

# *Estandarización de valores normales de linfocitos CD3, CD4, CD8 y relación CD4/CD8 por citometría de flujo en individuos sanos colombianos*

Luz M. Avila, Carmen P. Gómez, Ruby S. Ríos, Ernesto Laverde

**Objetivo:** estandarizar valores de referencia de CD4/CD3 y CD8/CD3 por citometría de flujo (FACS) y usar estos valores de referencia para el monitoreo de células T CD4(+) en pacientes con infección por VIH, y comparar la técnica de FACS con la de inmunofluorescencia.

**Sujetos de estudio:** cien adultos clínicamente sanos y serológicamente aptos para ser donantes de sangre entre los 18 y 45 años de edad. La toma de la muestra fue realizada entre las 8:00 a.m. y las 10:00 a.m.

**Métodos:** citometría de flujo para recuentos absolutos de CD4, CD8 y CD3 e inmunofluorescencia directa (IFD) para CD4 y CD8

**Resultados:** los valores absolutos de CD4/CD3 variaron entre 338 y 1.548, y los de CD8/CD3 entre 800 y 1.119. La relación CD4/CD8 osciló en un amplio rango, entre 0.69 a 2.5. Al comparar ambas técnicas se observó una gran variación en los resultados.

**Conclusiones:** los rangos de variación para CD4/CD3 y CD8/CD3 son muy amplios en la población normal estudiada y son más bajos que los informados en la literatura. No son comparables los valores obtenidos por las técnicas de FACS e IFD.

## Introducción

En los linfocitos T, una de las células efectoras de la respuesta inmune, hay dos grandes marcadores que permiten la subdivisión en dos poblaciones funcionalmente distintas: la molécula CD4 que se expresa en la mayoría de los linfocitos T cooperadores o ayudadores y la molécula CD8, marcador principal de los linfocitos T citolíticos o citotóxicos (1). La medición de linfocitos CD4 y de subpoblaciones de linfocitos ha contribuido de manera muy importante para entender la fisiopatología de la enfermedad por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (1-3), y es requerida por el clínico para un mejor seguimiento de estos pacientes. Varios autores han informado una más rápida progresión de la infección por VIH asintomática a SIDA, cuando existen menos de 200 células CD4 por mm<sup>3</sup> (3). La medición de los CD4 se usa para clasificar la infección, para determinar la elección de protocolos

Luz Mabel Avila, Carmen Patricia Gómez, Ruby Estella Ríos: Laboratorio de Inmunología Clínica Hospital Militar Central; Dr. Ernesto Laverde: Jefe Servicio de Medicina Interna Hospital Militar Central. Santa Fe de Bogotá.

## Valores normales de linfocitos

clínicos de manejo y para monitorear la eficiencia de la terapia antiviral, pues existe correlación entre el número de CD4, la progresión de la infección y la aparición de enfermedades oportunistas y neoplasias. Sin embargo, no todos los informes están de acuerdo con este comportamiento (4).

La tipificación de los linfocitos CD4 y CD8 se realiza actualmente en nuestro medio por la técnica de inmunofluorescencia y el resultado es el producto de la cuenta de leucocitos totales y de la fracción (porcentaje) de linfocitos medidos por técnicas manuales o automatizadas; el resultado se obtiene en porcentaje de marcación con anticuerpos monoclonales unidos al isotiocianato de fluoresceína.

Esta técnica es tediosa e imprecisa, inclusive con anticuerpos monoclonales fluorescentes y microscopios especiales. Además, tiene gran riesgo de contaminación para el profesional de la salud que la ejecuta.

La técnica de citometría de flujo (FACS) (5) permite analizar las propiedades de las células específicas al pasar a través de un orificio a gran velocidad -pudiendo analizar una suspensión celular para diversas medidas en forma simultánea, a la velocidad de casi 5.000 células/sg-, al combinar el disgregador de luz y la medición del volumen *coulter* con los anticuerpos monoclonales, que además pueden identificar de manera simultánea una célula marcándola con dos fluorocromos. El encuentro de la célula con el haz de láser es interpretado por el sistema en forma diferente, estrechamente relacionado con el tamaño celular y con su granularidad. El nivel de cambio

en la luz es una característica particular de cada población de células y la medida de ese valor permite la identificación de cada célula. La molécula fluorescente se une al anticuerpo monoclonal, absorbiendo la luz del láser y por consiguiente emitiendo luz en otra longitud de onda; este fenómeno facilita la identificación de subgrupos específicos dentro de las grandes poblaciones celulares. La posibilidad de analizar grandes números de células en forma cuantitativa y reproducible, aumenta significativamente la confianza y la precisión de los resultados.

Existe una variación circadiana del número de linfocitos CD4 (6), que es más bajo en las mañanas (800 a 1.100) y más alto en las noches (2.200); este fenómeno puede acentuarse por distintas circunstancias, no todas de fácil identificación y control, como el estrés (7-8), el ejercicio (9), los glucocorticoides exógenos, los niveles de cortisol en el suero, las relaciones sexuales y otras (10-13)

Malone y cols (14) estudiaron 16 pacientes con SIDA y 8 individuos normales, a los cuales les tomaron cuatro diferentes muestras de sangre durante tres días, y encontraron una diferencia importante en la cuenta total de CD4 (+) entre las horas de la mañana y la tarde, pero no en el porcentaje de CD4/CD3.

El propósito de este estudio es estandarizar los valores de referencia CD4/CD3 y CD8/CD3 en individuos colombianos sanos por la técnica de FACS, usar estos valores de referencia para el monitoreo de células CD4(+) en pacientes con infección por VIH y comparar la técnica de inmunofluorescencia con la de FACS.

## Material y métodos

### Sujetos

Se estudiaron 100 individuos normales, 60 hombres y 40 mujeres, donantes entre 18 y 45 años de edad, seleccionados en el Banco de Sangre del Hospital Militar Central según criterios de inclusión establecidos (Tabla 1). La toma de la muestra fue realizada entre las ocho y las diez de la mañana.

En todos se midieron los CD4/CD8 por FACS y en 15 también por inmunofluorescencia, con el fin comparar las dos técnicas.

### Métodos

*Citometría de flujo:* se usó el citómetro de flujo Facscount de Becton Dickinson para recuentos absolutos de CD4/CD8/CD3. Se tomaron 5 ml de sangre a cada individuo, con EDTA.

Se adicionaron 50 µl de sangre total a cada tubo CD3/CD4 y CD3/CD8, se incubaron una hora a temperatura ambiente en completa oscuridad.

Se procesaron controles zero, bajo, medio y alto a los cuales se agregó sangre total de un individuo clínicamente sano y se continuó el procedimiento como la muestra.

Se adicionó una solución fijadora (formaldehído) a cada tubo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad.

Previo a cada paso se agitó en el vórtex. Para los controles, una vez cumplido el período de incubación se adicionó:

- CD3/CD4      Control Zero
- CD3/CD8      Control Bajo
- CD3/CD4      Control Medio
- CD3/CD8      Control Alto

Se mezcló y se leyó inmediatamente. Una vez pasados los controles se leen las muestras.

**Inmunofluorescencia directa:**

Separar los linfocitos a partir de 5 a 10 ml de sangre periférica heparinizada, mediante gradiente de Ficoll-Hypaque (d: 1077). Lavar con PBS y resuspender en RPMI + 5% de SBF. Contar el número de células recuperadas por ml en cámara de Neubauer. En cada tubo, como marcadores linfocitarios se vayan a determinar, colocar 1.000.000 de células por tubo. Centrifugar a 1.800 rpm por cinco minutos. Eliminar el sobrenadante y añadir 5µl del anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia correspondiente (Ref. Cirumedics). Incubar durante 30 a 45 minutos a 4°C. Añadir 1 a 2 ml de RPMI + SBF al 5% y centrifugar a 1.800 rpm por cinco minutos. Eliminar el sobrenadante, resuspender cada botón y añadir una gota de RPMI + 5% SBF, resuspender una vez más cada tubo y tomar 5 a 10 µl sobre la lámina. Extender suavemente con una laminilla. Leer en el microscopio de inmunofluorescencia y determinar el 1% de cada subpoblación.

- Cumplir los requisitos para ser donante del banco de sangre, VIH no reactivo, antígeno de hepatitis B y hepatitis C no reactivo, VDRL no reactivo.
- Cuadro hemático normal.
- Ser individuos clínicamente sanos y saludables.
- Estar en condiciones basales.
- No tener relaciones sexuales 24 horas antes de la toma de muestra.
- No estar sometidos a estrés agudo dentro de las 24 horas previas a la toma de muestra.
- No recibir ninguna medicación.

**Tabla 1.** Criterios de inclusión al estudio.

GRUPO	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD4/CD3	CD8/CD3
Total (n=100)	545-2741	338-1548	80-1169	0.69-2.5	0.44-0.71	0.24-0.51
Mujer (n=40)	640-2450 (X=1537)	350-1442 (X=896)	132-980 (X=556)	0.69-2.6 (X=1.6)	0.45-0.72 (X=0.58)	0.23-0.50 (X=0.36)
Hombre (n=60)	521-2903 (X=973)	335-1612 (X=973)	70-1266 (X=668)	0.66-2.5 (X=1.58)	0.43-0.71 (X=0.57)	0.24-0.52 (X=0.38)

**Tabla 2.** Valores de linfocitos CD4, CD8 y relación CD4/CD8 en hombres y mujeres.

**Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó para un intervalo de confianza de 95% y con una distribución normal Z.

**Resultados**

Al analizar un total de 100 individuos clínicamente sanos que

cumplieron los criterios de selección anteriormente mencionados, se obtuvieron valores absolutos de linfocitos CD4/µl entre 338 y 1.548, con una media de 943 y de CD8 entre 80 y 1.169, con una media de 624 (Tabla 2).

La relación de CD4/CD8 en este estudio comprende un rango

Pacientes	Inmunofluorescencia						Citometría de flujo (FACS)					
	No	LEU	CD4	CD8	CD4/CD8	% CD4	% CD8	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	% CD4
61	2415	1086	555	1.95	45	23	1788	1064	593	1.79	60	33
62	1950	702	429	1.63	36	22	1221	778	379	2.05	64	31
63	1870	635	392	1.62	34	21	1449	703	681	1.03	49	47
64	2142	899	514	1.75	42	24	1269	737	423	1.74	58	33
65	2324	860	650	1.32	37	28	1477	938	497	1.89	64	34
66	2990	1166	1076	1.08	39	36	2510	1278	1138	1.12	51	45
67	2231	959	580	1.65	43	26	1450	796	604	1.32	55	42
68	2489	1220	622	1.96	49	25	2087	1225	760	1.61	59	33
69	2128	872	617	1.41	41	29	1545	906	611	1.48	59	40
70	2448	1126	490	2.29	46	20	1817	1224	500	2.45	67	28
71	1800	702	540	1.30	59	30	1282	711	518	1.37	55	40
72	2480	1066	918	1.16	43	37	1931	991	879	1.13	51	46
73	2112	824	401	2.05	39	19	1781	1039	619	1.68	58	35
74	3192	1244	830	1.49	39	26	2048	916	919	1.00	45	45
75	2072	829	932	0.89	40	45	1763	753	861	0.87	43	49

**Tabla 3.** Comparación de los valores de linfocitos CD4, CD8 y de la relación CD4/CD8, por medio de las técnicas de inmunofluorescencia y FACS.

## Valores normales de linfocitos

amplio, que oscila entre 0.69 y 2.5. Al clasificarla según sexo, varía entre 0.69 y 2.6 en hombres y entre 0.66 y 2.5 en mujeres, con medias de 1.6 y 1.58, respectivamente (Tabla 2).

Al comparar la técnica de inmunofluorescencia con la de FACS, se observó una gran variación en los resultados de los valores absolutos de CD4 y CD8 y de la relación de CD4/CD8 (Tabla 3).

### Discusión

Se observó que en individuos normales y clínicamente saludables, la variación de los valores absolutos de linfocitos es muy amplia, con cifras de CD4 entre 338 y 1.612. Este dato podría dar pie para reevaluar el inicio de la terapia antirretroviral en pacientes infectados por VIH, establecida con cifras inferiores a 500 células CD4/ $\mu$ l, pues parece que en nuestra población estos recuentos celulares son más bajos.

Al comparar las dos técnicas utilizadas, FACS e inmunofluorescencia directa, se observó una gran diferencia en los resultados, lo cual nos indica que no deben ser analizados en forma paralela y reafirma la importancia de hacer el monitoreo de los individuos seropositivos así como el seguimiento de quienes reciben terapia antiviral con la técnica de FACS, que presenta más ventajas en cuanto a precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad y que, además, disminuye el índice de riesgo de contaminación para el profesional que la realiza.

Se debe considerar que cada paciente tiene diferentes valores normales, que sólo deben ser

comparados con informes anteriores de él mismo, teniendo en cuenta qué técnica se utilizó previamente para esta cuantificación, ya que no se puede realizar una equivalencia entre las diferentes técnicas.

### Conclusiones

Los rangos de variación de CD4/CD3 y de CD8/CD3 son muy amplios en la población normal colombiana.

No son comparables los valores obtenidos por las técnicas de FACS y de inmunofluorescencia directa.

### Summary

Lymphocytes CD4 and CD8 subpopulations are affected by the HIV infection and their quantification is very valuable for the patient's followup. Normal values vary widely, because of methodological differences. The purpose of this study was to establish normal values for T lymphocytes in healthy Colombian patients and to compare these findings when performed by flow cytometry and immunofluorescence techniques. One hundred healthy adults serologically apt to be blood donors were studied. Absolute values for CD3/CD8 varied between 800 and 1.119 and the relation CD4/CD8 between 0.69 and 2.5. A great variation in the results was found when comparing both techniques. Reference values for our population are lower than those traditionally reported and they must be taken into account to reevaluate the control of HIV infected patients.

### Agradecimientos

A Laboratorios Glaxo e Immunolab por la donación de los reactivos utilizados en este estudio.

### Referencias

1. Brinchmann JE, Vartda F, Thorsby E. T Lymphocyte Subset Changes in Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Acq Imm Synd* 1989; 2: 398-403.
2. McCune JM. HIV-1: the infective process in vivo. *Cell* 1991; 64: 351.
3. Giorgi JV, Fahey JL, Smith DC, Hultin LE, Cheng H, Mitsuyasu RT, Detels R. Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1987; 138: 3725-3730.
4. Castro KG, Valdiserri RO, Curran JW. Perspectives on HIV/AIDS Epidemiology and Prevention from the Eighth International Conference on AIDS. *Am J Public Health* 1992; 82:1465-1470.
5. Landay AL, Auer R, Bach BA, Borowitz M, Civin CI, Duque RE, et al. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of peripheral Blood Lymphocytes. NCCLS Document H42 1992; 12: 1-75.
6. Westermann J, Reinhard P. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today* 1990; 11:406-410.
7. Khansary D, Murgu AJ, Faith RE. Effects on stress on immune system. *Immunol Today* 1990; 11: 170-175.
8. Maisel AS, Knowlton KU, Fowler P, Rearden A, Ziegler MG, Motutsky; HJ, et al. Adrenergic control of circulating-lymphocyte subpopulations. *J Clin Invest* 1990; 85: 462-467.
9. Schawarz L. Immunoregulatory hormones circulating lymphocyte subpopulation before and after endurance exercise of different intensities. *Int Sports Med* 1992; 12: 359-366.
10. Hulstaert F, Hannet L, Denes V, et al. Age related changes in human blood Lymphocyte subpopulations. *Clin Immunol Immunophatol* 1994; 70: 152-158.
11. Romero SMC, Ríos R, Fuentes M, Franco I, Londoño JD, Julio H, Valle R. Estimación de los niveles de poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 en individuos fumadores y no fumadores. *Labimed* 1995; 13: 6-10.
12. Weiss SH, Klein CW, Mayor R, Besra J, Denny TN. Idiopathic CD4+ T Lymphocytopenia. *Lancet* 1992; 340: 608-609.
13. Soriano V, Hewlett I, Heredia A, Pedreira J, Gutiérrez M, Bravo R, Castro A, Gonzalez Lahoz. Idiopathic CD4+ T-Lymphocytopenia. *Lancet* 1992; 340-(Sep): 607-608.
14. Malone JL, Simms TE, Gray GC, Wagner KF, Burge JR, Burke DS. Source of variability in repeat T-Helper lymphocytes counts from immunodeficiency virus type I infected patients. Total lymphocyte count fluctuation diurnal cycle are important. *J Acquired Immun Defic Synd* 1990; 3: 144-151.