El procedimiento empleado en los ensayos corresponde al propuesto por el fabricante, tal como se indica en la literatura adjunta del reactivo, que se describe brevemente. Se incubaron 100 µL de sangre y 100 µL del conjugado según el caso, durante 30 minutos a 4 ° C en la oscuridad. Se añadió 4 mL de solución lisante, se incubaron 15 minutos, también en oscuridad a 4 ° C y se centrifugaron durante 6 min a 300 x g y una temperatura de 20 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante, se secó con papel de filtro, se agitó sobre vortex y se añadió 400 µL de solución lisante. Se incubó 10 min a 4 °C en la oscuridad y se añadió 4 mL de solución salina, se centrifugó a 20 ° C durante 6 min a 300 x g; se decantó y añadió 500 µL de FACS Flow. Seguidamente se realizaron las lecturas en el citómetro de flujo marca FACScan de Becton Dickinson ⁴ y el programa de obtención de los resultados fue el CellQuest.

Se calcularon los estadígrafos: media aritmética (\bar{X}), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV) y se aplicó la prueba t de Student en muestras pareadas con intervalos de confianza de 95 %; valores de $p > 0.05$ fueron considerados no significativos y se realizó regresión lineal con los valores de los conteos de células CD4+ y CD8+.

Resultados

En las **tablas 1 y 2** se muestra la comparación de los marcadores T CD4+ en individuos sanos y pacientes VIH/SIDA, mediante el reactivo de LABEX, para cada lote productivo, los que presentaron gran similitud en los porcentajes de reconocimiento a los obtenidos por el reactivo comercial DAKO, dado por la similitud en los parámetros estadísticos (\bar{X} , DE y CV) en todos los casos; así como la comparación aplicando la prueba t de Student en muestras pareadas

Tabla 1. Comparación de la determinación de marcadores T CD4+ en individuos sanos

| | ANTI CD4-FITC | | | | | |
|-----------|---------------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | n = 11 | | n = 11 | | n = 24 | |
| | A1 | B | A2 | B | A3 | B |
| \bar{X} | 37.20 | 37.40 | 39.80 | 40.00 | 39.50 | 39.40 |
| DE | 10.80 | 10.90 | 10.10 | 10.20 | 11.00 | 10.90 |
| CV | 0.29 | 0.29 | 0.26 | 0.26 | 0.28 | 0.28 |
| p | > 0.05 | | > 0.05 | | > 0.05 | |

Leyenda:

A1, A2, A3: % de reconocimiento con reactivos LABEX

B: % de reconocimiento del patrón comercial DAKO

DE: desviación estándar

\bar{X} : Media aritmética

CV: Coeficiente de variación

Tabla 2. Comparación de la determinación de marcadores T CD4+ en pacientes VIH

| | ANTI CD4-FITC | | | | | |
|-----------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | Para n = 62 | | Para n = 59 | | Para n = 58 | |
| | A1 | B | A2 | B | A3 | B |
| \bar{X} | 14.00 | 14.00 | 20.04 | 19.91 | 23.84 | 23.76 |
| DE | 3.940 | 3.910 | 14.24 | 13.63 | 10.14 | 10.62 |
| CV | 0.280 | 0.279 | 0.711 | 0.685 | 0.42 | 0.44 |
| p | > 0.05 | | > 0.05 | | > 0.05 | |

Leyenda:

A1, A2, A3: % de reconocimiento con reactivos LABEX

B: % de reconocimiento del patrón comercial

DE: desviación estándar

\bar{X} : Media aritmética

CV: Coeficiente de variación

En las **tablas 3 y 4** se muestra la comparación de las medias, desviación estándar y coeficiente de variación en la determinación de los marcadores TCD8+ en individuos sanos y pacientes VIH/SIDA, respectivamente.

Tabla 3. Comparación de la determinación de marcadores T CD8+ en individuos sanos

| | ANTI CD8-FITC | | | | | |
|-----------|---------------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | n = 11 | | n = 11 | | n = 24 | |
| | C1 | B | C2 | B | C3 | B |
| \bar{X} | 30.20 | 30.30 | 32.25 | 32.30 | 31.81 | 31.79 |
| DE | 8.10 | 8.11 | 9.02 | 9.03 | 8.54 | 8.54 |
| CV | 0.26 | 0.26 | 0.28 | 0.28 | 0.26 | 0.26 |
| p | > 0.05 | | > 0.05 | | > 0.05 | |

Leyenda:

C1, C2, C3: % de reconocimiento con reactivos LABEX

B % de reconocimiento del patrón comercial

DE: desviación estándar

\bar{X} : Media aritmética

CV: Coeficiente de variación

Tabla 4. Comparación de la determinación de marcadores T CD8+ en pacientes VIH

| | ANTI CD8-FITC | | | | | |
|-----------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | Para n = 62 | | Para n = 59 | | Para n = 58 | |
| | C1 | B | C2 | B | C3 | B |
| \bar{X} | 45.80 | 45.69 | 28.19 | 28.19 | 17.23 | 17.24 |
| DE | 13.31 | 13.29 | 15.45 | 15.45 | 9.08 | 9.08 |
| CV | 0.29 | 0.29 | 0.54 | 0.54 | 0.52 | 0.52 |
| p | > 0.05 | | > 0.05 | | > 0.05 | |

Leyenda:

C1, C2, C3: % de reconocimiento con reactivos LABEX

B: % de reconocimiento del patrón comercial

DE: desviación estándar

\bar{X} : Media aritmética

CV: Coeficiente de variación

La **figura** muestra los gráficos de regresión lineal de los valores de conteos de los marcadores T CD4+ y T CD8+, respectivamente al ser comparados los reactivos LABEX (A) con los DAKO (B).

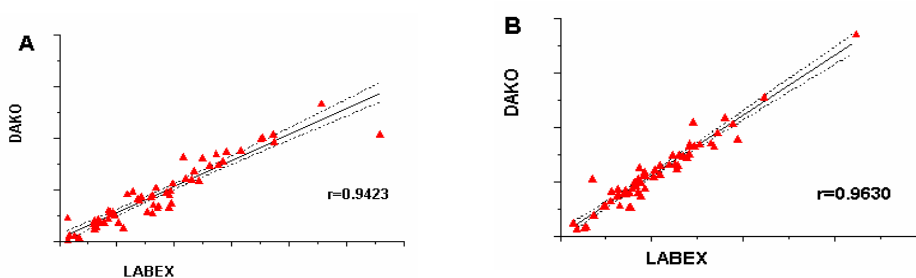


Figura. Correlación lineal del conteo de células absolutas de ambos reactivos. A: células TCD4+; B: células TCD8+.

Discusión

El conteo de CD4 se emplea para la evaluación del paciente VIH/SIDA, decidir la profilaxis contra *Pneumocystis carinii*, iniciar el tratamiento antirretroviral y monitorear su eficacia y la aparición de resistencia.¹⁰ En el caso de la prevención de la neumonía por *P. carinii*, la terapéutica debe implementarse si se cuantifican menos de 200 células/ μ L o $<14\%$.^{6,7} Los antirretrovirales, en cambio, deben ofrecerse con un conteo por debajo de 350 células/ μ L, lo cual se debe a que se ha establecido que el sistema inmune tiene una competencia relativa, si mantiene los linfocitos T CD4+ por encima de 500 células/ μ L o superiores al 28 nm%. Se habla de supresión temprana cuando el conteo ha caído entre 200 y 500 células/ μ L ó 14 – 28 %, mientras que la inmunodeficiencia es marcada cuando los niveles están aún más bajos.⁷

Todos los resultados presentados en las tablas y figura confirman la similitud del desempeño de los reactivos anti-CD4-FICT y anti-CD8-FICT producidos por LABEX y por la firma comercial DAKO, en términos de porcentaje de reconocimiento, tanto en pacientes VIH/SIDA como en los controles supuestamente sanos. Los coeficientes de variación obtenidos muestran homogeneidad al comparar ambos reactivos con la misma muestra e indican que los límites superiores e inferiores oscilan entre valores muy similares. Al comparar la DE con el CV utilizando ambos reactivos, la diferencia nunca es mayor, por lo cual señalamos la imprecisión de aproximadamente 0,8. +

El reactivo fabricado en LABEX permitió una buena reproducibilidad, en los datos primarios se encontró una diferencia menor de 2 % (nótese la diferencia entre las medias). Así mismo los estadígrafos utilizados demuestran que el reactivo objeto de estudio permite mantener la especificidad y la sensibilidad adecuadas de acuerdo con el método aplicado. Si bien se decidió no establecer criterios de selección de casos para homogeneizar las muestras de pacientes, el reactivo evaluado detectó muestras con muy bajos porcentajes de CD4, en un grupo de pacientes infectados. Debe recordarse que tras la infección primaria y debido a una intensa replicación viral, se produce una caída importante de las células CD4+; algunos pacientes mantienen cifras bajas, lo que es un indicador de mal pronóstico, mientras en otros hay un rebote.⁵ Uno de los factores asociados a este proceso es la respuesta de los linfocitos T CD8+, pues al parecer participan en el control inicial de la replicación viral; coincidentemente, el mismo grupo A1 de los infectados, mostró las más altas concentraciones de estas células, mientras los otros, probablemente de evolución más avanzada, contaron con cifras en descenso.

En Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades recomiendan el monitoreo de los linfocitos T CD4+ cada 3 a 6 meses en todos los pacientes VIH/SIDA,¹⁰ pues la actividad del virus puede ser sostenida en ausencia de síntomas: aún en sujetos con conteos de 500 células/ μ L, la viremia puede destruir 2×10^9 linfocitos diariamente.¹¹ También, cifras inferiores a 50 células/ μ L significan un riesgo aumentado de muerte en los próximos seis meses.⁵

Como se puede observar en la figura, los valores de r próximos a 1, para el conteo de los marcadores analizados, indican una buena reproducibilidad de las mediciones por ambos reactivos, para cada una de sus especificidades.

Los conjugados anti-CD4-FITC y anti-CD8-FITC producidos por LABEX mostraron resultados muy similares a los obtenidos con el reactivo comercial de referencia, lo que permite evaluar el desempeño de los primeros como adecuado para el fin propuesto. Esto hace posible su recomendación como solución nacional para ser utilizado en citometría de flujo.

Referencias bibliográficas

1. Reyes Terán G, Ponce de León RS. Conteo de células T CD4+ y su uso en el manejo de pacientes con VIH-1. Rev Invest Clin 1993; 45:363-70.
2. AIDS Nutrition Services Alliance. Fact sheet 4: treatment for diarrhea. [Biblioteca virtual en línea] <<http://www.aidsnutrition.org/fact4.shtml>> [Consulta: 14 de junio 2004].
3. Pérez F. Epidemiología. En: Conociendo sobre VIH. Manual para Médicos de la Familia y personal de salud de Cuba. La Habana: Centro Nacional de Prevención de ITS/VIH/SIDA, 2004:9-10.
4. Citometría de flujo. Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autónoma de Madrid. [biblioteca virtual en línea] <<http://photonics.cnb.uam.es/>> [consulta: 14 junio 2004].
5. Nicholson JKA. Immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry. En: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6 ed. Washington: Press, 2002: 137-47.
6. Baseler MW, Stevens RA, Natarajan V, Gen-Banacloche JC, Metcalf JA. Immunologic evaluation of patients with HIV infection. En: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6 ed. Washington: Press, 2002: 758-71.
7. Patton LL. HIV disease. Dent Clin N Am 2003; 47:467-92.
8. Nilson LA. Handbook of experimental immunology. Oxford: Blackwell Scientific, 1996: 22-32; 120-5.
9. Nivaldo da Silva. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. Rev Med Veterinaria 2001; 82(2): 68-70.
10. Centers for Disease Control and Prevention. 1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with HIV. MMWR 1997; 46(RR-2):1-29.
11. McCune JM. Viral latency in HIV disease. Cell 1995; 82:183-88.

Lic. Marlene Toledano Heredia. Calle 6 # 65, entre Escario y Enramadas. Reparto Santa Bárbara.
e-mail: marlen@labex.scu.sld.cu.

1. **Licenciada en Bioquímica. Máster en Biotecnología. Instructora e Investigadora Agregada**
2. **Licenciado en Bioquímica**
3. **Especialista de II Grado en Histología. Profesor Titular, Investigador Titular**
4. **Especialista de II Grado en Histología. Profesor Titular, PhD.**
5. **Especialista de I Grado en Inmunología. Profesor Agregado e Investigador Agregado**

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Toledano Heredia M, Molina Castro R, Rodríguez Obaya T, Aviñó Marrades JM, Serrano Barrera OR. Evaluación del desempeño de los conjugados anti-CD4/FITC y anti-CD8/FITC producidos en LABEX [artículo en línea]. MEDISAN 2006;10(4). <http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol10_4_06/san03406.htm> [consulta: fecha de acceso].