

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**"DETERMINACION DE VALORES DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ POR  
CITOMETRIA DE FLUJO EN POBLACION DE DONADORES QUE ACUDEN AL  
BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL GENERAL DE ENFERMEDADES IGSS"**



**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**KARLA MARITZA MEJA BONIFAZI**

**Para optar al título de**

**QUIMICO BIOLOGO**

**Guatemala, septiembre 2000**

DL  
OB  
T(2051)

## **JUNTA DIRECTIVA**

### **FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

<b>DECANA</b>	<b>Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta, MA.</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Lic. Oscar Federico Nave Herrera</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto, PhD.</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda, PhD.</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>Dr. Federico Adolfo Richter Martínez, PhD.</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>Br. César Alfredo Flores López</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>Br. Manuel Aníbal Leal Gómez</b>

## **DEDICATORIA**

**A: Dios y la Virgen María**

**A: Mis padres Francisco Noé Mejía Martínez y Blanca Estela Bonifazi de Mejía**  
Por ser las personas a las que más quiero, respeto y admiro.

**A: Mis hermanas Nancy Karina y Gretel Alexandra**

## AGRADECIMIENTOS

A la Licda. Glenda Escalante de Ramírez, por su asesoría y apoyo brindado en todo momento.

A Becton Dickinson Immunocytometry System, San José California EUA, especialmente al Doctor Renán Acevedo PhD y al Licenciado Cesar Zamora, por la donación de los reactivos.

A UNITRADE medical, Guatemala, especialmente a la Licenciada Melissa Calvo de Knoepffler, por hacerme posible conocer el fascinante mundo de la Citometría de Flujo y por apoyar las gestiones para la donación de los reactivos.

Al Instituto Guatemalteco de Seguridad Social IGSS, en especial a sus autoridades y a las Licenciadas Ely Ocaña Durán Jefa de Laboratorio Clínico, Marlene de Mazariegos Jefa del Banco de Sangre y Aracely Luján Supervisora del Área de Inmunología, por permitirme realizar la parte experimental de este trabajo en las instalaciones de la institución.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por haberme permitido realizar mis aspiraciones profesionales.

Al Dr. Rubén Velásquez, por las oportunas sugerencias durante la redacción del presente trabajo.

## INDICE

Contenido	Página No.
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
2.1 Inmunidad	3
2.2 Diferenciación del sistema linfoide	3
2.2.1 Depósito de células indiferenciadas	3
2.2.2 Tejidos linfoides primarios	3
2.2.3 Tejidos linfoides secundarios	5
2.3 Linfocitos	6
2.3.1 Estructura	6
2.3.2 Heterogeneidad de los linfocitos	7
2.3.2.1 Células B	7
2.3.2.2 Células T	8
2.4 Marcadores de Superficie	9
2.5 Linfocitos CD4+ y CD8+	10
2.5.1 Linfocitos T tipo CD4+	11
2.5.2 Linfocitos T tipo CD8+	12
2.6 Significado clínico	12
2.6.1 Proporciones normales de linfocitos	12
2.6.2 Variaciones debido a factores naturales	13
2.6.3 Relación con enfermedades	14
Linfocitosis	14
Linfopenia	14
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)	14
Etiología	14
Características hematológicas	15
2.7 Otros estudios	15
2.7.1 Valores normales ó de referencia	15
2.8 Metodologías para estudios linfocitarios	16
2.8.1 Generalidades	16
2.9 Citometría de Flujo	17
2.9.1 Fundamentos de la citometría de flujo	17
2.9.2 Fundamentos de los sistemas detectores	18
Dispersión de luz	18
Fluorescencia	19
2.9.3 Componentes de un citómetro de flujo	20
Sistema de inyección de la muestra	20
Cámaras de flujo	20
Fuentes de luz	20
Sistema óptico	20
Detectores	20

Amplificador/Convertidor	20
Presentación de los datos	21
Sistema informático	22
2.9.4 Fundamentos del separador de células	22
Separación mediante métodos mecánicos	22
Separación mediante métodos electrostáticos	23
2.9.5 Compuestos fluorescentes más utilizados en citometría de flujo	23
2.9.6 Compensación de fluorescencias	24
2.9.7 Preparación de las muestras	24
2.9.8 Anticuerpos	27
Anticuerpos policlonales	27
Anticuerpos monoclonales	28
2.9.9 Parámetros de eficacia de los citómetros de flujo	29
Sensibilidad	29
Resolución	29
Velocidad de medida	29
2.9.10 Garantía de la calidad	30
Calibración	30
Estandarización	30
<b>3. Justificación</b>	<b>31</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>32</b>
<b>5. Hipotesis</b>	<b>33</b>
<b>6. Materiales y Métodos</b>	<b>34</b>
6.1 Universo de trabajo	34
6.2 Muestra	34
6.3 Medios	34
6.3.1 Recursos Humanos	34
6.3.2 Recursos Institucionales	34
6.3.3 Recursos Materiales	34
6.4 Procedimiento	35
6.4.1 Diseño de la investigación	35
6.4.2 Procedimiento	36
6.4.3 Citometría de flujo	37
6.4.4 Tabulación de Resultados	38
6.4.5 Análisis de Resultados	38
<b>7. Resultados</b>	<b>39</b>
<b>8. Discusión de resultados</b>	<b>41</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>10. Recomendaciones</b>	<b>48</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>49</b>
<b>12. Anexos</b>	<b>52</b>

## RESUMEN

La determinación de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ es importante para conocer el estado inmunológico de un paciente, realizar pronósticos del desarrollo de una enfermedad y decidir terapias. Estas subpoblaciones pueden variar de acuerdo a edad, sexo y raza, por lo que se recomienda que cada laboratorio establezca sus valores de referencia en personas sanas, o que al menos, se tenga referencia de una población similar.

La citometría de flujo es un método moderno que permite el estudio de células sanguíneas, esta técnica permite la inmunofenotipificación de los linfocitos, con alto grado de especificidad, sensibilidad, precisión y reproducibilidad.

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar por medio de citometría de flujo, los valores para el inmunofenotipo de linfocitos CD4+ y CD8+ en una población de donadores que acudieron al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS zona 9.

Se estudió un total de 70 muestras de personas comprendidas entre 19 y 45 años ( $29.8 \pm 7.1$ ), 35 hombres entre 19 y 42 años ( $27.4 \pm 5.8$ ) y 35 mujeres entre 20 y 45 años ( $32.2 \pm 7.5$ ). La población estudiada corresponde a un grupo de adultos jóvenes sanos, representativo de la población mestiza de Guatemala.

Los resultados de la determinación de linfocitos (cel/ul) CD4+, CD8+ y la relación CD4+/CD8+ para el total del grupo muestreado fueron de  $897 \pm 246$ ,  $602 \pm 235$  y  $1.7 \pm 0.6$ , respectivamente. El valor para linfocitos CD4+ en hombres fue de  $841 \pm 197$ , en mujeres de  $953 \pm 274$ ; para CD8+ en hombres  $637 \pm 267$ , mujeres  $568 \pm 192$ . El valor de la relación CD4+/CD8+ fue mayor para mujeres que para hombres ( $P \leq 0.014$ ), mientras que no existió diferencia significativa en los valores de linfocitos CD4+ ( $P \leq 0.091$ ) y CD8+ ( $P \leq 0.180$ ).

Los resultados de este estudio se compararon con valores reportados en la literatura para mexicanos, caucásicos y árabes, estableciéndose que existe un entrecruzamiento claro en los valores de porcentaje CD4+ entre guatemaltecos y mexicanos. Para los valores de porcentaje CD8+ y la relación CD4+/CD8+ no existe entrecruzamiento entre los guatemaltecos y el resto de poblaciones.

Se recomienda que los valores reportados en este trabajo sean adoptados por el Laboratorio Clínico del Hospital General de Enfermedades IGSS como valores de referencia del mismo y que sean utilizados como base de comparación para la evaluación clínica y el diagnóstico de pacientes guatemaltecos.

## I INTRODUCCION

Los leucocitos presentan una gran cantidad de moléculas marcadoras en su superficie, algunas de las cuales aparecen momentáneamente en etapas particulares de la diferenciación o de la activación celular. Estos antígenos marcadores se nombran mediante la nomenclatura CD (Cluster of Differentiation o grupo de diferenciación) e identifican a subpoblaciones específicas de linfocitos. Los marcadores CD4 y CD8 son de particular importancia porque están presentes en los linfocitos T colaboradores/inductores (CD4+), caracterizados por la restricción de HLA de clase II, y en los linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8+), caracterizados por restricción HLA de clase I (1,2).

Los antígenos de superficie pueden usarse para distinguir a las diferentes poblaciones celulares y muchos de ellos pueden ser identificados por medio de anticuerpos monoclonales específicos. El desarrollo de estos anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos, y que pueden ser analizados por medio de citometría de flujo, ha revolucionado y propiciado grandes avances en el análisis de diferentes subpoblaciones de linfocitos. Así, la citometría de flujo ha emergido como una herramienta importante y poderosa en la identificación de diferentes poblaciones celulares (1,2).

La citometría de flujo es un método moderno que estudia las propiedades físicas y biológicas de las células (granularidad y tamaño). Las células en suspensión de sangre completa o fluidos corporales son marcadas con un anticuerpo monoclonal fluorescente y se hacen pasar por una zona de detección, la cual es iluminada por un rayo láser. La energía excita al fluorocromo unido a la célula; en este momento la intensidad de la luz es medida por varias fotoceldas y el resultado de las señales eléctricas son amplificadas y transmitidas a una computadora para su procesamiento, almacenaje y análisis (3).

La citometría de flujo permite el análisis de grandes cantidades de células. Algunas de sus aplicaciones clínicas son: análisis de subpoblaciones de linfocitos, análisis de ADN, diagnóstico de leucemias y linfomas, detección y cuantificación de células neoplásicas, interleucinas y apoptosis (3).

La técnica de citometría de flujo fue introducida en Guatemala hace aproximadamente dos años. Los factores que han determinado esta introducción tardía son el costo elevado del equipo y de los reactivos, así como la necesidad de recurso humano altamente especializado. Por lo menos en dos laboratorios nacionales se realizan análisis de rutina utilizando esta tecnología y para la comparación de resultados se emplean valores de referencia y valores considerados normales en Estados Unidos, por lo que no se tiene certeza de que estos tengan validez para comparar resultados de pacientes guatemaltecos con una composición genética, nutricional y ambiental distinta a las poblaciones mencionadas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar por medio de citometría de flujo, valores para el inmunofenotipo de linfocitos CD4+ y CD8+ en donadores que acuden al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS zona 9.



## II ANTECEDENTES

### 2.1 Inmunidad

El término inmunidad denota un estado de resistencia o tolerancia específica a la acción de un agente patógeno, que penetró en el organismo de modo previo. Las respuestas inmunitarias conllevan la participación de células vivas. Las células que intervienen en éstas respuestas son las denominadas leucocitos o glóbulos blancos; toman parte en diversas reacciones inflamatorias, de naturaleza inmunitaria o no inmunitaria, y están presentes en gran número en ciertos órganos (linfoides), y en menor cantidad en el estroma de otros y en la sangre. Algunos tipos de leucocitos están presentes en la sangre y los tejidos (4).

### 2.2 Diferenciación del sistema linfoide

El desarrollo del sistema linfoide se debe considerar en relación con tres compartimientos. El primero, o depósito de células indiferenciadas, es una fuente de células linfoides ancestrales capaces de proliferar abundantemente y madurar hacia células competentes desde el punto de vista funcional. El segundo, o tejidos linfoides "primarios", controla el desarrollo de las células linfoides y es asiento de una intensa linfopoyesis, independiente del antígeno. El tercer compartimiento está compuesto por tejido linfoide, como los ganglios linfáticos y la pulpa blanca esplénica. Estos tejidos están formados por una mezcla de linfocitos T y B, bien diferenciados (5).

#### 2.2.1 Depósito de células indiferenciadas:

Las células de la médula ósea (células madre) son precursoras morfológicamente reconocibles de los linfocitos, así como de los granulocitos, células eritroides y plaquetas. También existe un menor número de células que dan origen a los monocitos, macrófagos, células endoteliales y células plasmáticas (6).

Las células madre son las que pueden reproducirse y dar origen a células más diferenciadas, que morfológicamente no pueden identificarse como células madre, aunque se considera que pertenecen a los linfocitos de tamaño pequeño o intermedio (Figura No. 1) (6).

#### 2.2.2 Tejidos linfoides primarios:

Durante la vida fetal se originan precursores de linfocitos en médula ósea, los cuales están influidos o programados para realizar cierta función por uno de los órganos linfoides primarios, el timo para los linfocitos T (células T) o el "equivalente" bursiforme: para los linfocitos B (células B) (6).

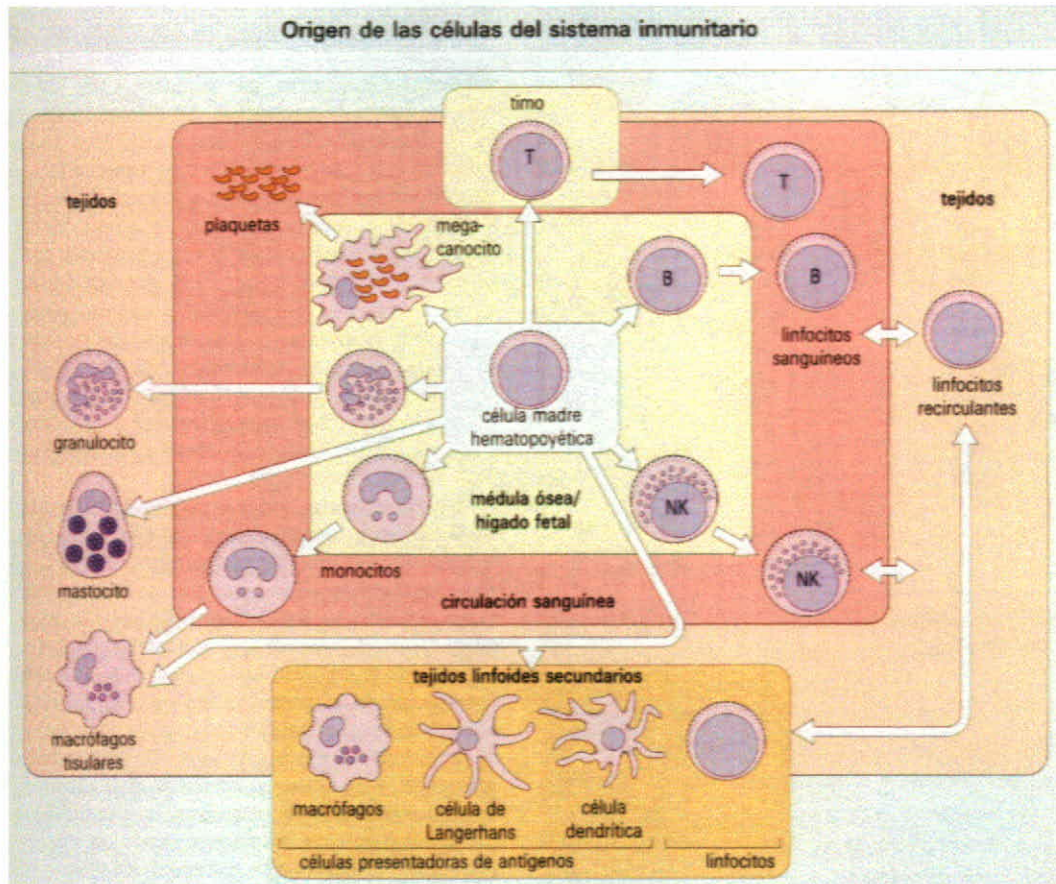


Figura No. 1. Esquema que representa el origen de la células, tanto en médula ósea como en la circulación sanguínea (29).

El microambiente del timo es necesario para la diferenciación de las células T. Los protimocitos migran desde la médula ósea o el hígado fetal hasta el timo, donde son procesados a células T funcionalmente maduras para circular en la sangre hasta los tejidos linfoides periféricos o secundarios. A medida que las células tímicas maduran, adquieren y pierden algunos antígenos de membrana, que pueden ser reconocidos por diversos anticuerpos monoclonales. A medida que las células tímicas se diferencian, migran desde la corteza subcapsular hasta la corteza interna, la médula y finalmente, la sangre periférica y los tejidos linfoides secundarios. Los protimocitos y esencialmente todos los timocitos poseen una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT). Sin embargo, a medida que los timocitos maduran, esta enzima se reduce y no se expresa en las células T de sangre periférica (6).

La activación de las células T se produce mediante dos vías separadas. La vía de la célula T antígeno-independiente se produce a través de la unión de moléculas CD2 y produce como resultado la liberación de interleucina 1 e interleucina 2 y la proliferación de diferenciación de células inmaduras T en el timo. La vía de la célula

T antígeno-dependiente se produce a través de la unión de CD3/Ti y el antígeno con la adecuada interacción del antígeno MHC II de los macrófagos y/o de las células B. Esto produce como resultado la liberación de interleucina 1 por parte de los macrófagos activados, que a su vez conduce a la formación de receptores de interleucina 2 en las células T y a la síntesis y liberación subsiguientes de interleucina 2 por estas células T activadas. Estos acontecimientos incluyen la activación y maduración de las células T colaboradoras, T supresoras, T citotóxicas y otras células inmunorreguladoras (6).

### 2.2.3 Tejidos linfoides secundarios:

En las últimas etapas fetales y durante la vida posnatal, los linfocitos son producidos por el tejido linfoide secundario: bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide intestinal. Los linfocitos de los órganos linfoides secundarios constituyen la progenie derivada de las células madre influidas por los órganos linfoides primarios. Los órganos linfoides secundarios están, por tanto, compuestos por una mezcla de células B y T. La linfopoyesis en los órganos linfoides secundarios depende exclusivamente de la estimulación antigénica. Las células B y T tienden a localizarse en partes anatómicamente diferentes del tejido linfoide, en donde puede tener lugar su proliferación (Figura No. 2) (6).

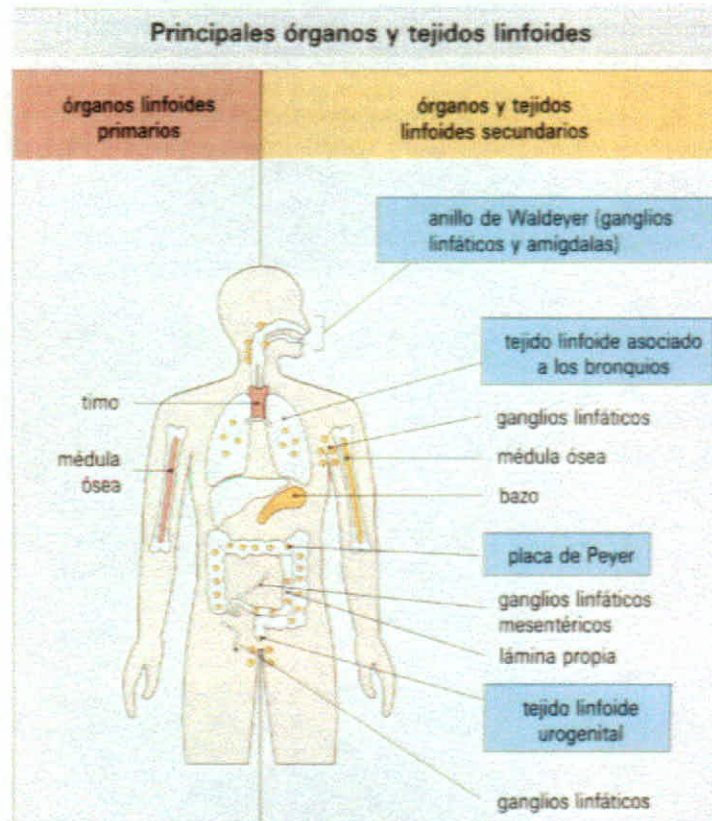


Figura No. 2. Representación esquemática de dos de los tres compartimentos de la diferenciación del sistema linfoide, tejidos linfoides primarios y secundarios (29).

## 2.3 Linfocitos

Son células primordiales en la inmunidad adquirida, circulan en la sangre y en la linfa y se alojan en tejidos y órganos especialmente dispuestos para ello, que pueden dividirse en tejidos linfoides "primarios" y "secundarios". Los tejidos linfoides primarios comprenden el timo y la médula ósea, son necesarios para el desarrollo de otros tejidos linfoides (secundarios), como los del bazo, el tubo gastrointestinal y los ganglios linfáticos. La plena expresión del desarrollo y de la función linfocitarias depende de interacciones celulares de los linfocitos entre sí y con otras células (Figura No. 3) (5).

Estas células son responsables de la inmunidad celular, constituyen importantes moduladores de la inmunidad humoral y actúan con los macrófagos en la presentación de los antígenos a los linfocitos B. Las células T constituyen el 70 por ciento, o más, de los linfocitos en sangre periférica (5).

### 2.3.1 Estructura:

Los linfocitos tienen un diámetro de 8 a 12  $\mu\text{m}$ , similar al de otros leucocitos, su aspecto es engañosamente homogéneo, de forma redonda y contornos generalmente regulares. El núcleo contiene cúmulos de cromatina densamente comprimida, el citoplasma tiene aspecto suave, con escasos organelos subcelulares. Sin embargo, los linfocitos activados son relativamente grandes y contienen abundantes organelos citoplasmáticos (5).

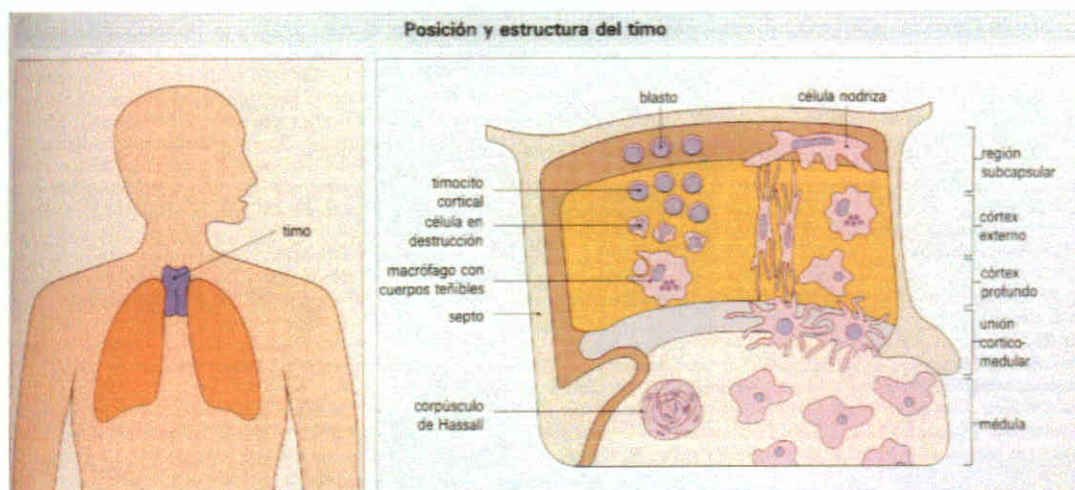


Figura No. 3. Ubicación y estructura del timo. Se muestra el tejido linfoides primario necesario para el desarrollo de las células responsables de la inmunidad celular (29).

Las células plasmáticas se consideran como los linfocitos más plenamente diferenciados, capaces de sintetizar grandes cantidades de inmunoglobulinas. El núcleo está dispuesto excéntricamente en la célula y tiene forma redonda, excepto una pequeña muesca en la que se aloja el aparato de Golgi. La cromatina nuclear se tiñe intensamente y está dispuesta típicamente de forma semejante a los radios de una rueda (5).

Las superficies celulares linfocitarias poseen características que las hace idóneas para las interacciones con otras células, así como con moléculas que son necesarias para el pleno desarrollo de las funciones celulares. La combinación de los efectos producidos por la superficie celular y por las estructuras subyacentes a ésta, es reponsable de la característica modulación de las superficies celulares al contacto con los estimuladores extracelulares. La expresión de los receptores superficiales celulares varía en los diferentes linfocitos, tanto cualitativa como cuantitativamente. Los receptores de la superficie celular reflejan el origen de la célula, su grado de diferenciación y su estado de activación, las características específicas de las superficies linfocitarias guardan relación con sus funciones (5).

### 2.3.2 Heterogeneidad de los linfocitos:

Los linfocitos sirven de mediadores en todas las facetas de la respuesta inmunitaria; sin embargo, no todos ellos participan en todos los estadios de estas respuestas y en todas las ocasiones. La separación más amplia de los compartimientos linfocitarios en los mamíferos es la que se lleva a cabo al designar una porción dependiente de la médula ósea (células B), que participa en las respuestas inmunitarias caracterizadas por la síntesis y secreción de anticuerpos, Inmunidad Humoral, y otra porción dependiente del timo (células T), que interviene en las respuestas en las que no participan anticuerpos, Inmunidad Celular. Para que las respuestas inmunitarias se puedan expresar plenamente son necesarias acciones mutuas entre las células T y B así mismo subseries de las células T contribuyen decisivamente para regularla (5).

La mayoría de los linfocitos de la circulación son células T que tienen un promedio de vida de meses a años. Las células B constituyen una población minoritaria (de 10 a 20 por ciento de los linfocitos), probablemente tienen una vida breve que se mide en días, y se distinguen por una cantidad considerable de inmunoglobulinas sobre las superficies de sus membranas (5).

**2.3.2.1 Células B:** Estas células se distinguen por su capacidad para sintetizar y liberar inmunoglobulinas. Poseen en general inmunoglobulinas fácilmente detectable (Igs) sobre la membrana celular y componen entre el 4 a 20 por ciento de los linfocitos circulantes. Cada célula B produce generalmente una sola clase (isotipo) de inmunoglobulina con un alto grado de especificidad (idiotipo) para un determinado antígeno; esta especificidad antigénica se refleja en las inmunoglobulinas de la superficie celular. Las células B

conservan su capacidad para cambiar de isotipos inmunoglobulínicos, al tiempo que conservan su especificidad idiotípica (6).

2.3.2.2 **Células T:** Estas células son responsables de la inmunidad celular, constituyen importantes moduladores de la inmunidad humoral y actúan con los macrófagos en la presentación de los antígenos a los linfocitos B. Las células T constituyen el 70 por ciento o más de los linfocitos en sangre periférica (Figura No. 4) (6).

La superficie de los linfocitos T ha sido objeto de intensos estudios mediante anticuerpos monoclonales, en base a los cuales agruparon las actividades de estos anticuerpos en "cúmulos de diferenciación" (CD del inglés *Clusters of Differentiation*), cada anticuerpo se consideraba separadamente. Actualmente se han identificado las estructuras y funciones de ciertos grupos CD, los cuales se describen en una sección posterior, así como los anticuerpos monoclonales que los definen, los tamaños moleculares y las funciones (5).

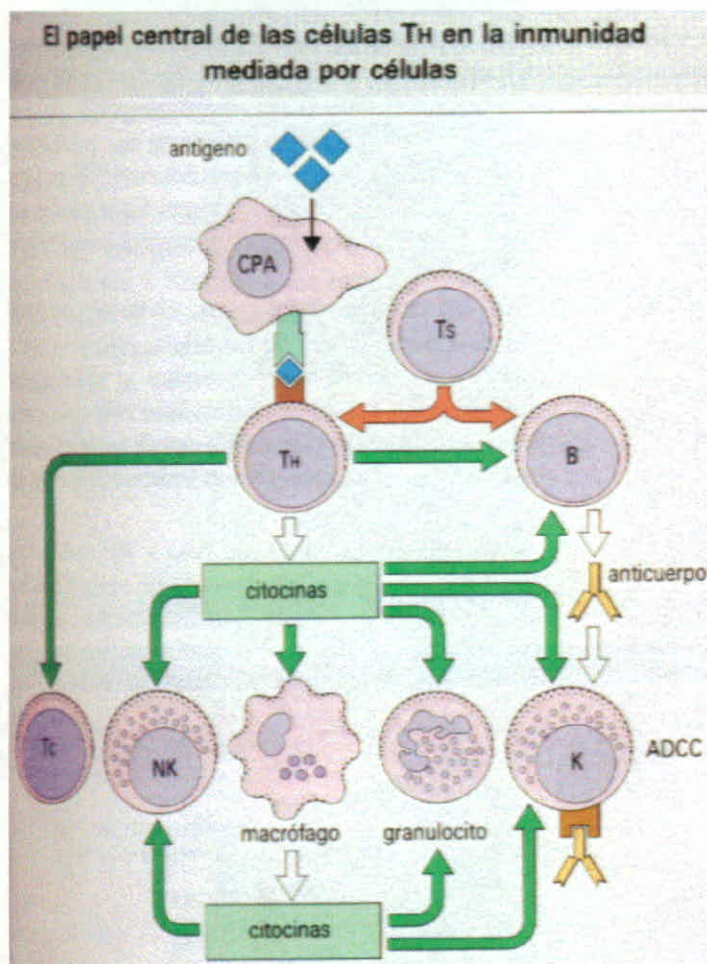


Figura No. 4. Diagrama del papel principal de las células T ayudadoras, como moduladoras de la inmunidad humoral y en la presentación del antígeno a los linfocitos B (29).

Las funciones de las células T son diversas e incluyen la modulación de la inmunidad humoral, el reconocimiento de los antígenos y la citotoxicidad. En diferentes casos, los subgrupos de células T que poseen estas funciones pueden identificarse por los grupos CD que se reconocen en su superficie celular (5).

Las células T y su progenie funcionan en los procesos de inmunidad celular, que incluyen hipersensibilidad retardada, rechazo de trasplante, reacciones de injerto contra huésped, defensa contra los organismos intracelulares y probablemente defensa contra las neoplasias. Las células B y su progenie participan en la inmunidad humoral o en la producción de anticuerpos, como linfocitos o después de su transformación en una célula plasmática (6).

## 2.4 Marcadores de Superficie

La superficie de los linfocitos T ha sido objeto de intensos estudios mediante anticuerpos monoclonales. En 1983 se realizó la primera mesa de trabajo sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos en la que estableció una nueva nomenclatura para tipos y subtipos celulares definidos inmunológicamente. En esta se agrupan las actividades de estos anticuerpos en cúmulos ó grupos de diferenciación (CD, por *clusters of differentiation*). En 1989, la cuarta mesa de trabajo redefinió y expandió esta nomenclatura, en la que se han identificado las estructuras y funciones de ciertos grupos CD (Figura No. 5) (5,7).

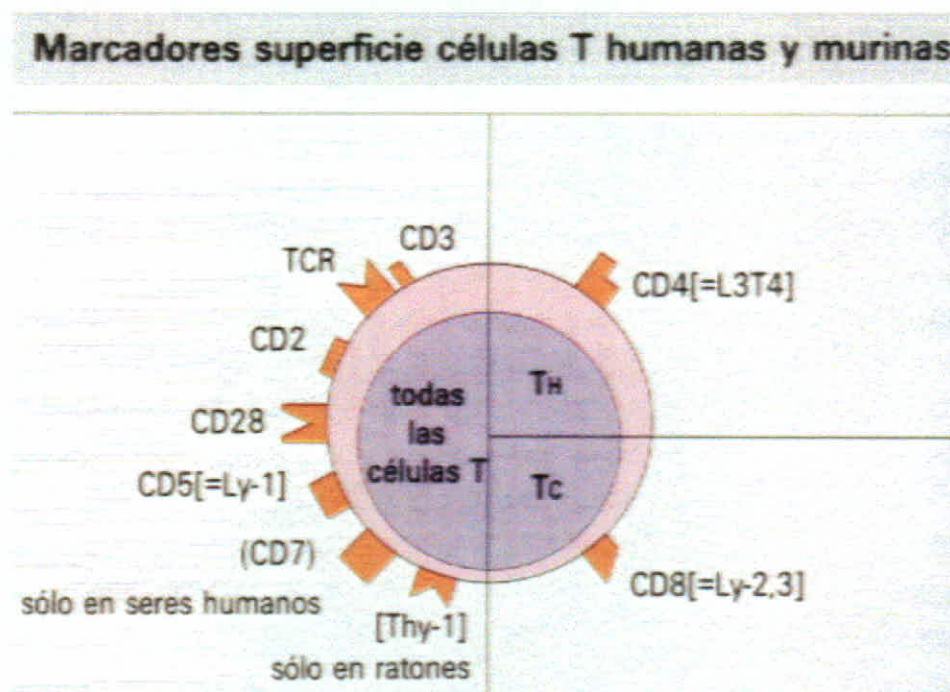


Figura No. 5. Esquema de la superficie de un linfocito, donde se observa la expresión de los diferentes antígenos de membrana (29).

En la ontogenia de las células T se han reconocido tres estadios de maduración. En el primer estadio se expresan los antígenos CD7, CD2 y CD45. En el segundo estadio se observan en las células tímicas los antígenos CD1, CD3, CD4, CD5, CD8 y HLA. Al final de este estadio, las células tímicas empiezan a separarse en poblaciones CD4+ y CD8+. En el tercer estadio se completa la separación y se forman dos poblaciones de células T maduras diferentes, CD4+ (colaboradoras/inductoras) y CD8+ (supresoras/citotóxicas) (6).

Existen subseries de linfocitos T para las cuales se han identificado claramente correlaciones funcionales. Las células CD4+ modulan la inmunidad humoral como células cooperadoras; estabilizan la unión del antígeno mediante su interacción con moléculas de clase II. En cambio, la supresión de la inmunidad humoral está relacionada con las células CD8+. Una subserie de estas células T es también citotóxica. La complejidad del control dentro del sistema inmunitario queda ilustrada por el hecho de que se requieran células auxiliares para la generación de las células CD8+ (Figura No. 6) (5).

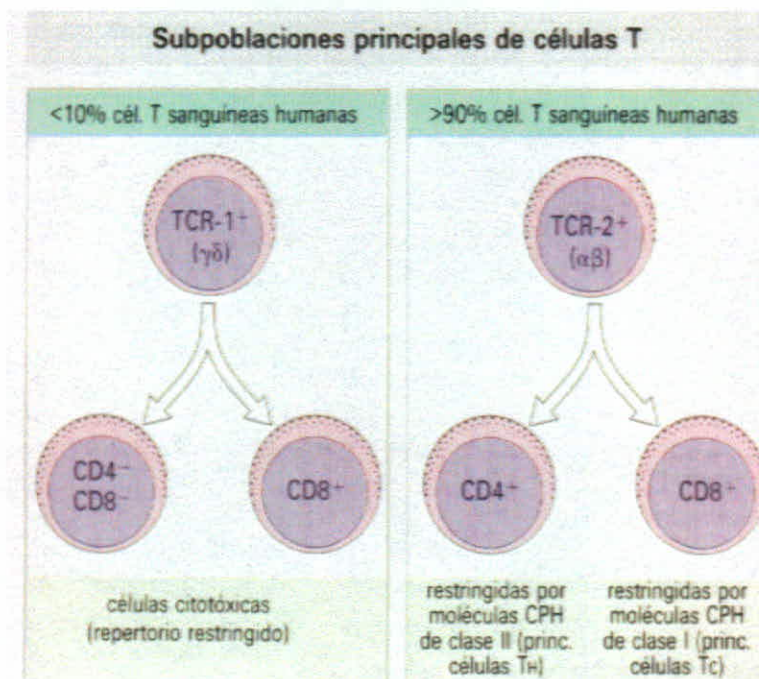


Figura No. 6. Subpoblaciones de linfocitos T, las cuales empiezan a separarse en subseries CD4+ y CD8+ (29).

## 2.5 Linfocitos CD4+ y CD8+

Existen subseries de linfocitos T para las cuales se han identificado claramente correlaciones funcionales. De entre todas estas subseries, las que poseen quizá mayor importancia biológica son aquellas que tienen marcadores CD4, pero carecen de CD8 (linfocitos CD4+), así como las células T que poseen las características superficiales contrarias (linfocitos CD8+) (5,8).



### 2.5.1 Linfocitos T tipo CD4+:

Los linfocitos T tipo CD4+ (linfocitos CD4+) forman el subgrupo denominado células colaboradoras tipo T o colaboradoras/inductoras ( $T_H$  o  $T_{H/1}$ ), debido a su capacidad para incrementar respuestas que llevan a cabo las células T tipo CD8+. Bajo ciertas circunstancias, las células CD4+, también pueden mediar la citotoxicidad y la supresión inmunitaria. Los linfocitos CD4+, por lo general, reconocen antígenos peptídicos que están unidos a las glucoproteínas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Después de la exposición al complejo péptido-MHC, las células CD4+ se activan y proliferan (8).

Las células CD4+ activadas, secretan factores solubles que influyen las funciones efectoras mediadas por otros leucocitos. Por ejemplo, las células CD4+ estimuladas por el antígeno secretan IL-2, lo que a su vez sirve como factor de crecimiento de otras células T en su proliferación policlonal independiente del antígeno, e incrementan la actividad citotóxica mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) y las células asesinas naturales (NK). La IL-4, también secretada por células T activadas por los antígenos, incrementa el crecimiento de las células B y otras células T, aumenta la función CTL e induce la expresión de receptores Fc para la IgE sobre las células B y los monocitos (Figura No. 7) (8).

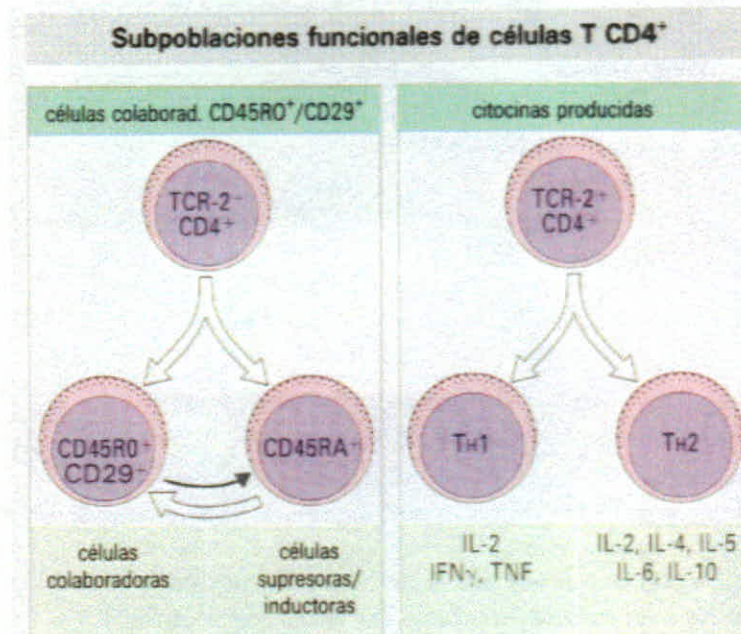


Figura No. 7. Esquema del papel central de la subserie CD4+, la cual está restringida por la molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II (29).

### 2.5.2 Linfocitos T tipo CD8+:

Las células CD8+ son mediadoras de la mayor parte de la citotoxicidad específica para el antígeno y capacidad para matar otras células que se toman como ajenas, como por ejemplo células infectadas por virus o células alogénicas introducidas al receptor mediante trasplante. Las células CD8+ reconocen los antígenos peptídicos unidos a las moléculas clase I del MHC sobre la superficie del blanco. Durante la infección viral, los péptidos virales se unen a moléculas MHC dentro del citoplasma de la célula en diana infectada por virus y se transportan a la superficie celular para el reconocimiento de los CTL. En el trasplante, las moléculas alogénicas MHC son, a su vez, reconocidas como antígenos por los CTL. Los CTL activados destruyen la célula blanco mediante un proceso que aún no está bien definido (8).

Como consecuencia de la activación, los CD8+ también liberan linfocinas, que pueden incrementar las respuestas inmunitarias por otros linfocitos T y B. Aparte de su función citotóxica, los CD8+ pueden suprimir las respuestas inmunitarias, quizá por la liberación de factores solubles que interfieren con la función de otras células inmunitarias. Debido a estas funciones, la población de células CD8+ a menudo se denomina como subgrupo de célula T citotóxicas/supresoras (T<sub>C</sub>/s) (8).

## 2.6 Significado clínico

El número de linfocitos en la sangre periférica refleja el estado inmunitario de un individuo. La valoración de estos parámetros inmunológicos puede estar clínicamente indicada en los siguientes casos: inmunodeficiencia primaria, malignopatías hematológicas, enfermedades infecciosas de causa desconocida, enfermedades autoinmunes, fase subsiguiente al trasplante de diversos órganos y estados de inmunodeficiencia secundaria, tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). También puede ser recomendable la valoración de las subseries linfocitarias cuando existen anomalías de ciertas pruebas de laboratorio tales como aumento o disminución de las cifras linfocitarias, serología positiva para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hipogammaglobulinemia o presencia de inmunoglobulinas monoclonales (Figura No. 8) (9,10).

### 2.6.1 Proporciones normales de linfocitos:

En los individuos normales, el número absoluto de linfocitos y de células T alcanza su valor máximo poco después del parto. En este momento, los linfocitos representan aproximadamente el 90 por ciento de todos los leucocitos. Durante los primeros 3 a 7 días de vida se produce un ligero descenso del número de linfocitos; sin embargo, durante la segunda semana de vida, el recuento recupera el nivel de después del parto. La función inmunológica en el recién nacido es comparable a la de los adultos normales (9).

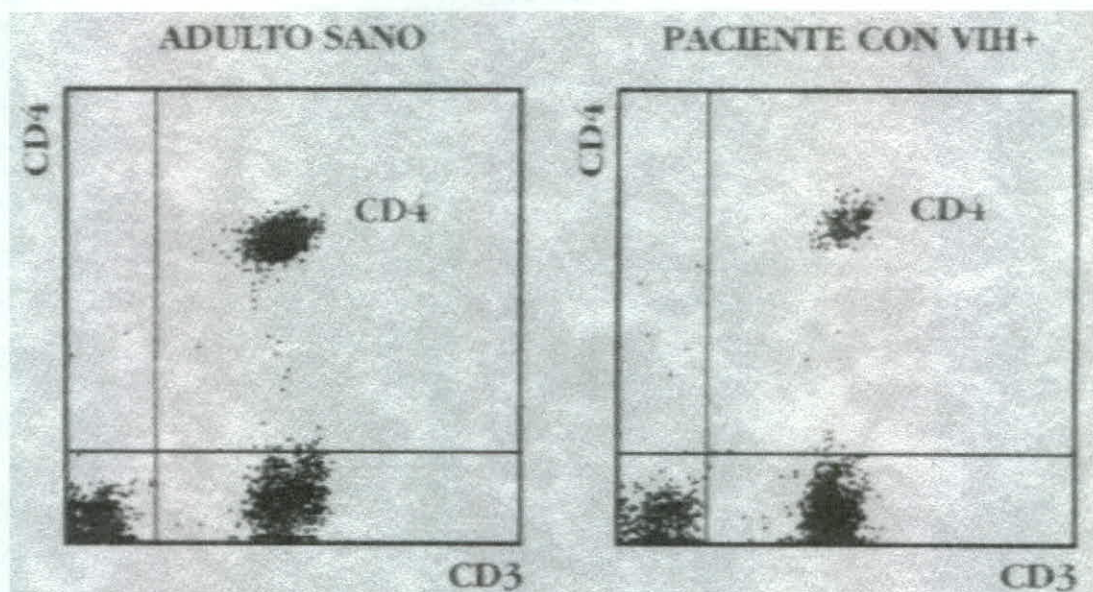


Figura No. 8. Subpoblaciones de linfocitos CD4+, en un paciente VIH+ (derecha) donde se observa una disminución de las células T colaboradoras, en comparación con una persona sana (izquierda) (10).

## 2.6.2 Variaciones debido a factores naturales:

Durante la primera década de la vida, el recuento absoluto de linfocitos y el número absoluto de células T disminuyen, aunque se mantienen por encima de los valores observados en el adulto. Al llegar la adolescencia se han nivelado a los valores observados durante toda la etapa adulta. El número absoluto de linfocitos B se mantiene estable durante todas las fases de la vida. En la adolescencia y etapa adulta, los linfocitos constituyen del 20 al 40 por ciento de todos los leucocitos, lo que equivale a  $1.5$  a  $4 \times 10^9$  células por litro (9).

Existe cierto desacuerdo respecto al número de linfocitos y células T en personas de edad avanzada. Aunque algunos estudios (Díaz-Jouanen, 1975; Smith, 1974) indican que se produce una disminución del número total de células T y de linfocitos, otros investigadores no han encontrado ninguna variación significativa en la cifra total de linfocitos o células T en personas de edad avanzada (Davey, 1977; Weksler, 1974). El cociente CD4/CD8 (células T colaboradoras/T supresoras) suele ser de 2, con unos límites de 1.5 a 3. Con respecto a los subgrupos de linfocitos T en el neonato, los resultados son dispares. En comparación con la sangre adulta, el número de células T totales y de células T CD8+ puede ser idéntico o estar disminuido, mientras el de las células T CD4+ puede ser idéntico o estar aumentado (9,11).

### 2.6.3 Relación con enfermedades:

**Linfocitosis:** La linfocitosis indica un aumento del número de linfocitos en la sangre periférica. En el niño los intervalos de referencia son  $1.5$  a  $4 * 10^9 / l$ . Diversas alteraciones se caracterizan por linfocitosis relativa (un incremento en el porcentaje de linfocitos), lo cual es especialmente destacable en los trastornos con neutropenia. Entre estas alteraciones están: linfocitosis infecciosa, tos ferina, linfocitosis crónica, linfocitosis transitoria de células T asociada al virus linfotrópico T humano tipo I (HTLV-1), mononucleosis infecciosa, infección por citomegalovirus, toxoplasmosis, entre otras (9).

**Linfopenia:** Se habla de linfopenia cuando el recuento absoluto de linfocitos está por debajo de  $1.5 * 10^9 / l$  en adultos y por debajo de  $3 * 10^9 / l$  en niños. Numerosos trastornos por déficit inmunitario, determinados genéticamente, presentan linfocitopenia junto con otros defectos inmunológicos de tipo tumoral o celular. La linfocitopenia en estos trastornos se debe a deficiencia de linfopoyesis. El aumento de niveles de hormonas corticosteroides, la administración de quimioterapias o la irradiación pueden producir linfocitopenia. Las dificultades de drenaje de los linfáticos intestinales, con pérdida de linfocitos en los intestinos por numerosas causas, se han considerado implicadas en el mecanismo de la linfocitopenia. En los casos avanzados de linfomas no hodgkinianos y de linfoma de Hodgkin, así como en casos terminales de carcinoma, a menudo se observa linfocitopenia (9).

**Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA):** Suele ser una afección infecciosa progresivamente letal, con alteraciones clínicas, hematológicas y serológicas características (12,13).

**Etiología:** El SIDA es un trastorno secundario a una infección por el virus 1 de la inmunodeficiencia humana (VIH 1), un retrovirus RNA que es citotrópico para las células T CD4+ y para los macrófagos. La infección se disemina a través de la contaminación por secreciones, excreciones, sangre y tejidos que contengan el virus. Dado el efecto citotrópico de este virus para las células CD4+, existe una notable disminución del número de células T colaboradoras y un desequilibrio respecto las células T supresoras/citotóxicas en sangre y en los tejidos linfáticos del organismo. Como resultado, se produce una profunda depresión de la inmunidad celular, caracterizada por infecciones debidas a diversos microorganismos oportunistas. Inicialmente, las células B no están afectadas y los niveles de inmunoglobulinas son normales o están aumentados. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, existe una frecuencia incrementada de linfoma no hodgkiniano, más a menudo de tipo B (Figura No. 9) (12).

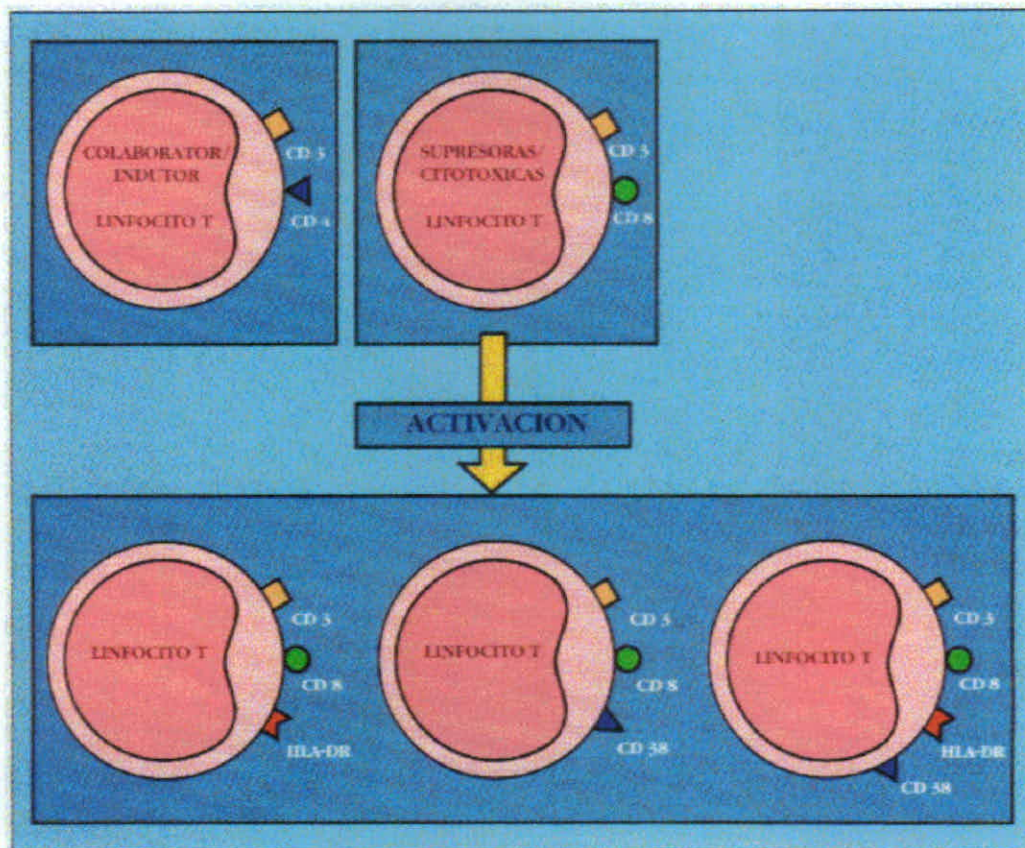


Figura No. 9. Subpoblaciones de linfocitos T, coexpresados en la activación por infección de VIH (10).

**Características hematológicas:** La anomalía hematológica más común en pacientes con SIDA es la anemia crónica y la linfopenia (80-85 por ciento de casos), sobre todo del subgrupo T colaborador/inductor (CD4). La trombocitopenia se produce en el 30 por ciento de casos y la neutropenia, en el 40 por ciento, a menudo con desviación a la izquierda. La primera suele estar mediada por mecanismos inmunes (12).

## 2.7 Otros estudios

### 2.7.1 Valores normales o de referencia:

En Guatemala se reporta un solo estudio de subpoblaciones de leucocitos, realizado en una población no sana y con una metodología distinta a la citometría de flujo. En 1,994, Castro realizó la determinación cuantitativa de linfocitos CD4+ en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) por medio de inmunofluorescencia, donde determinó los recuentos de linfocitos CD4+ en 40

pacientes VIH positivo, obteniendo una media de 1,084 linfocitos CD4+/mm cúbico (rango de 752 a 1,706 linfocitos/mm cúbico) sin embargo la técnica utilizada consume mucho tiempo y puede ser causa de grandes errores humanos (3).

A nivel internacional existen varios estudios acerca de valores normales de subpoblaciones de linfocitos en pacientes sanos por medio de citometría de flujo entre los que podemos mencionar el realizado por Larrea y colaboradores en 1,998, del Hospital de Valencia, España, en el que se obtuvieron recuentos de CD4+ y CD8+ por citometría de flujo en 100 muestras de sangre periférica de donadores observando que no hay diferencias significativas respecto a edad, sexo y origen; además establecieron rangos de referencia para su laboratorio (14). En México, en el estudio de Ortíz y colaboradores, en 1,999 se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes sanos, por medio de citometría de flujo, obteniéndose los valores de CD3+ ( $66.9 \pm 6.2$ ; 55 a 79 por ciento), CD4+ ( $37.8 \pm 4.7$ ; 29 a 47 por ciento), CD8+ ( $32.4 \pm 5.9$ ; 21 a 44 por ciento) y la relación CD4+/CD8+ ( $1.2 \pm 0.3$ ; 0.7 a 2.0 por ciento) en 25 hombres y 25 mujeres sanos entre 20 a 30 años de edad, obteniéndose diferencias significativas entre valores de CD3+ y CD4+ con relación a los publicados para caucásicos y árabes, lo que apoya la observación de que la raza es una variable biológica que influye en la distribución de las diferentes poblaciones de linfocitos. Así mismo, observaron diferencias entre hombres y mujeres en los porcentajes de linfocitos T (CD3+); obteniéndose porcentajes mayores en las mujeres (1,15). En estudios más extensos, como el realizado en Italia por Santagostino y colaboradores en 1,999, se determinaron rangos de referencia de subpoblaciones de leucocitos; en este trabajo se analizaron por citometría de flujo 1,311 muestras de adultos sanos obteniendo valores en términos de porcentaje y números absolutos de CD3 (células-T), CD19 (células-B), CD4 (células-T ayudadoras/inductoras), CD8 (células-T citotóxicas/supresoras) CD16 y/o CD56 (células NK) (16,17).

## 2.8 Metodologías para estudios linfocitarios

### 2.8.1 Generalidades:

En la actualidad, son de uso muy difundido los análisis para células T y B en la inmunología clínica. Los leucocitos se cuentan al microscopio o por citometría de flujo con anticuerpos específicos contra antígenos de membrana. Los anticuerpos se conjugan a sustancias fluorescentes o a enzimas que producen reactantes. Tales técnicas se pueden aplicar, ya sea en suspensiones frescas de sangre, médula ósea, productos de aféresis o en secciones de tejido (Figura No. 10) (7,18,19).

Inicialmente, las pruebas para células humanas T y B por lo general se llevaban a cabo con suspensiones purificadas de células mononucleares. Para esto se requería de métodos eficaces para separarlas de los líquidos corporales y poseer reactivos adecuados y dispositivos de detección sensibles (7).

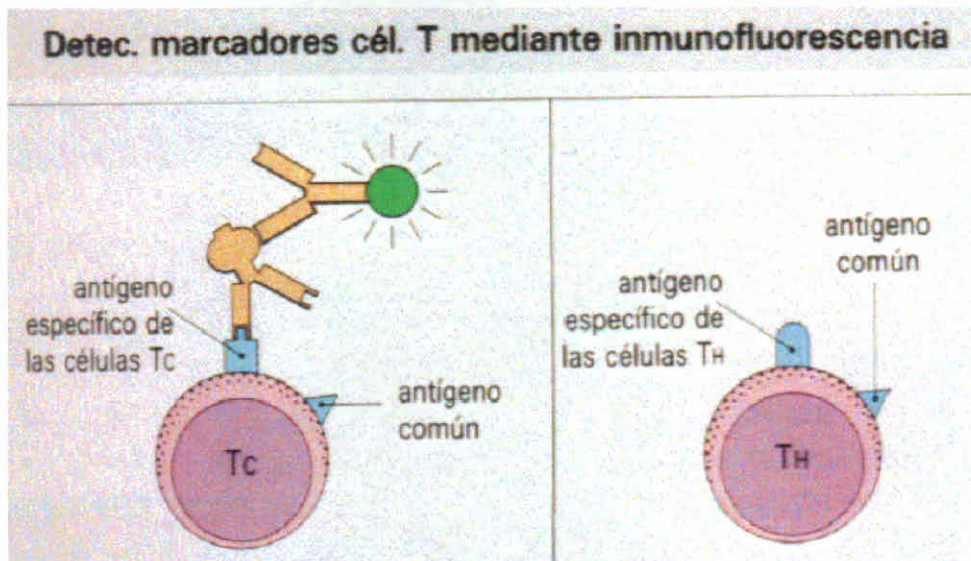


Figura No. 10. Esquematación de anticuerpos específicos conjugados a sustancias fluorescentes contra los antígenos de membrana (29).

Posteriormente se desarrollaron métodos que utilizan sangre total no fraccionada. Anticuerpos monoclonales altamente específicos contra los antígenos superficiales de las células permiten identificar subpoblaciones linfocitarias funcionalmente distintas. Las células se tiñen con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos y se lisan los eritrocitos. Los leucocitos residuales se cuentan por citometría de flujo. Esta tiene las ventajas de ser mucho más sensible, rápida y precisa que la microscopía. Pueden valorarse cuantitativamente los datos inmunofenotípicos en poblaciones celulares específicas (5,7).

## 2.9 Citometría de Flujo

### 2.9.1 Fundamentos de la citometría de flujo:

La citometría de flujo representa un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas, alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La interacción de las células o las partículas con el rayo luminoso genera señales que se llevan a los detectores adecuados. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de la luz por los fluorocromos presentes en la célula o la partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan por una computadora (Figura No. 11) (2).

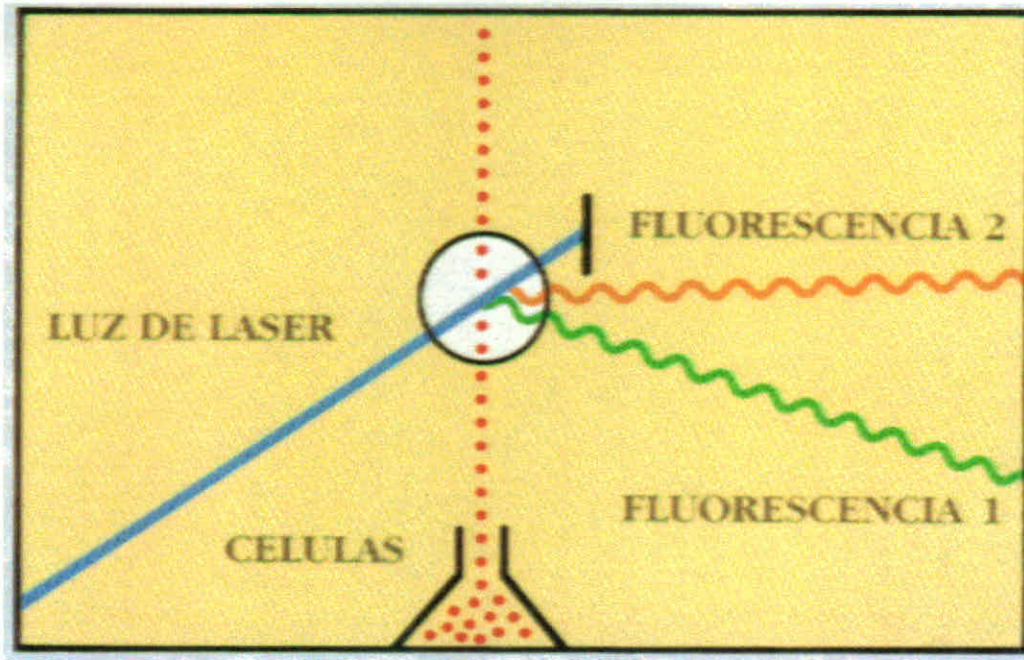


Figura No. 11. Esquema que representa el principio de la citometría de flujo. Las células se hacen pasar alineadas de una en una por delante de un haz luminoso (10).

La citometría de flujo ha encontrado amplia utilidad en ciencias como la inmunología, la hematología, la oncología, la anatomía patológica y la biología celular. Mediante citometría de flujo son posibles los estudios del ciclo celular, el análisis de antígenos celulares y los estudios de diversos parámetros celulares como la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el pH intracelular, la apoptosis y la incorporación de análogos de la timidina (2).

#### 2.9.2 Fundamentos de los sistemas detectores:

**Dispersión de luz:** Es un proceso físico en el que una partícula (una célula) interacciona con la luz incidente y como consecuencia de esta interacción cambia la dirección de la luz. Las características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz son el tamaño celular, la membrana celular, el núcleo y el material granular del interior de la célula. El contorno liso o rugoso de la superficie de la membrana y la forma de la célula contribuyen también a la dispersión de la luz. La luz no se dispersa igual en todas direcciones y la mayoría la hace en la dirección hacia delante. La luz dispersada hacia delante (*forward scatter*, FSC) es una medida del tamaño celular, mientras que la luz dispersada en ángulo recto (*side scatter*, SSC) depende de la densidad celular y la granulosis y no del tamaño (Figura No. 12) (2).



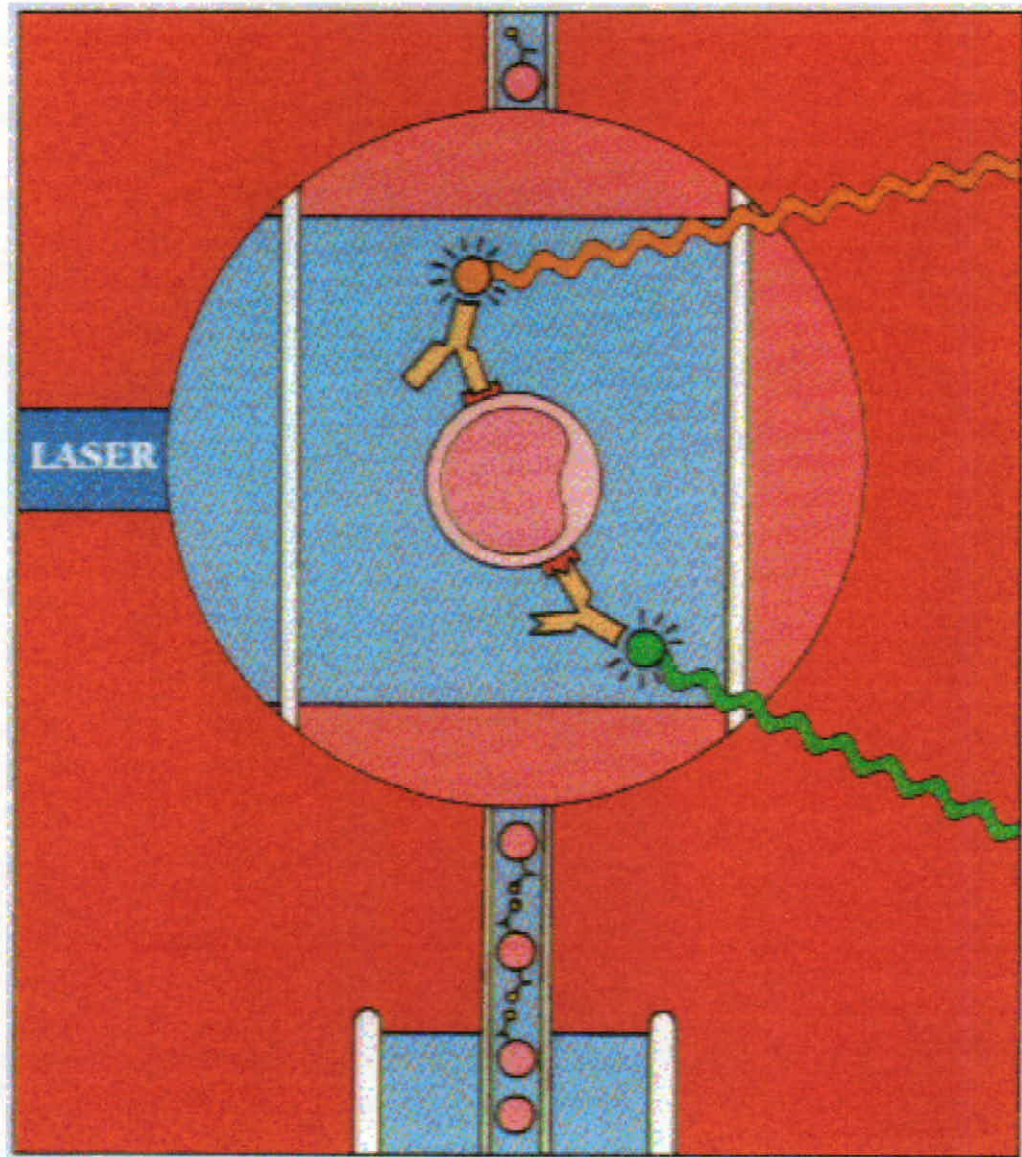


Figura No. 12. Esquematación de dos complejos anticuerpo fluorescente-antígeno de membrana del linfocito, pasando frente al haz luminoso, lo que causa un cambio en la dirección de la luz (10).

**Fluorescencia:** Los compuestos fluorescentes absorben energía luminosa de longitud de onda característica para cada compuesto. Esta absorción hace que suba un electrón a un nivel energético superior. El electrón excitado cae rápidamente al estado normal emitiendo un fotón y desprendiendo energía luminosa de una longitud de onda mayor a la absorbida. Esta transición radiante se denomina fluorescencia (2).

### 2.9.3 Componentes de un citómetro de flujo:

Los citómetros de flujo presentan una configuración ortogonal con tres ejes principales: el flujo de la muestra, el del rayo de luz y el de los detectores de fluorescencia. Constan de los siguientes componentes (2):

**Sistema de inyección de la muestra:** Por medio del sistema de inyección las células se transportan a una corriente de flujo hidrodinámico. Se utilizan dos tipos fundamentales de inyección de muestra: sistema de presión diferencial y sistema volumétrico. Normalmente, los citómetros de flujo poseen dos o tres velocidades de flujo capaces de proporcionar 12, 30 ó 60 ml por minuto.

**Cámaras de flujo:** El sistema de fluidos está constituido básicamente por dos compartimientos: el líquido que contiene la suspensión celular y un fluido hidrodinámico denominado envolvente, que rodea al líquido que contiene la muestra. La cámara de flujo constituye el centro del citómetro; ya que en ella se genera el flujo laminar de células que posteriormente serán interceptadas por el rayo luminoso. La velocidad de las células puede oscilar entre 1 000 y 1 000 000 por minuto.

**Fuentes de luz:** Existen dos tipos principales de fuentes luminosas: los rayos láser (argón, helio-neón o kriptón) y las lámparas de arco (mercurio o xenón).

**Sistema óptico:** La mayoría de los citómetros de flujo poseen cinco sistemas ópticos de medida: dos de dispersión de luz, uno hacia adelante y otro en ángulo recto y tres de fluorescencia. Mediante el sistema de dispersión de luz hacia adelante se determina el tamaño de las células y con el de dispersión en ángulo recto se determina la granulosidad celular, esto es, la complejidad interna de la célula. Los sistemas de fluorescencia se sitúan en ángulo recto y mediante ellos se determinan las células con compuestos fluorescentes (Figura No. 13).

**Detectores:** En la actualidad se utilizan tres tipos de detectores: fotodiodos, fotomultiplicadores y detectores monocromáticos. En cualquiera de ellos se generan pulsos eléctricos cuya área, altura y anchura son directamente proporcionales a la cantidad total de luz, a la intensidad máxima detectada y a la duración de la señal luminosa, respectivamente. Cada pulso o evento se inicia una vez que la célula se asoma delante del rayo luminoso. Posteriormente, si la velocidad es constante y la célula uniforme para las características estudiadas, el pulso desciende de forma simétrica hasta que desaparece la señal sobre esta célula.

**Amplificador/Convertidor:** Cada detector genera una señal electrónica, que es proporcional a la cantidad de luz dispersada o a la intensidad de la fluorescencia. Estas señales se amplifican multiplicándolas por un factor lineal o logarítmico. El pulso amplificado se lleva a un convertidor analógico/digital que convierte la altura

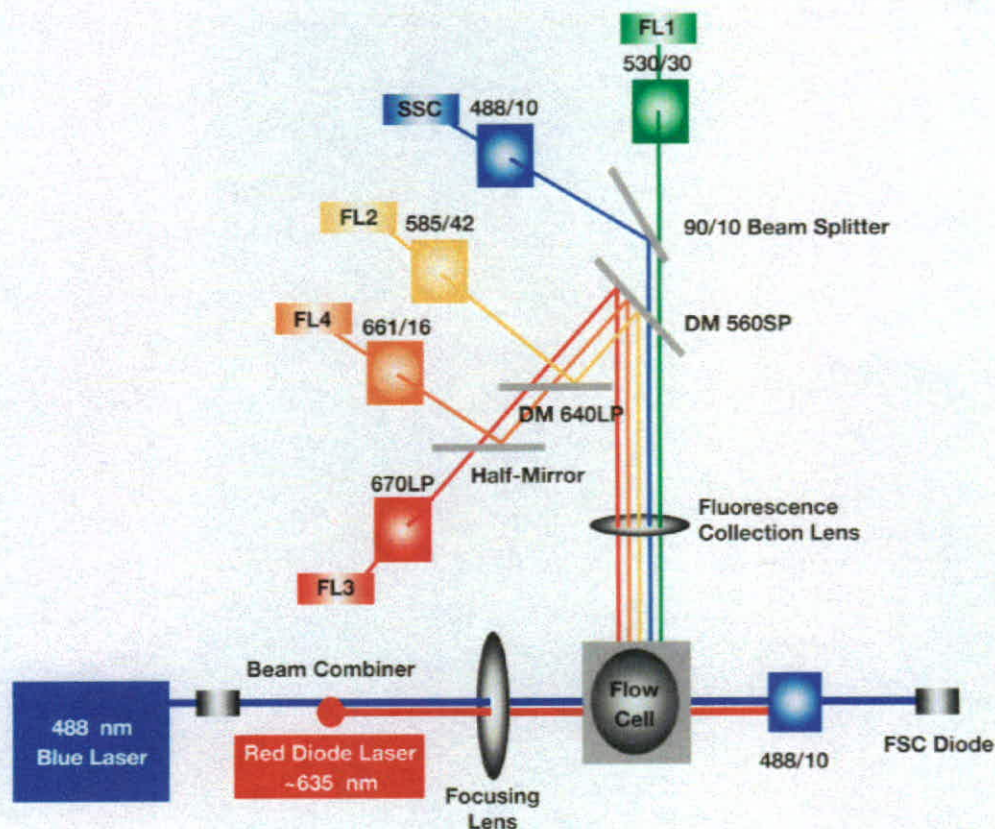


Figura No. 13. Esquema del sistema óptico de un citómetro de flujo en el cual se observan las diferentes dispersiones de luz (20).

del pico, que es análoga a la fuerza de la señal, en una señal digital que puede manejarse por una computadora.

**Presentación de los datos:** La información sobre cada célula analizada se recoge en forma de listado numérico que contiene los resultados de todas las medidas realizadas. En este listado numérico se acumula la información sobre todos los fenómenos estudiados, conservándose de forma estricta el orden en que fueron obtenidos. Este listado numérico puede almacenarse en soporte informático para su análisis posterior.

Los perfiles de intensidad celular de un citómetro de flujo se presentan normalmente en forma de histogramas de frecuencia. En el eje horizontal se representan rangos de intensidad lumínica y en el eje vertical se representa el número de células. Otra forma de presentar los datos es enfrentar dos señales como la dispersión hacia delante y la fluorescencia. Cada punto representa una célula específica que muestra su tamaño y la fluorescencia asociada. Puede relacionarse de esta forma cualquier pareja de parámetros medidos. Este tipo de representación se denomina de puntos

o escategrama. Pueden realizarse también representaciones en tres dimensiones. Los programas informáticos más recientes permiten incluso representar a un espacio bidimensional más de tres características celulares.

**Sistema informático:** El uso de programas de ordenador adecuados permite el análisis multidimensional sensible y objetivo en cada célula. La mayoría de los citómetros de flujo comercializados disponen de programas para el manejo de los datos. Asimismo, los datos pueden transferirse a otros ordenadores. Para ello ha sido fundamental la creación de un formato estándar de almacenamiento de datos que facilita su transferencia.

Durante la adquisición de los datos deben seguirse tres etapas diferentes: 1) calibrar el citómetro de flujo para la medida que se va a realizar, 2) colocar en cada fichero la información que se desea almacenar y 3) medir los controles y las muestras. Asimismo, el proceso de análisis de los resultados debe realizarse en tres pasos consecutivos destinados el primero a la identificación y selección de los parámetros a medir, el segundo a la identificación de subpoblaciones dentro de ellos y el tercero a la caracterización de uno de los subgrupos identificados.

El análisis de los datos obtenidos mediante citometría de flujo proporciona para cada célula dos tipos de información: cualitativa y cuantitativa. Así, cuando se analiza en una célula la reactividad para un determinado anticuerpo monoclonal específico para un antígeno, se obtiene información sobre la presencia del marcador en la célula y sobre su nivel de expresión (número de moléculas por célula). Cuando se consideran poblaciones celulares, la citometría de flujo añade a la información anterior datos sobre la homogeneidad o heterogeneidad de las medidas. Como consecuencia de lo expuesto, los programas informáticos permiten además de visualizar directamente las poblaciones celulares, obtener información numérica objetiva en forma de porcentajes, valores medios o medidas de dispersión como la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenido para los eventos estudiados.

#### 2.9.4 Fundamentos del separador de células:

Los citómetros de flujo separan células y elementos subcelulares con base en alguna característica o combinación de características. Se han aplicado dos principios diferentes para la separación de células por citometría de flujo: métodos mecánicos y métodos electrostáticos (2).

**Separación mediante métodos mecánicos:** El aislamiento se obtiene creando turbulencias en el flujo que inducen una interrupción de éste. En algunos sistemas, la interrupción del flujo se consigue mediante una jeringa que aspira el flujo que contiene las células deseadas. En otros, la turbulencia se crea mediante la vibración controlada de un transductor de cristal ultrasónico o un transductor piezoeléctrico (2).

**Separación mediante métodos electrostáticos:** En la actualidad, la mayoría de los citómetros de flujo comerciales con posibilidad de separar células utilizan métodos electrostáticos. En estos sistemas la cámara de flujo se asienta sobre un cristal piezoeléctrico que vibra en respuesta a un transductor acústico acoplado. La vibración del cristal se transmite a la cámara de flujo y hace que la corriente de flujo se fragmente en gotitas un poco más adelante del lugar de interacción del láser. El tiempo transcurrido entre el análisis de una célula y su inclusión en una gota (tiempo de retraso) se hace constante al ser directamente proporcional a la distancia que existe entre el punto de análisis y el de formación de las gotas, siempre y cuando permanezcan constantes la velocidad de flujo y la geometría del sistema. Si se conoce la distancia entre el punto de análisis y el de formación de las gotas (tiempo de retraso), las gotas que contienen las células que se quieren separar pueden cargarse de forma específica en el momento de su formación. En los métodos de separación electrostáticos se puede alcanzar una velocidad de separación hasta de  $1 \text{ a } 2 \times 10^3$  células / segundo (2).

#### 2.9.5 Compuestos fluorescentes más utilizados en citometría de flujo:

El uso de compuestos fluorescentes, denominados fluorocromos, en citometría de flujo ha sido fundamental en el desarrollo de esta técnica. Los láser emiten luz monocromática, esto es, luz de una única longitud de onda, por lo que para que un fluorocromo pueda utilizarse en citometría de flujo debe absorber luz de la longitud de onda del láser. Con el láser de argón se utiliza una longitud de onda de excitación de 488 nm, una luz de color azul a azul-verdoso. El fluorocromo debe emitir luz a una longitud de onda lo suficientemente mayor que la longitud de onda de excitación, de forma que se puedan separar con filtros selectivos los dos colores de la luz que viene de la célula, la luz dispersada a  $90^\circ$  y la señal de fluorescencia. Cuando se utilizan varios fluorocromos sus espectros de emisión deben tener un solapamiento mínimo con objeto de que puedan cuantificarse de forma separada (2, 21).

Cronológicamente, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue el primer fluorocromo utilizado para el marcaje de anticuerpos monoclonales para su lectura por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Este fluorocromo tenía un conjunto de ventajas que permitían su uso de forma rutinaria. Por un lado, se trata de una molécula relativamente pequeña con una importante afinidad por las proteínas, incluidas las inmunoglobulinas. Por otra parte, el FITC se excita con luz azul (488 nm), lo que permite el uso de un láser relativamente pequeño y de mantenimiento económico. No obstante, la fluoresceína presenta algunos inconvenientes relacionados fundamentalmente con la cuantificación de señales de fluorescencia y con la detección de antígenos expresados en cantidades relativamente bajas. Así, el FITC constituye un compuesto con propiedades de transferencia de energía entre dos moléculas del mismo fluorocromo siempre y cuando éstas estén suficientemente cercanas ( $50 \text{ \AA}$ ), ya que cada una de ellas sería excitable no sólo por la fuente de luz, sino también por la luz emitida por la otra

molécula de fluorocromo, una vez que ésta ha sido excitada por el láser. De este modo, en el caso de utilizar anticuerpos monoclonales marcados con FITC, el resultado final en términos de cantidad de fluorescencia no depende únicamente del número de fluorocromos, sino también de otras características, como la proximidad espacial entre ellos (2).

La ficoeritrina (PE), aunque de aparición posterior, es sin duda el fluorocromo de mayor potencial en el inmunofenotipaje celular y de elección para la detección y cuantificación de antígenos concretos. Se trata de un fluorocromo muy sensible, ya que permite la detección de un pequeño número de moléculas de antígeno, que proporciona un cociente fluorocromo/proteína (inmunoglobulina) estable 1/1 y que no presenta los fenómenos descritos para el FITC. Aunque la ficoeritrina se sigue utilizando en muchos laboratorios como segundo fluorocromo, en combinación con el FITC, sus características apuntan a que en un futuro pueda constituir el fluorocromo base para el inmunofenotipaje celular (2).

La mayoría de los fluorocromos restantes empleados en el fenotipaje inmunológico por citometría de flujo, más que por fluorocromos individuales están constituidos por grupos de dos fluorocromos unidos entre ellos, bien de forma natural como el PerCP, o artificialmente como la ficoeritrina-cianina 5. En los que uno de ellos se excita primariamente con la luz del láser y la luz que emite se absorbe en su práctica totalidad por el segundo fluorocromo, cuya emisión de luz es la que se mide (2).

En el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo se obtienen dos tipos diferentes de información para cada célula y para cada marcador estudiado: presencia o ausencia del marcador y cantidad de fluorescencia obtenida, reflejo del número de moléculas de antígeno (Figura No. 14) (2).

Para el estudio de ácidos nucleicos los fluorocromos más empleados son el yoduro de propidio, el bromuro de etidio, el naranja de acridina, el Hoechst 33342, el naranja de tiazol, la mitramicina y la cromomicina A3 (2).

#### 2.9.6 Compensación de fluorescencias:

Para la mayoría de los fluorocromos utilizados en los marcajes múltiples con anticuerpos monoclonales existe un cierto grado de interferencia al introducirse la luz emitida por un fluorocromo concreto en más de un detector de fluorescencia, ya que los espectros de emisión de los fluorocromos son relativamente amplios. Debido a esto es necesario realizar la compensación de fluorescencias como fase final del proceso de calibración del citómetro de flujo (Tabla I) (2).

#### 2.9.7 Preparación de las muestras:

El principal requerimiento de una muestra para su análisis mediante citometría de flujo es que sea una suspensión monodispersa. La temperatura y el tiempo de

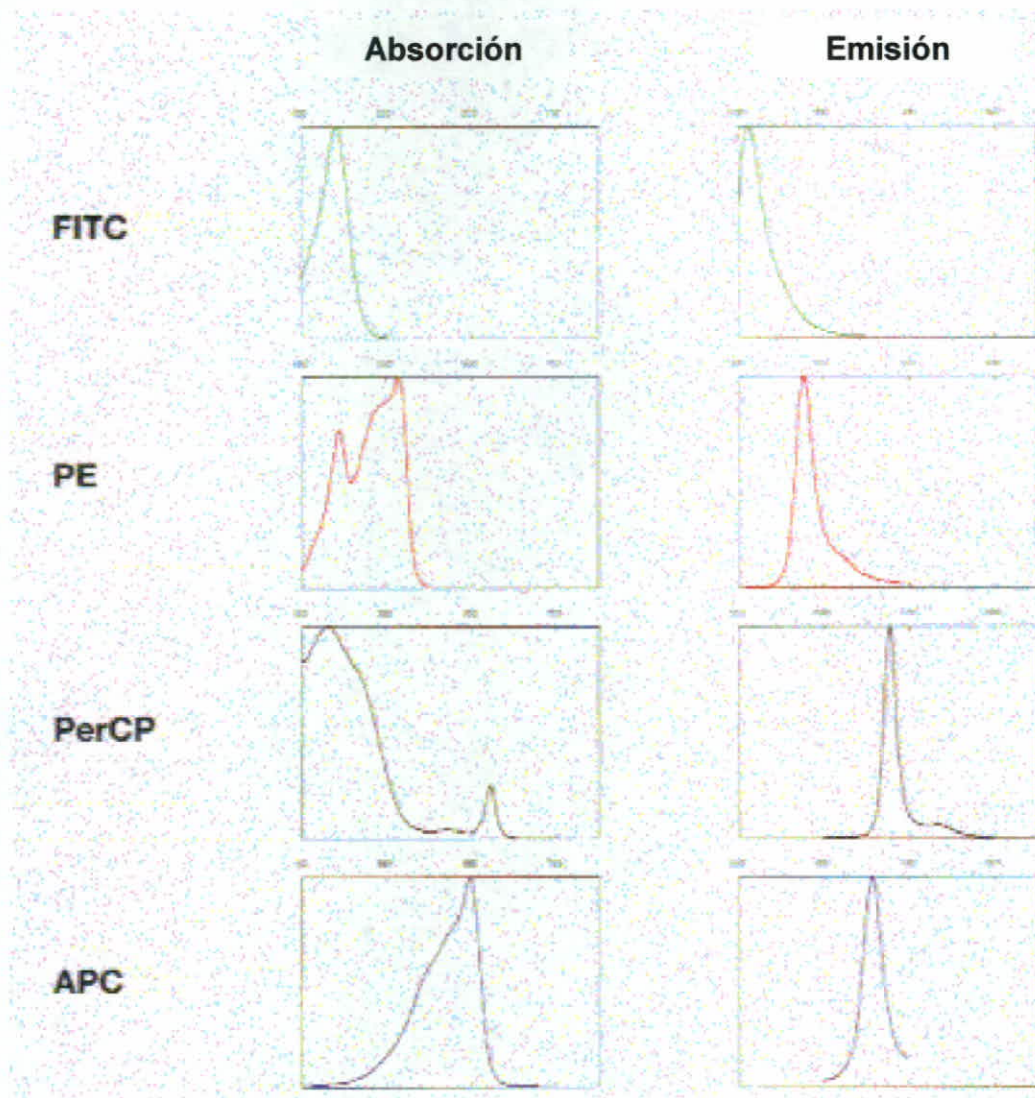


Figura No. 14. Espectros de absorción y emisión de los fluorocromos de uso más común en la citometría de flujo (20).

transporte y almacenamiento pueden influir sobre la viabilidad celular y la expresión antigénica, alterando de esta manera las poblaciones celulares. Todas las muestras, con independencia del anticoagulante empleado en su obtención, deben mantenerse a temperatura ambiente. Antes de su presentación las células deben tratarse con el fluorocromo o con los anticuerpos marcados. Para su utilización en aplicaciones clínicas determinadas, se comercializan los anticuerpos marcados con los fluorocromos adecuados (2).

Cuando sea necesario utilizar sólo células viables, las células no deben fijarse tras completar el procedimiento de marcado. Las células muertas que contaminan la población de células vivas pueden identificarse entonces utilizando yoduro de

Tabla I. Espectros de emisión y selección del láser para un citómetro de flujo de acuerdo a su aplicación (20)

TIPO DE LASER (Nombre comercial) Y LONGITUD DE ONDA (nm)

Innova 70C-4	Innova 70C-Spectrum	Innova 90C-A4	Innova 90C-A5	Innova 302C-Krypton	Innova 304C-UV	Innova 305C-UV	Innova 306C-UV	Enterprise IIC	Spectra Physics HeNe	Omnichrome HeCd	Spectra Physics 177G	CR-599 Dye Laser
--------------	---------------------	---------------	---------------	---------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------------	-----------------	----------------------	------------------

APLICACIONES

INMUNOFENOTIPAJE

Fluoresceína FITC	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	630
Ficoeritrina PE	575	575	575	575	575	575	575	575	575	575	575	630
Peridina Clorofil Proteína PerCP												670
Rojo Texas TR												630
Alofocianina APC												580
Rodamina												760
APC-Cy7												760
PE-Cy5	760	760	760	760	760	760	760	760	760	760	760	
Azul Cascada												425
Azul Marino												450



propidio o monoacida de etidio. Cuando el antígeno diana se encuentra en el citoplasma o en algún organelo subcelular, se requiere fijar y/o permeabilizar la célula, no pudiendo en esta situación estudiarse la viabilidad celular con estos método (2).

Las técnicas más utilizadas para disgregar los tumores sólidos para los análisis por citometría de flujo se dividen en dos grandes grupos: las técnicas enzimáticas que producen suspensiones celulares y las técnicas que emplean detergentes que proporcionan núcleos. Las principales enzimas utilizadas para disgregar las células son la tripsina, la proteasa neutra, la colagenasa, la adeneasa, la hialuronidasa y diferentes combinaciones de estas enzimas, de acuerdo con el tipo de tejido tumoral (2).

Como, en general, con todas las muestras que procesan los laboratorios clínicos, las muestras para citometría de flujo deben manipularse extremando las precauciones, ya que pueden ser potencialmente infecciosas. Los tubos o las gradillas con salpicaduras de sangre deben lavarse y desinfectarse o desecharse. Todos los especímenes deberán fijarse con una concentración final de paraformaldehído al 1 por ciento durante un tiempo mínimo de dos horas antes del análisis. Con este procedimiento se inactivan la mayoría de virus patógenos, incluido el VIH. El personal deberá utilizar guantes y mascarillas, así como protección ocular mientras manipula las muestras (2).

#### 2.9.8 Anticuerpos:

Los anticuerpos son un reactivo fundamental en los análisis mediante citometría de flujo. En la actualidad se comercializan una gran cantidad de anticuerpos, de forma que para la mayoría de las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo los anticuerpos se adquieren directamente. Pueden utilizarse antisueros con anticuerpos monoclonales o policlonales (2).

**Anticuerpos policlonales:** Para producir un antisuero específico se inyecta el antígeno a un animal grande (caballo, cabra), junto con un adyuvante, como el adyuvante completo de Freund, para aumentar la inmunogenicidad. Se repite la inyección varias veces para tener un animal hiperinmunizado. Se sacrifica el animal y se obtiene la sangre que se deja coagular y se centrifuga para obtener el suero. Posteriormente, se inactivan las proteasas y el complemento incubando el suero a 56°C durante 45 minutos (2).

La inyección de un antígeno induce un gran número de anticuerpos distintos contra él. Las diferentes inmunoglobulinas se producen como consecuencia de la interacción de diferentes clones de linfocitos B, cada uno de ellos con un receptor específico, para los distintos epítomos del antígeno. Por eso el antisuero se llama policlonal. La cantidad relativa de cada inmunoglobulina diferente en un antisuero

policlonal depende de la ruta de inoculación del antígeno, la especie y la raza inoculada, así como de los adyuvantes utilizados y la frecuencia de la inoculación (2).

Los anticuerpos policlonales pueden purificarse para eliminar los interferentes mediante diversas técnicas, principalmente precipitación fraccionada y cromatografía (2).

**Anticuerpos monoclonales:** La producción de anticuerpos monoclonales descansa en la fusión de linfocitos B con células de mieloma para dar un hibridoma inmortal que segrega un único tipo de anticuerpo. Este proceso depende del origen de los linfocitos B de un huésped inmunizado, una célula de mieloma de fusión adecuada y una prueba de rastreo eficaz para seleccionar los clones híbridos productores de los anticuerpos deseados (2).

Para producir un anticuerpo monoclonal se inmuniza el animal con el antígeno mediante dosis sucesivas de éste durante varias semanas, se sacrifica el animal y se extrae el bazo o los ganglios linfáticos, a partir de los cuales se obtienen los linfocitos B sensibilizados. Posteriormente, se incuban durante unos minutos los linfocitos B con células de mieloma de ratón deficitarias de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPTR) en presencia de polietilenglicol (PEG), para producir la fusión celular y dar lugar al hibridoma. El PEG induce la fusión de la membrana celular por la formación de agregados al aproximarse zonas grandes de la membrana. Las bicapas lipídicas interactúan con la célula adyacente, permitiendo la fusión por una interacción lípido-lípido con la formación de pequeños puentes citoplásmicos. El PEG induce cambios de la permeabilidad de la membrana, lo que hincha las células y forma células esféricas fusionadas con dos o más núcleos (2).

La mezcla de fusión se siembra en recipientes de cultivo que contienen medio HTA (hipoxantina, aminopterina, timidina) que permite el crecimiento de las células fusionadas. Los linfocitos B y los linfocitos B fusionados entre ellos mueren pronto *in vitro*. Las células de mieloma y las células de mieloma fusionadas entre ellas mueren también envenenadas por la aminopterina en el medio HTA, ya que carecen de la enzima HGPTR. Sólo sobreviven los hibridomas, ya que las células de mieloma confieren al híbrido su capacidad de crecimiento *in vitro* y los linfocitos B contribuyen con la enzima HGPTR, esencial para el crecimiento en el medio HTA. Tras un período de 10-14 días de cultivo sólo sobreviven los hibridomas (2).

En este momento se tiene un conjunto de células híbridas que producen diferentes tipos de anticuerpos específicos contra el antígeno. Para aislar los clones adecuados se diluye el cultivo y se distribuye en los pocillos de una placa de microtitulación, de forma que cada pocillo contenga un hibridoma diferente. Se cultivan los clones suplementando el medio con células como los macrófagos. Cuando los clones han crecido suficientemente se analiza el tipo de inmunoglobulina que producen con

relación a sus características antigénicas frente a su antígeno específico. También puede diluirse el cultivo y sembrar los híbridos en agar, de forma que pueden observarse las colonias y aspirar con una pipeta los diferentes clones. Estos clones se incuban en placas de microtitulación para que proliferen, y posteriormente se analiza el tipo específico de inmunoglobulina que producen (2).

Una vez identificados los pocillos con los clones adecuados, se diluyen y se subclonan para obtener un único hibridoma productor de anticuerpo. Se selecciona el clon que segrega el anticuerpo con el mayor título con la especificidad adecuada. Para citometría de flujo, se recomienda que esta segunda selección se realice por inmunocitometría de forma que el anticuerpo seleccionado sea el que mejor funcione con esta técnica (2).

El aislamiento del anticuerpo del medio de cultivo se realiza por fraccionamiento salino, seguido de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de tamizado molecular. También puede emplearse cromatografía de afinidad para purificar y concentrar los anticuerpos monoclonales en un solo paso (2).

#### 2.9.9 Parámetros de eficacia de los citómetros de flujo:

El funcionamiento de un citómetro de flujo está caracterizado por los siguientes parámetros: sensibilidad, resolución y velocidad de medida (2).

**Sensibilidad:** Con relación a la fluorescencia, la sensibilidad puede expresarse como el número mínimo de moléculas de fluorocromo por célula que puede medirse con una determinada precisión (resolución); para la dispersión de luz, la partícula más pequeña de un determinado índice de refracción que puede medirse con esa precisión. La sensibilidad depende de: la intensidad de excitación, el tiempo que pasa la célula por el foco de excitación, la apertura numérica eficaz del sistema óptico de recogida de fluorescencia/dispersión de luz, la transmisión de la ruta de fluorescencia/dispersión de luz, la sensibilidad del detector, el ruido y el solapamiento entre la longitud de onda de excitación y del espectro de absorción del colorante (2).

**Resolución:** La resolución se expresa normalmente en forma de coeficiente de variación (CV), esto es, la desviación estándar relativa de la señal producida por células o partículas idénticas. La resolución está limitada principalmente por tres factores: la estabilidad de la fuente de luz de excitación, la anchura y estabilidad del flujo de muestra y la intensidad de la señal y la luminiscencia de fondo, que determina el ruido en la detección de luz (2).

**Velocidad de medida:** En los citómetros de flujo de fuentes de luz láser, la máxima velocidad de medida es de 5 000 células por segundo, mientras que en los aparatos de lámparas de arco la velocidad máxima de medida es de 1 000 células por segundo (2).

### 2.9.10 Garantía de la calidad:

Como en todas las técnicas analíticas, para proporcionar unos buenos resultados es fundamental un adecuado programa de garantía de la calidad (2).

El control de la calidad implica la optimización del análisis de forma que las células idénticas den los mismos resultados en una muestra, en distintas muestras en un mismo día, y día a día en un laboratorio, así como en distintos laboratorios (2).

Un estándar es un material estable que tiene o se le puede asignar valores de intensidad de fluorescencia o de dispersión de luz. Los estándares se utilizan para optimizar y/o calibrar los citómetros de flujo. Como estándares se utilizan, por ejemplo, microesferas que tienen un número conocido de fluorocromos por microesfera, o microesferas que tienen un número desconocido pero estable de moléculas de fluorocromo a las que se puede asignar un valor de fluorescencia (2).

Un control es un material que proporciona un resultado esperado, aunque puede carecer de la estabilidad a largo plazo o del valor asignado requeridos por un estándar. Los controles pueden ser positivos o negativos y se utilizan para comprobar los reactivos y/o los métodos que preparación celular. Para el control de la calidad se emplean especímenes de control, tanto biológicos como no biológicos. Un control utilizado con frecuencia para los análisis inmunofluorimétricos es sangre de un donante normal (2).

**Calibración:** La calibración del citómetro de flujo garantiza la optimización de la recogida de la señal óptica y el funcionamiento global de la electrónica del aparato. En la citometría de flujo la calibración es el proceso por el cual se enfoca ópticamente el láser y se mide su potencia utilizando partículas de látex. Las microesferas fluorescentes estandarizadas son la forma más conveniente de evaluar los parámetros del aparato. Se comercializan microesferas estándares con tamaños y rangos desde menos de 1  $\mu\text{m}$  a mayores de 100  $\mu\text{m}$  con diversas intensidades de fluorescencia (2).

**Estandarización:** Proporciona una valoración más detallada del funcionamiento del aparato y la seguridad de que las partículas estandarizadas para diversos parámetros producen resultados estadísticamente consistentes. Los parámetros que se valoran durante la estandarización del aparato incluyen la amplificación de la señal logarítmica y lineal, la compensación del color, la resolución y sensibilidad y la cuantificación de fluorescencia (2).

### III JUSTIFICACIONES

Existen subseries de linfocitos T para las cuales se han identificado claramente correlaciones funcionales. De entre todas estas subseries, las que poseen quizá mayor importancia biológica son aquellas que tienen marcadores CD4, pero carecen de CD8 (linfocitos CD4+), así como las células T que poseen las características superficiales contrarias (linfocitos CD8+) (5,8). Estos antígenos de superficie se pueden identificar por medio de anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos, los cuales se analizan por medio de citometría de flujo. Esta metodología es la que presenta mayores ventajas en cuanto a tiempo, precisión y especificidad para la determinación de estas subpoblaciones.

La determinación de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ aportan datos para conocer el estado inmunológico de un paciente, para realizar pronóstico del desarrollo de una enfermedad, para decidir terapias y para dar seguimiento a pacientes con enfermedades autoinmunes o con inmunodeficiencias. Por ejemplo, el progreso de la enfermedad por infección con el VIH ocurre con una disminución paulatina de los linfocitos CD4+; el tratamiento de estos pacientes se realiza con distintos protocolos, que se deciden de acuerdo a los niveles de esta subpoblación (1,2).

Las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en pacientes sanos pueden variar de acuerdo a la edad, sexo y raza. Por lo anterior, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores normales, o que al menos, se tengan referencias de una población similar, para que así la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos proporcione información válida en relación a los cambios o alteraciones en diferentes condiciones, y pueda ser de utilidad en la clínica.

Por lo tanto es importante determinar los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ en una población de adultos sanos de ambos sexos como la que conforma un grupo de donadores que acuden a un banco de sangre del país.

## IV OBJETIVOS

### 4.1 General

Determinar los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ en una población de donadores que acuden al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS.

### 4.2 Específicos

- Cuantificar el número de linfocitos CD4+ y CD8+ (células/ul) en muestras de sangre periférica de 70 donadores (35 hombres y 35 mujeres) de la población indicada.
- Determinar si existe diferencia significativa en los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ en función del sexo.
- Establecer si hay diferencia entre los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ de la población estudiada y los reportados para otros países y grupos raciales.

## V HIPOTESIS

El objetivo general del presente trabajo no permite considerar una hipótesis, debido a que es un estudio descriptivo.

El análisis de los resultados, según los objetivos específicos, permite plantear las dos hipótesis siguientes:

- No existe diferencia significativa entre los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ de hombres y mujeres.
- No existe entrecruzamiento entre los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ de la población estudiada y los reportados para poblaciones de mexicanos, caucásicos y árabes.

## VI MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Universo de trabajo

Donadores que acuden al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS.

### 6.2 Muestra

70 donadores que acudieron al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS entre los meses de marzo y abril de 2000.

### 6.3 Medios

#### 6.3.1 Recursos Humanos:

Tesista: Br. Karla Mejía Bonifazi  
Asesora: Licda. Glenda Escalante de Ramírez  
Colaboradores: Licda. Melissa de Knoepffler  
Licda. Marlene de Mazariegos  
Licda. Ely Ocaña  
Dr. Renán Acevedo. PhD.  
Lic. César Zamora

#### 6.3.2 Recursos Institucionales:

Hospital General de Enfermedades del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social  
(Banco de Sangre y Laboratorio Clínico)

#### 6.3.3 Recursos Materiales:

##### Reactivos:

1 galón de cloro comercial  
1 litro de agua tridestilada  
2 kits de reactivo Tritest CD3 FITC/ CD4 PE/ CD45 PerCP con tubos Trucount (21)  
2 kits de reactivo Tritest CD3 FITC/ CD8 PE/ CD45 PerCP con tubos Trucount (21)  
1 kit de partículas de calibración (Unlabeled, FITC, PE, PerCP) (21)  
1 kit de controles Tritest (alto, medio y bajo) (21)  
5 galones de líquido de revestimiento (Sheat Fluid) (21)  
100 ml. de solución lisante Facs Lysing Solution 10X  
1 galón de alcohol al 70 por ciento



**Materiales:**

2 libra de algodón  
100 agujas vacutainer 23 1/2  
1 capuchón para tubo vacutainer  
1 ligadura  
100 tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA)  
3 gradillas  
3 portatips  
500 tips blancos (50ul)  
500 tips azules (100-1,000 ul)  
500 tips amarillos (5-100 ul)  
3 rollos de papel mayordomo  
3 cajas de guantes  
1 rollo de maskin tape  
1 lapicero  
1 lapiz  
1 cuaderno de 100 hojas empastado  
1 bata  
1 descartador de agujas desechable  
250 tubos falcon de 12 x 75 mm con tapón (21)  
1000 hojas de papel bond tamaño carta  
1 cartucho de inyección de colores  
1 cartucho de inyección blanco y negro

**Equipo:**

1 calculadora  
1 pipeta de 50 ul  
1 pipeta de 20 ul  
1 pipeta de 450 ul  
1 agitador vortex  
1 mezclador hematológico de muestras  
Sistema de citometría de flujo compuesto por un citómetro de flujo Becton Dickinson modelo FACSCalibur serie E2890 de cuatro colores (FITC, PE, PerCP, APC), con computadora Apple iMac G3 con zip drive, los programas FACSCComp version 2.0 y MultiSET e impresora HP DeskJet 970Cxi.

**6.4 Procedimiento:**

6.4.1 Diseño de la investigación:

**Tipo de Estudio:** Observacional, transversal y descriptivo.

**Número de muestra:** Utilizando como número de población total, el número de donadores que acudieron mensualmente (300) al banco de sangre del IGSS durante

1999, se calculó el número mínimo de muestras a colectarse  $n=35$ , utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * \sigma^2}{[(N-1) * \Delta^2 / z^2] + \sigma^2}$$

en donde

N: Número de población	300
$\sigma$ : Desviación Estándar	%CD4+: 4.7 (1) %CD8+: 5.9 (1)
$\Delta$ : Límite de error	CD4+: 1.91% (error estándar) (22) CD8+: 4.54% (error estándar) (23)
z: Confiabilidad 99%	2.575

**Criterios de inclusión/exclusión:** Los establecidos según protocolo del Banco de Sangre del IGSS para aceptar o rechazar a un donador (Anexo No. 1).

**Diseño de muestreo:** Por conveniencia; a partir de la fecha del inicio del estudio se tomaron muestras de sangre de todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, hasta completar 35 muestras de hombres y 35 de mujeres.

**Diseño estadístico:** Se calculó la media (X), desviación estándar (DS), intervalos al 95 % ( $X \pm 1.96 DS$ ) del total del grupo muestral, así como de los subgrupos hombres y mujeres.

Para establecer si existían diferencias entre los valores para hombres y mujeres, se realizó la prueba de t de Student.

Para comparar los resultados obtenidos y los reportados para otros países y grupos raciales, se calcularon los intervalos de confianza (IC),  $X \pm (z) (DS / \sqrt{n})$ , utilizando un valor de  $z = 1.96$ , que corresponde a un nivel de confianza ( $\gamma$ ) igual a 95 %.

#### 6.4.2 Procedimiento:

##### Selección de donadores:

- Se realizó la entrevista de rutina a las personas que acudieron al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades del IGSS durante el tiempo del estudio, utilizando el formulario oficial del Banco de Sangre (Anexo No. 2). Durante la entrevista se informó del estudio y se solicitó el consentimiento para ser incluidos, lo cual quedó consignado en el formulario mencionado.
- Se extrajo una muestra de sangre venosa para realizarle el panel de 24 pruebas de laboratorio, establecido en el banco de sangre referido. Las personas que según estos criterios fueron aceptados como donadores se incluyeron en el presente estudio.

### **Colecta de la muestra:**

- Se extrajo a los donadores 2.5 ml de sangre venosa según la técnica usual, la cual se colectó en un tubo vacutainer que contenía 100 ul de una solución de K<sub>3</sub>EDTA.
- La muestra se procesó inmediatamente después de su recolección; en caso de que esto no fuera posible, ésta se almacenó por no más de 24 horas a temperatura ambiente (20° - 25°C). (20,24)

### 6.4.3 Citometría de flujo (25):

#### **Calibración del citómetro (26,27):**

- Se preparó dos tubos rotulados, uno para el ajuste de los fotomultiplicadores PMTs (tubo A) y el segundo para compensar las fluorescencias y la sensibilidad del instrumento.
- Al tubo A se agregó 1 ml del líquido de revestimiento y 50 ul del reactivo de partículas sin marcar, se mezcló durante 30 segundos con el agitador vortex.
- Al tubo B se agregó 3 ml del líquido de revestimiento, 50 ul del reactivo de partículas sin marcar, 50 ul de cada uno de los siguientes reactivos: FITC, PE y PerCP, se mezcló durante 30 segundos con el agitador vortex.
- Se introdujo en el citómetro sucesivamente las mezclas de los tubos A y B, utilizando el software FACSCComp versión 2.0 para medir el voltaje de los fotomultiplicadores PMTs (tubo A), los valores de compensación y los umbrales de la fluorescencia. Con estos valores se optimizaron los ajustes del equipo para cada programa de conteo, CD4+ y CD8+, respectivamente (Anexo No. 3).

#### **Procesamiento de la muestra (22,23):**

- Se agitó la muestra a analizar por un mínimo de 30 minutos mediante el mezclador hematológico.
- En un tubo TruCOUNT rotulado se agregó 20 ul del anticuerpo monoclonal apropiado (reactivo CD3/CD4/CD45 para el conteo de CD4+ ó reactivo CD3/CD8/CD45 para el conteo de CD8+) justo por encima del retenedor de acero inoxidable. Se tuvo cuidado de no tocar el sedimento.
- Al tubo anterior se le agregó exactamente 50 ul de muestra dejandola resbalar por las paredes, justo por encima del retenedor. La exactitud es crítica, por lo que se utilizó una pipeta electrónica.
- Se tapó el tubo y se mezcló suavemente durante 30 segundos con el agitador vortex. Se incubó 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° - 25°C).
- Después de la incubación se agregó 450 ul de solución lisante diluída 1:10.
- El tubo tapado se mezcló nuevamente durante 30 segundos con el agitador vortex y se incubó 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° - 25°C).
- Se introdujo la muestra procesada al citómetro previamente calibrado con el procedimiento descrito anteriormente para proceder al conteo de células. El conteo se realizó inmediatamente después de procesar la muestra, en los casos

en que esto no fue posible, la muestra procesada se almacenó hasta por un máximo de 24 horas a temperatura ambiente (20° - 25°C) (Anexo No. 4).

#### **Preparación de controles (28):**

Previo a proceder al conteo de células en las muestras, se analizaron diariamente muestras controles para verificar que la calibración fuera la adecuada. Para preparar estos controles se utilizó una muestras de sangre entera, la cual fue tratada de la siguiente manera:

- Se procesaron tres alícuotas de una misma muestra como se describió anteriormente, al final del procedimiento, a cada una de ellas se le agregó 50 ul del reactivo control TruCOUNT bajo, medio y alto, respectivamente. Con este procedimiento se generaron muestras de tres distintas cantidades de microesferas: baja ( $47.7 \pm 8.5$ ), media ( $240.9 \pm 14.7$ ) y alta ( $976.7 \pm 44.6$ ).
- Estas muestras controles se introdujeron al citómetro previamente calibrado, para proceder a su conteo. Las muestras se analizaron antes de las 8 horas después de su preparación (Ver anexo No. 5).

#### **Conteo de células (25):**

- Las muestras o los controles debidamente procesados, se hicieron pasar por la celda de lectura del citómetro ajustado con las condiciones óptimas. El citómetro realizó la adquisición electrónica de datos.
- Los datos adquiridos por el citómetro fueron procesados mediante el programa MultiSET ajustado con el valor del número de microesferas de los tubos TruCOUNT, el cual varió con el número de lote y número de perlas de control.
- Los resultados de la concentración de CD4+ y CD8+ expresados como número de células por microlitro y porcentaje en relación al número de células blancas totales, fueron reportados de la forma en que se muestra en el anexo No. 4.

#### **6.4.4 Tabulación de Resultados:**

Con los resultados obtenidos se elaboraron dos tablas, una para hombres y otra para mujeres, que incluyen las siguientes columnas:

Número

Edad

Valor de linfocitos CD4+ (células/ul y porcentaje en relación al total de linfocitos)

Valor de linfocitos CD8+ (células/ul y porcentaje en relación al total de linfocitos)

Valor de la relación CD4+/CD8+

#### **6.4.5 Análisis de Resultados:**

Se calculó la media (X), desviación estándar (DS), intervalos al 95 % ( $X \pm 1.96 DS$ ) del total del grupo muestral, así como de los subgrupos hombres y mujeres. Así mismo, se llevó a cabo el análisis estadístico considerado en el diseño de la investigación. Para el análisis de resultados se utilizó el programa STATA 6.0.

## VII RESULTADOS

Se estudió un total de 70 muestras de personas comprendidas entre 19 y 45 años ( $X \pm DS = 29.8 \pm 7.1$  años). El rango de edad de los 35 hombres osciló entre 19 y 42 años ( $27.4 \pm 5.8$  años) y el de las 35 mujeres entre 20 y 45 años ( $32.2 \pm 7.5$  años). Todas las personas incluidas en el estudio cumplieron con los criterios de inclusión y dieron su consentimiento.

Las muestras fueron trasladadas inmediatamente al Laboratorio Clínico del Hospital en donde fueron procesadas y analizadas en el citómetro, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.4.3 de Materiales y Métodos.

Los resultados de la determinación realizada en el citómetro fueron reportados para linfocitos T ayudadores/inductores (CD4+) y linfocitos T supresores/citotóxicos (CD8+) como cantidad de células por microlitro (cel/ul) y como el porcentaje de las subpoblaciones en relación al total de linfocitos en la muestra (% CD4+ y % CD8+, respectivamente). En la tabla II se muestran los resultados de la determinación de linfocitos CD4+, CD8+ y el cálculo de la relación CD4+/CD8+ para el total del grupo muestreado. El valor de linfocitos CD4+ fue de  $897 \pm 246$  con intervalo de 415 a 1378, para linfocitos CD8+ de  $602 \pm 235$  con intervalo de 142 a 1063 y para la relación CD4+/CD8+ de  $1.7 \pm 0.6$  con intervalo de 0.4 a 2.9.

**Tabla II.** Valores de las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ (cel/ul y %) y la relación CD4+/CD8+ en una población de donadores (n = 70) que acuden al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS

Tipo Celular	Media (cel/ul)	DS	Intervalo 95 %	Media (%)	DS	Intervalo 95 %
CD4+	897	246	415 - 1378	38.5	6.5	25.8 - 51.2
CD8+	602	235	142 - 1063	25.7	7.1	11.8 - 39.6
CD4+/CD8+ *	1.7	0.6	0.4 - 2.9	-	-	-

\* Valores CD4+/CD8+ en % no aparecen en la tabla ya que son idénticos a los calculados usando cel/ul

En la tabla III se presentan los valores para los subgrupos hombres y mujeres, así mismo, se indica si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de hombres y mujeres. El valor para linfocitos CD4+ (cel/ul) en hombres fue de  $841 \pm 197$  con intervalo de 454 a 1227 (como intervalo al 95 % =  $X \pm 1.96 DS$ ), en mujeres de  $953 \pm 274$  con intervalo de 415 a 1491. El valor para linfocitos CD8+ (cel/ul) en hombres fue de  $637 \pm 267$  con intervalo de 113 a 1160, en mujeres de  $568 \pm 192$  con intervalo de 192 a 944. El análisis de los resultados mediante la prueba de t de Student permitió establecer que la relación CD4+/CD8+ para mujeres fue mayor que para los hombres ( $P \leq 0.014$ ), mientras que no existió diferencia significativa entre los valores de linfocitos CD4+ ( $P \leq 0.091$ ) y CD8+ ( $P \leq 0.180$ ). Los valores para cada uno de los donantes incluidos en el estudio se presentan en los anexos No. 6 y No. 7.

**Tabla III.** Valores de las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ (cel/ul y %) y la relación CD4+/CD8+ de los subgrupos hombres (n = 35) y mujeres (n = 35) de una población de donadores que acuden al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS

Tipo celular	Hombres				Mujeres				Diferencia** (P < 0.05)
	Media (cel/ul)	DS	Media (%)	DS	Media (cel/ul)	DS	Media (%)	DS	
CD4+	841	197	36.4	5.9	953	274	40.6	7.2	Ns
CD8+	637	267	26.7	6.7	568	192	24.7	6.4	Ns
CD4+/CD8+ *	1.5	0.6	-	-	1.8	0.7	-	-	S

\* Valores CD4+/CD8+ en % no aparecen en la tabla ya que son idénticos a los calculados usando cel/ul

\*\* s: existe diferencia significativa, ns: no existe diferencia significativa

## VIII DISCUSION DE RESULTADOS

Los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ son muy útiles para evaluar el estado inmunológico de un individuo y para dar seguimiento al desarrollo de ciertas enfermedades. Por lo anterior cada día se obtiene mayor información en relación a la función de las diferentes poblaciones de linfocitos, lo que ha permitido conocer mejor sus interacciones e identificar nuevos marcadores con valor diagnóstico y pronóstico. Para poder establecer con exactitud cuando un paciente tiene recuentos anormales de estos linfocitos es indispensable disponer de valores de una población sana, los cuales pueden ser usados como una referencia (30-34).

Por aparte, cuando una metodología como la citometría de flujo se está implementando en un laboratorio institucional para dar seguimiento a pacientes con enfermedades inmunológicas, es frecuente obtener valores bajos en los recuentos linfocitarios. Esta metodología fue implementada en el Laboratorio del Hospital de Enfermedades IGSS para dar seguimiento a pacientes con SIDA, durante los primeros análisis se obtuvieron frecuentemente conteos muy bajos, incluso de 4 cel CD4+/ul. Valores de esta magnitud causan dudas sobre el adecuado manejo y procesamiento de la muestra, así como del buen funcionamiento y manejo del equipo y programas de computación. Por esta razón es recomendable hacer estudios con personas sanas con el fin de establecer los intervalos de referencia para el laboratorio. Los dos aspectos mencionados anteriormente motivaron la realización de este estudio.

La presente investigación tuvo como propósito generar datos sobre los valores de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ de una población adulta sana de Guatemala, para establecer los valores de referencia del laboratorio donde se realizó el estudio y proporcionar alguna referencia para la población guatemalteca. Para promover uniformidad entre los diferentes laboratorios al establecer sus intervalos de referencia, varios autores como McCoy y Overton en 1994 han recomendado hacer especial énfasis en incluir una descripción clara de las variables biológicas (edad, sexo, raza) y de las técnicas empleadas; también se considera de importancia que los datos sean presentados en un formato uniforme, para que puedan ser analizados por otros investigadores interesados (35). Todas estas consideraciones se discuten a continuación.

Para lograr cierta homogeneidad en el estado de salud y el factor biológico edad en los sujetos incluidos en el presente estudio, se aprovechó la afluencia de donadores que asistieron voluntariamente al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS. Las 70 personas estudiadas poseen características similares en cuanto al estado de salud, ya que todas ellas cumplieron satisfactoriamente con las pruebas que el Banco de Sangre realiza para aceptar a los donadores. La edad estaba comprendida entre los 19 y 45 años, por lo que representan una población de adultos jóvenes. Debido a que el género también es otra fuente de variabilidad, la muestra se integró con igual número de hombres y mujeres ( $n = 35$ ); en general las mujeres eran mayores que los hombres (medias de 32 y 27 años, respectivamente), sus edades estaban más dispersas (desviaciones estándar de 5.8 vrs 7.5 años) y distribuidas en un rango mayor (20-45 vrs. 19-42). A pesar de no haber realizado un estudio al respecto, fue

posible apreciar que todos los donadores pertenecían a la clase media y presentaban un estado nutricional adecuado. Ninguno de los participantes era de raza negra, oriental o caucásica, por lo que el grupo se puede considerar como representativo de la población mestiza de Guatemala. En su mayoría, los participantes eran originarios de la ciudad capital pero también se incluyeron personas originarias de los municipios de Mixco, Amatitlán, Escuintla y Chimaltenango, entre otros. Aunque el número de muestra es relativamente reducido se puede considerar representativo; Reichert y colaboradores en 1991 demostraron que con una muestra integrada por 50 individuos se pueden establecer de manera confiable los intervalos de referencia de subpoblaciones linfocitarias (36).

Dentro de las variables técnicas consideradas en este estudio se pueden mencionar: el método de preparación de las células, el anticoagulante empleado y las características de los anticuerpos utilizados. El método empleado está estandarizado para sangre completa, colectada con EDTA como anticoagulante, la cual se lisa posteriormente. Se utilizan para el mismo tres anticuerpos monoclonales comerciales, cada uno de ellos conjugado con un fluorocromo distinto. Para la determinación de linfocitos T se emplea un anticuerpo anti CD3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), para los linfocitos T ayudadores/inductores un anti CD4 con ficoeritrina (PE) o en el caso de los linfocitos T citotóxicos/supresores un anti CD8 con PE y para los linfocitos totales un anti CD45 con peridina clorofil proteína (PerCP). El uso de anticuerpos monoclonales con tres fluorocromos distintos permite obtener simultáneamente la lectura de tres parámetros diferentes, con lo que se conoce con exactitud la identidad celular. Esto permitió excluir los monocitos que también expresan el antígeno CD4 pero no el CD3 y las células asesinas naturales (NK) que expresan CD8 pero no el CD3.

El análisis de las lecturas de fluorescencia de los anticuerpos conjugados descritos, fue realizado por medio de un programa de computación (FACSMultiSET) que genera algoritmos como los que se muestran en el anexo No. 5. El algoritmo o gráfica generada con las fluorescencias del anticuerpo anti CD45 conjugado con PerCP (CD45-PerCP) en el eje X y la granularidad celular (SSC-H) en el eje Y, permite localizar con precisión una región que representa la población de linfocitos. Con la gráfica CD3-FITC vs. CD4-PE, se determinan las subpoblaciones de linfocitos T y de linfocitos T ayudadores/inductores (CD4+); con CD3-FITC vs. CD8-PE, se determinan las subpoblaciones de linfocitos T y de linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8+). Con la gráfica CD3-FITC vs. SSC-H, se identifican las subpoblaciones de linfocitos T CD4+CD3+ y el resto de linfocitos (CD3-CD4-). El programa mencionado realiza recuentos a partir de las gráficas descritas y reporta los resultados de la siguiente manera: conteo absoluto de linfocitos CD4+ (cél/ul), conteo absoluto de CD8+ (cél/ul), porcentaje de la subpoblación CD4+ en relación al número total de linfocitos (%CD4+) y porcentaje de la subpoblación CD8+ en relación al número total de linfocitos (%CD8+) (25). El valor absoluto (cél/ul) facilita al médico la interpretación de los resultados y a tomar decisiones sobre el tratamiento, mientras que los resultados expresados como porcentaje de células permite la comparación con los valores disponibles en la literatura; por esta razón los resultados obtenidos en esta investigación se presentan en los dos formatos mencionados.

Las probables fuentes de error para la técnica empleada pueden ser: el manejo inadecuado de la muestra, los errores humanos de pipeteo y la calibración inadecuada del sistema óptico del



citómetro. Para evitar problemas debido a destrucción celular, las muestras fueron procesadas dentro de las 24 horas siguientes a su toma, mantenidas en la oscuridad y a temperatura ambiente, ya que muestras expuestas a la luz o refrigeradas previamente a su tinción producen resultados erróneos (22, 23). También se evitó usar muestras con hemólisis, siguiendo las recomendaciones del fabricante de los reactivos. Para evitar errores durante la adición de los reactivos se utilizó la técnica del pipeteo inverso, así como la agitación vortex de reactivos y muestras antes del pipeteo, para permitir una mezcla homogénea. La agitación vortex se repitió continuamente entre cada una de las etapas del procesamiento. El no cumplir estrictamente con la agitación vortex, es una de las principales fuentes de error humano.

En cuanto a las fuentes de error instrumentales se puede mencionar la mala calibración del sistema óptico, especialmente en relación a los fotomultiplicadores y compensaciones de fluorescencia. Para evitar esta fuente de error, previamente al análisis de las muestras teñidas, se realizó un ajuste automático del citómetro colocando microesferas que contenían los distintos fluorocromos utilizados en el análisis de las muestras. El citómetro empleado (Becton Dickinson modelo FACSCalibur serie E2890) está controlado por un programa de computación (FACSComp. versión 2.0), el cual realiza automáticamente los ajustes del voltaje del tubo fotomultiplicador, la compensación de las fluorescencias y la sensibilidad del test. Los valores que el programa asigna automáticamente, pueden ser posteriormente optimizados manualmente. Si alguno de los valores está fuera de los rangos con los que opera el equipo, al cargar el programa de computación para el análisis de las muestras aparece una "señal de error"; en ese caso se debe repetir el ajuste del aparato. El ajuste se realizó cada vez que se analizaron muestras. Una vez realizada la calibración, se procedió al análisis de muestras controles a las que, una vez procesadas, se les agregaba cantidades conocidas (baja =  $47.7 \pm 8.5$ , media =  $240.9 \pm 14.7$  y alta =  $976.7 \pm 44.6$ ) de microesferas de control. Los conteos absolutos para las microesferas de control debían estar dentro del rango especificado por el fabricante para el lote utilizado. Si los valores obtenidos para los controles estaban fuera de los rangos, el software que controla el equipo emitió automáticamente un mensaje que indicaba que el control de calidad estaba fuera de rango.

Cuando la determinación de las subpoblaciones linfocitarias se realiza por citometría de flujo, usando los procedimientos, reactivos, controles de calidad y el equipo descritos en este trabajo, el método es lineal para concentraciones de linfocitos CD4+ en el rango de 68 a 7200 cel/ul y para CD8+ en el rango de 43 a 3900 cel/ul, en ambos casos cuando la concentración total de linfocitos está entre 200 y 16700 cel/ul. La reproducibilidad del método es alta, con coeficientes de variación de 1.9 % (CV = 100 DS/X) para CD4+ y 4.5 % para CD8+. Lo anterior indica que los resultados obtenidos son confiables (22, 23).

Los resultados obtenidos para la población estudiada indican que los valores de linfocitos CD4+ están dentro del intervalo de 415 a 1378 cel/ul o de 26 a 51 %, cuando se expresan como porcentaje en relación al total de linfocitos y los valores de linfocitos CD8+ en el intervalo de 142 a 1063 cel/ul o 12 a 40 %. El intervalo de la relación CD4+/CD8+ fue de 0.4 a 2.9. Los hombres presentaron valores menores que las mujeres para linfocitos CD4+, pero mayores para los linfocitos CD8+, en ambos casos estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. Sin embargo, al realizar la división CD4+/CD8+, los valores mayores de

CD4+ y menores de CD8+ hacen que estas diferencias en los valores se acentuen, lo que determinó que la diferencia entre hombres y mujeres en la relación CD4+/CD8+ fuera estadísticamente significativa, con una probabilidad menor o igual a 0.014. Los valores de CD4+, CD8+ y la relación CD4+/CD8+ aquí descritos, pueden ser considerados como "característicos" para la población estudiada y están determinados por factores raciales, etarios, alimenticios y ambientales.

El valor de la relación CD4+/CD8+ es directamente proporcional a los valores de CD4+ y apoya el significado clínico de los conteos absolutos de CD4+. Los valores de CD4+ son mayores para las mujeres, aunque no estadísticamente significativos. Esta diferencia no puede ser explicada en función de otras variables biológicas, ya que la composición etaria, racial y nutricional de los subgrupos hombres y mujeres fue muy parecida. De manera similar, se han reportado valores mayores de CD4+ para las mujeres de una población mexicana, sin que la diferencia sea estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (1). Lo anterior podría reflejar una mayor ventaja de las mujeres para enfrentar enfermedades inmunológicas, lo cual estaría en concordancia con la creencia de que las mujeres son más resistentes a las enfermedades.

Otro de los factores biológicos de interés es el racial. Las variaciones inherentes a la raza no han sido estudiadas en nuestro medio, ni se han hecho comparaciones entre poblaciones guatemaltecas y de otros países o regiones. Los resultados de este estudio se compararon con valores de tres poblaciones distintas: mexicanos, caucásicos y árabes. La primera de ellas formada por 50 estudiantes universitarios mexicanos (25 hombres y 25 mujeres), sanos, de 20 a 30 años (1). La población caucásica correspondía a un grupo estadounidense de 50 sujetos de ambos sexos, sanos, de 18 a 70 años (36). La tercera integrada por 50 donadores de sangre de Arabia Saudita (11). En todos estos estudios se utilizaron muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante, la misma técnica de lisis y la citometría de flujo para realizar el conteo. Estos estudios reportan los resultados como porcentajes de linfocitos CD4+ o CD8+ en relación al número total de linfocitos (%CD4+ y %CD8+, respectivamente), así como la relación CD4+/CD8+.

Los valores ( $X \pm DS$ ) de %CD4+ fueron: grupo de guatemaltecos estudiados  $30.5 \pm 6.5$ , mexicanos  $37.8 \pm 4.7$ , caucásicos  $43.0 \pm 7.5$  y árabes  $42.0 \pm 6.0$ ; los %CD8+ fueron: guatemaltecos  $25.7 \pm 7.1$ , mexicanos  $32.4 \pm 5.9$ , caucásicos  $33.0 \pm 7.5$  y árabes  $42.0 \pm 7.0$  y la relación CD4+/CD8+: grupos de guatemaltecos  $1.7 \pm 0.6$ , mexicanos  $1.2 \pm 0.3$ , caucásicos  $1.4 \pm 0.6$  y árabes  $1.1 \pm 0.3$ . Para facilitar la comparación se calcularon los intervalos de confianza ( $IC = X \pm 1.96 DS / \sqrt{n}$ , nivel de confianza  $\gamma = 95\%$ ). Estos intervalos se muestran en la tabla IV y se representan gráficamente en la figura No. 15, donde se pone en evidencia que existe un entrecruzamiento claro entre los guatemaltecos y mexicanos para los valores de %CD4+. Para los valores de %CD8+ y la relación CD4+/CD8+ no existe entrecruzamiento entre los guatemaltecos y el resto de poblaciones. Este comportamiento se explicaría por las similitudes raciales existentes entre guatemaltecos y mexicanos, así como por las diferencias entre esta y las razas caucásicas y árabes.

**Tabla IV.** Intervalos de confianza (IC) de los valores de %CD4+, %CD8+ y la relación CD4+/CD8+ para la población estudiada y poblaciones de otros países

INTERVALOS DE CONFIANZA ( $\gamma = 95\%$ )				
Tipo Celular	Guatemaltecos	Mexicanos (1)	Caucásicos (36)	Arabes (11)
CD4+	37.0 - 40.0	36.5 - 39.1	40.9 - 45.1	40.3 - 43.7
CD8+	24.0 - 27.4	30.8 - 34.0	30.9 - 35.1	40.1 - 43.9
CD4+/CD8+	1.6 - 1.8	1.1 - 1.3	1.2 - 1.6	1.0 - 1.2

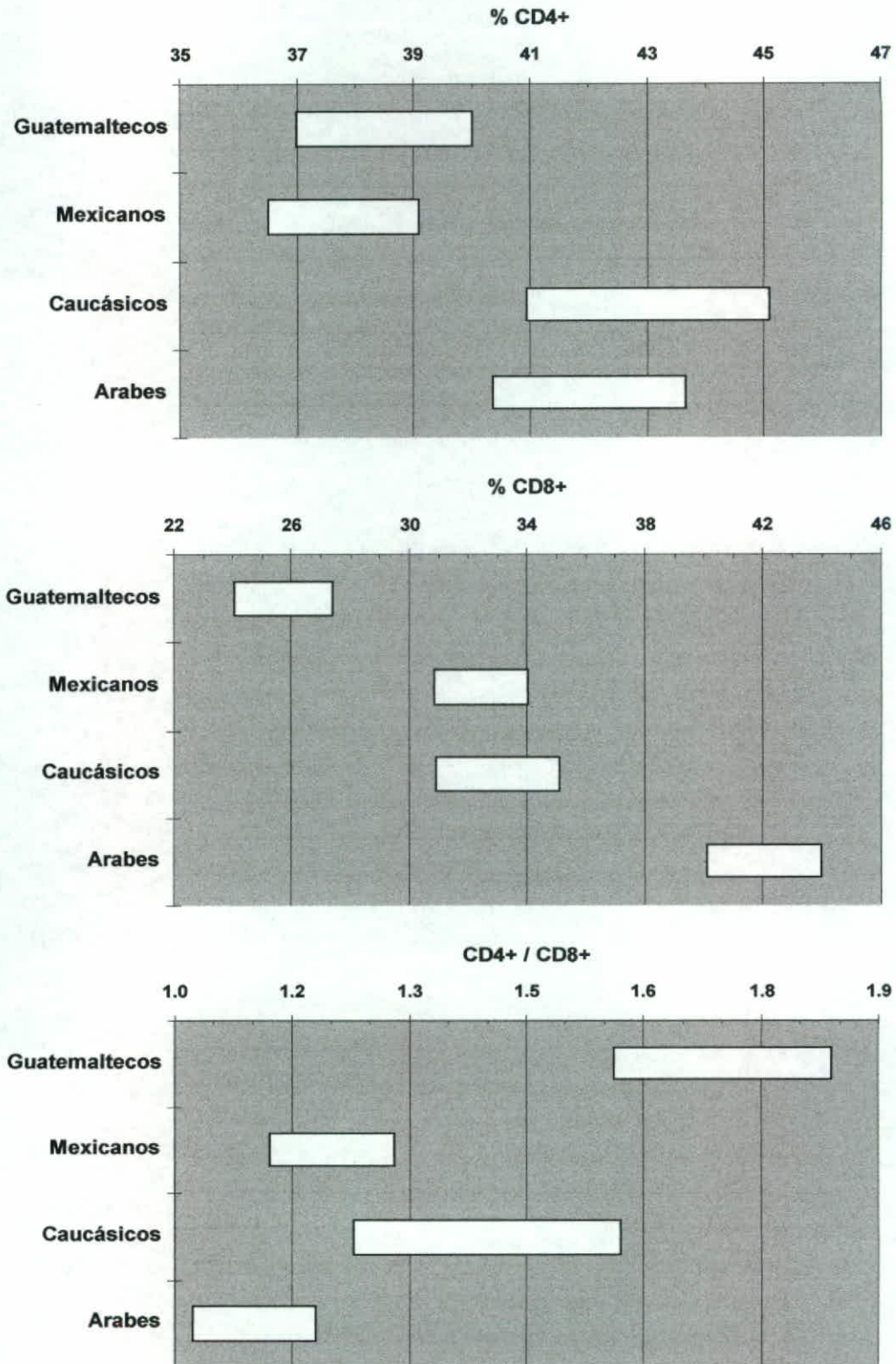


Figura No. 15. Comparación gráfica de los intervalos de confianza de %CD4+ (arriba), %CD8+ (centro) y relación CD4+/CD8+ (abajo) para la población estudiada, mexicanos, caucásicos y árabes.

## IX CONCLUSIONES

La población de donadores que acuden al Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades IGSS, presentaron valores de linfocitos CD4+ (cel/ul) de  $897 \pm 246$ , para CD8+ (cel/ul) de  $602 \pm 235$  y de  $1.7 \pm 0.6$  para la relación CD4+/CD8+.

El grupo de mujeres de la población estudiada, tuvieron valores de linfocitos CD4+ (cel/ul) de  $953 \pm 274$ , para CD8+ (cel/ul) de  $568 \pm 192$  y para la relación CD4+/CD8+ de  $1.8 \pm 0.7$ . Para el grupo de hombres, los valores de linfocitos CD4+ (cel/ul) fueron de  $841 \pm 197$ , para CD8+ (cel/ul) de  $637 \pm 267$  y para la relación CD4+/CD8+ de  $1.5 \pm 0.6$ .

No existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los valores de linfocitos CD4+ y CD8+ (cel/ul) de hombres y mujeres. La relación CD4+/CD8+ para hombres y mujeres es diferente estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

Los valores del %CD4+ de la población estudiada son similares a los de la mexicana, pero menores a los de las poblaciones caucásica y árabe. Los valores del %CD8+ de la población estudiada son menores a los de las poblaciones mexicana, caucásica y árabe, los valores de la relación CD4+/CD8+ son mayores.

## X RECOMENDACIONES

Se recomienda al Laboratorio Clínico del Hospital General de Enfermedades IGSS emplear de rutina los valores reportados en esta tesis como valores de referencia para comparar los resultados obtenidos en las determinaciones de poblaciones linfocitarias.

Se recomienda que los médicos tomen en consideración los valores reportados en este estudio, como base de comparación para la evaluación clínica y el diagnóstico de pacientes guatemaltecos.

Realizar este tipo de investigaciones en infantes para identificar las diferencias relacionadas con la edad, debido a que este es un factor biológico de importancia en el estudio de las subpoblaciones linfocitarias.

Incluir la Citometría de Flujo como tema en los programas de formación y actualización del Químico Biólogo

## XI REFERENCIAS

- 1) Ortiz R., *et al.* Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: Estudio por medio de citometría de flujo. *Bioquímica* 1999;24(1-94):18-22.
- 2) Orfao A., González de Buitrago JM. La citometría de flujo en el Laboratorio Clínico. España: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 1995. 83p. (pp.31-35)
- 3) Castro ME. Determinación cuantitativa de linfocitos CD4+ en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación Químico Biólogo), 1994. 90p.
- 4) Stewart S. Inmunología, Inmunopatología e Inmunidad. 2 ed. Carsolio R. trad. México: Harla Harper & Row Latinoamericana, 1981. 386p. (pp.1,11)
- 5) Rowlands DT. Jr., Wiener D., Bolton TA., Muus CJ. Células del sistema inmunitario. (pp. 817-831) En: Henry JB. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9 ed. Fontán Fontán F. trad. Barcelona, España: Masson, 1998. XXIX+1509p.
- 6) Nelson DA., Davey FR. Hematopoyesis. (pp. 621-645) En: Henry JB. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9 ed. Fontán Fontán F. trad. Barcelona, España: Masson, 1998. XXIX+1509p.
- 7) Stites DP. Métodos de laboratorio clínico para detección de inmunidad celular. (pp.293-316) En: Stites DP., Terr AI. Inmunología básica y clínica. 7 ed. Ramírez JA. trad. México: El Manual Moderno, 1993. 1055p.
- 8) Lewis L. Células de la respuesta inmunitaria: Linfocitos y fagocitos mononucleares. (pp. 65-77) En: Stites DP., Terr AI. Inmunología básica y clínica. 7 ed. Ramírez JA. trad. México: El Manual Moderno, 1993. 1055p.
- 9) Davey FR., Nelson DA. Trastornos leucocitarios. (pp. 699-738) En: Henry JB. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9 ed. Fontán Fontán F. trad. Barcelona, España: Masson, 1998. XXIX+1509p.
- 10) Strauss K., *et al.* Evaluación del sistema inmune con relación al seguimiento de pacientes con VIH. *Clinical Notes de Becton Dickinson No. 1.* Becton Dickinson, San José California, USA, 1999. 15p.
- 11) Shahabuddin S. Quantitative differences in CD8+ lymphocytes, CD4/CD8 ratio, NK cells, and HLA-DR(+)-activated Tcells of racially different male populations. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75(2):168-170.

- 12) Stevens RW., McQuillan GM. Diagnóstico serológico de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de la hepatitis B (VHB). (pp. 939-947) En Henry JB. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9 ed. Fontán Fontán F. trad. Barcelona, España: Masson, 1998. XXIX+1509p.
- 13) Kam KM., *et al.* Lymphocyte subpopulation reference ranges for monitoring human immunodeficiency virus-infected Chinese adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(3):326-330.
- 14) Larrea L., *et al.* Lymphocyte subsets in blood donors. *Sangre (Barc)* 1998;43(5):380-4.
- 15) Roman S. *et al.* Lymphocyte subset reference ranges in Romanian adult Caucasians. *Rom J Intern Med* 1995;33(1-2):27-36.
- 16) Santagostino A., *et al.* An italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999;84(6):499-504.
- 17) Shahabuddin S., al Ayed IH., el-Rad MO., Qureshi MI. Lymphocyte subset reference ranges in healthy Saudi Arabian children. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9(1):44-48.
- 18) Vithayasai V., Sirisanthana T., Sakonwasun C., Suvanpiyasiri C. Flow cytometric analysis of T-lymphocytes subsets in adult Thais. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1997;15(3):141-146.
- 19) Monteseirin J. *et al.* The suty cellular subpopulations in peripheral blood from a normal reference goup population (blood donors). *Allergol Immunopathol* 1992;20(1):9-12.
- 20) BD Biosciences Immunocytometry Products. 1999 Catalog. Becton Dickinson, San José California, USA, 1999. 201p. (Doc. Tec. 4/99 23-3927-00)
- 21) Nicholson JKA., Jones BM., Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry* 14:685-689.
- 22) Becton Dickinson. Información del reactivo TriTEST CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP. Becton Dickinson, San José California, USA, 1998. (Doc. Tec. 7/98 23-3027-02)
- 23) Becton Dickinson. Información del reactivo TriTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP. Becton Dickinson, San José California, USA, 1998. (Doc. Tec. 7/98 23-3519-01)
- 24) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1997;46(No.RR-2):1-29.



- 25) Becton Dickinson. Operator Training Manual. FACSCalibur, FACSort, FACScan. Becton Dickinson, San José California, USA, 1999. s/n. (Doc. Tec. 11-10985-00)
- 26) Becton Dickinson. Información del reactivo CaliBRITE Beads. Becton Dickinson, San José California, USA, 1998. (Doc. Tec. 7/98 23-3172-02)
- 27) Kunki A. Flow cytometric immunophenotyping of HIV infected subjects and quality control. Departmente of Immunology, San Martino Hospital, Genoa, 1997. 8p. Tomado de <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/cdrom/table3.htm> (agosto 1997)
- 28) Becton Dickinson. Información del reactivo Controles TruCOUNT. Becton Dickinson, San José California, USA, 1998. (Doc. Tec. 12/98 23-3682-01)
- 29) Roitt I., Brostoff J., Male D. Inmunología. 4 ed. Diorki Servicios Integrales. trads. España: Harcourt Brace, 1997. s/n.
- 30) Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. Surface activation markers of T lymphocytes: role in the detection of infection in neonates. *Clin Exp Immunol* 1998;113(1):33-8.
- 31) Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, et al. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 1998;28(1):84-90.
- 32) Kazi N, Radvány R, Oldham T, Keshavarzian A, et al. Immunomodulatory effect of beta-carotene on T lymphocytes subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. *Nutr Cancer* 1997;28(2):140-5.
- 33) Mikyas Y, Aziz H, Harawa NN, Gprre M, et al. Immunologic activation during pregnancy: serial measurement of lymphocyte phenotype and serum activation molecules in HIV-infected and uninfected women. *J Reprod Immunol* 1997;33(2):157-70.
- 34) Ohnishi K, Yamanishi H, Naito K, Utsumi M, et al. Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the lon-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1998;12(1):52-8.
- 35) McCoy JP, Overton WR. Quality control in flow cytometry for diagnostic pathology:II. A conspectus of reference ranges for lymphocyte immunophenotyping. *Cytometry* 1994;18:129-39.
- 36) Reichert T, De Bruyere M, Deneys V, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clinical Immunology Immunopathology* 1991;60:190-208.

## XII ANEXOS

**ANEXO No. 1**

## ANEXO No.1

### PROTOCOLO DE INCLUSION/ EXCLUSION DE DONADORES QUE ACUDEN AL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL GENERAL DE ENFERMEDADES I.G.S.S.

Para que un individuo pueda donar sangre en el Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades, debe llenar los siguientes requisitos:

- Presentarse a las 7:00 horas en punto
- En completo ayuno
- Presentar su cédula de vecindad
- No haber padecido de :
  - Dengue
  - Hepatitis
  - Paludismo
- No tener tatuajes en la piel
- Gozar de buena salud física y mental
- Mantener presión arterial normal
- Tener peso mínimo de 120 libras
- Edad:
  - Para hombres de 18-45 años
  - Para mujeres de 18-45 años
- Que no estén embarazadas
- Que no estén en período de lactancia
- Las extracciones de sangre se realizan únicamente de lunes a viernes
- Luego de la entrevista y el examen físico se toma una muestra un tubo con anticoagulante EDTA y dos tubos de sangre coagulada y se procede a realizarle las siguientes pruebas
- Hematología
- Grupo y Rh
- Rastreo de Anticuerpos
- Se extrae la unidad y se siguen procesando las pruebas
- Dos pruebas de HIV Antígeno p24
- Dos pruebas de HIV Anticuerpos
- Dos pruebas de Hepatitis B antígeno de superficie (HBsAg)
- Dos pruebas de Hepatitis B antígeno de núcleo (core-total)
- Dos pruebas de Hepatitis C (HCV)
- Dos pruebas de Anticuerpos contra el antígeno de superficie (AUSAB)
- Dos pruebas de HTLV 1 y 2
- Dos pruebas de chagas
- Dos pruebas de sífilis
- Dos pruebas de Citomegalovirus IgM

**ANEXO No. 2**



IGSS  
Instituto Guatemalteco de  
Seguridad Social

# BANCO DE SANGRE

## HOSPITAL GENERAL DE ENFERMEDADES

DONADOR No. \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

### INTERROGATORIO AL DONANTE DE SANGRE

#### ESTIMADO DONANTE DE SANGRE

Ante todo, le agradecemos su solidaria concurrencia y colaboración. Nuestra principal preocupación es proteger al receptor de su sangre, como también a usted mismo. Por lo tanto a veces nos vemos impedidos de aceptar una donación. Para saber si usted está en condiciones de donar, le rogamos contestar verídicamente el siguiente cuestionario **confidencial**.

Por favor tenga en cuenta que el objetivo de este interrogatorio, al que usted se somete voluntariamente, no es discriminatorio sino que pretende preservar la salud del enfermo que recibe su sangre.

Tratamos de hacerle comprender que si usted estuvo expuesto a situaciones de riesgo que internacionalmente son consideradas como posibles causas de contraer enfermedades transmisibles por sangre, no debería donar.

Si usted no nos puede decir la verdad, por favor, avísenos mientras dona, marcando la ficha confidencial que se le entregará para que no utilicemos su sangre.

Puede usted retirarse sin entregar este formulario si no está de acuerdo con algunas de las preguntas.

#### CUESTIONARIO

#### **MARQUE CON UNA X LA RESPUESTA CORRECTA**

1.	Leyó detenidamente la hoja de información que se le entregó en la sala de espera?	SI	NO
2.	Actualmente, se siente usted bien y goza de buena salud?	SI	NO
3.	Alguna vez ha donado sangre, plaquetas o plasma? Dónde? Cuándo?	SI	NO
4.	Alguna vez ha sido rechazado como donante?	SI	NO
5.	Está usted bajo régimen de dieta?	SI	NO
6.	Ha ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 48 horas?	SI	NO
7.	Tiene gripe, tos, dolor de garganta o dificultad para respirar hoy?	SI	NO
8.	Sufre mareos, pérdida de conocimiento o ataques epilépticos?	SI	NO
9.	Tiene problemas de presión arterial?	SI	NO
10.	Padece usted de cáncer, leucemia, tumores o quistes?	SI	NO
11.	Padece de alguna enfermedad renal?	SI	NO
12.	Padece de alguna enfermedad del hígado?	SI	NO
13.	Alguna vez ha tenido angina (dolor) de pecho, infarto, enfermedades del corazón o pulmón?	SI	NO
14.	Ha tenido enfermedades de la sangre, hemofilia, hemorragias, cáncer o diabetes insulino-dependiente?	SI	NO

15.	Ha tenido ictericia (piel amarilla), hepatitis, o análisis positivos de hepatitis?	SI	NO
16.	Ha tenido enfermedad de Chagas, Brucelosis, Toxoplasmosis o análisis positivos para las mismas?	SI	NO
17.	Ha padecido de tuberculosis?	SI	NO
18.	Ha recibido hormonas de crecimiento de origen humano, o tuvo usted, o algún pariente la enfermedad de Creutzfeld-Jakob?	SI	NO
19.	Tuvo usted paludismo en los <b>últimos tres años</b> , recibió medicamentos antipalúdicos o estuvo en el último año en países donde existe esta enfermedad?	SI	NO
20.	En los <b>últimos 12 meses</b> estuvo bajo tratamiento médico o fue operado de alguna afección seria?	SI	NO
21.	Ha recibido transfusiones de sangre, plasma o trasplante de órganos? Cuándo?	SI	NO
22.	En los <b>últimos 12 meses</b> le han hecho tatuajes, acupuntura, perforación de oreja o pinchadura accidental con aguja de inyección?	SI	NO
23.	En los <b>últimos 12 meses</b> estuvo en estrecho contacto con personas que tuvieron ictericia o hepatitis o ha recibido Gamma Globulina específica contra hepatitis?	SI	NO
24.	En los <b>últimos 12 meses</b> recibió vacunación contra: rabia, hepatitis, tétanos?	SI	NO
25.	Tuvo o fue tratado por sífilis, gonorrea u otras infecciones genitales en los <b>últimos 12 meses</b> ?	SI	NO
26.	En los <b>últimos 12 meses</b> le pagó a alguien para tener relaciones sexuales?	SI	NO
27.	En los <b>últimos 12 meses</b> tuvo relaciones sexuales con alguien que usaba drogas?	SI	NO
28.	Alguna vez recibió dinero o drogas para tener relaciones sexuales?	SI	NO
29.	<b>Para mujeres:</b> Estuvo embarazada en las últimas 6 semanas (parto o aborto) o lo está ahora?	SI	NO
30.	<b>Para mujeres:</b> Está menstruando el día de hoy?	SI	NO
31.	<b>Para mujeres:</b> Está usted dando de lactar (de mamar)?	SI	NO
32.	En las <b>últimas 4 semanas</b> estuvo tomando alguna medicación?Cuál?	SI	NO
33.	En las <b>últimas 4 semanas</b> recibió vacunas o inmunizaciones? Cuáles?	SI	NO
34.	En los <b>últimos 3 días</b> tomó aspirina, o alguna medicación que la contenga u otros calmantes?	SI	NO
35.	En las <b>últimas 24 horas</b> le han hecho algún tratamiento dentario?	SI	NO
36.	Usó o usa drogas inyectables u otras, o tuvo relaciones sexuales con alguien que las usaba, en los <b>últimos 12 meses</b> ?	SI	NO
37.	<b>Para hombres:</b> Tuvo usted relaciones sexuales con otro hombre?	SI	NO
38.	<b>Para mujeres:</b> En los <b>últimos 12 meses</b> , tuvo usted relaciones con un hombre que a su vez tuvo relaciones sexuales con otro hombre?	SI	NO
39.	En los <b>últimos 12 meses</b> tuvo usted o su pareja, relaciones sexuales con otras personas?	SI	NO
40.	Tiene usted SIDA o un análisis positivo de VIH?	SI	NO
41.	Tuvo relaciones sexuales, en los <b>últimos 12 meses</b> , con alguien que tenía SIDA, o análisis positivos de VIH, Hepatitis B y C?	SI	NO
42.	Alguna vez usó una aguja para inyectarse alguna droga, aunque sea una sola vez?	SI	NO
43.	Alguna vez recibió concentrados de Factores de coagulación por una hemorragia o tuvo relaciones sexuales con alguien que las recibió, en los <b>últimos 12 meses</b> ?	SI	NO
44.	Ha tenido relaciones sexuales con personas que necesitan frecuentemente transfusiones sanguíneas o diálisis?	SI	NO
45.	Dona usted sangre solamente para que se le haga el análisis de SIDA?	SI	NO
46.	Tuvo pérdida de peso inexplicable, manchas rosadas en la piel, fiebre por más de 10 días, sudores nocturnos, diarreas, manchas blancas en la boca, ganglios grandes?	SI	NO
47.	Sabe usted que si es portador del virus SIDA, usted lo puede contagiar aún estando aparentemente sano y ser negativo en los análisis de SIDA?	SI	NO
48.	Recibió usted dinero o alguna otra compensación para donar sangre?	SI	NO
49.	Estuvo usted detenido en una cárcel en el <b>último año</b> ?	SI	NO
50.	Leyó y comprendió usted este cuestionario y fueron contestadas todas sus dudas al respecto?	SI	NO

Si usted dona bajo presión familiar y piensa que no debemos transfundir su sangre, utilice algunos de los medios que le proponemos para notificarnos antes que la usemos.

Nos autoriza a llamarlo a donar sangre en caso de urgencia? SI (      ) NO (      )

### **DECLARACION Y CONSENTIMIENTO DEL DONANTE**

Yo \_\_\_\_\_  
quien me identifico con Cédula de Vecindad No. de Orden \_\_\_\_\_ , No. de Registro \_\_\_\_\_  
extendida en \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Teléfono particular: \_\_\_\_\_ Teléfono laboral: \_\_\_\_\_  
Dirección para la notificación: \_\_\_\_\_

**Dono voluntariamente** mi sangre y consiento que se me extraiga la cantidad adecuada de sangre que será estudiada y utilizada como el servicio considere apropiado. Se me dió la oportunidad de preguntar lo que yo considero necesario para comprender el procedimiento de la donación. Me han preguntado si me considero una persona de riesgo de transmitir SIDA u otras enfermedades. No he recibido dinero ni otra compensación para donar sangre.

**Declaro que contesté sinceramente** todas las preguntas que se me realizaron. Consiento expresamente que se me efectúen las pruebas necesarias para diagnóstico de anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y para detección de otras enfermedades infecciosas transmisibles por la sangre. Dejo constancia de haberseme asegurado debida confidencialidad de los resultados de los estudios, autorizando se me cite para ser informado personalmente por los médicos en caso de alguna anomalía.

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Recibido por \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma y Sello  
del Técnico



**ANEXO No. 3**

### 3-Color Lyse/No Wash FACSComp Report

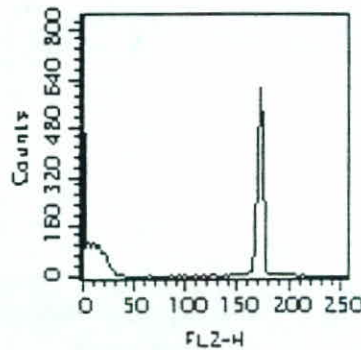
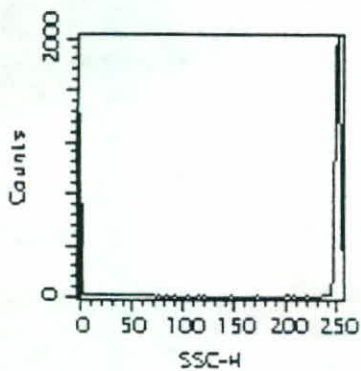
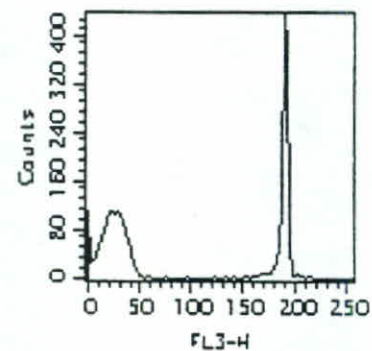
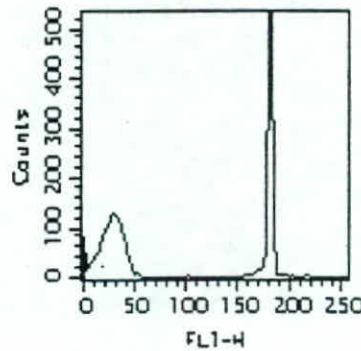
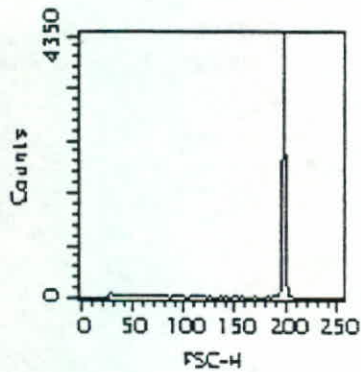
**Institution:** HOSPITAL GENERAL I.G.S.S.  
**Director:** Dra. Ely Ocana  
**Operator:** KARLA MEJIA BONIFAZI

**Date:** Friday, March 24, 2000 10:22 AM  
**Software:** FACSComp 4.1  
**Cytometer:** FACSCalibur E2890

Parameter	High	Low	Separation	Minimum	Result	Lot ID
FSC	195	27	168	100	Pass	14958I
SSC	247	2	245	210	Pass	14958I
FL1	177	26	151	123	Pass	15053K
FL2	168	9	159	135	Pass	15353H
FL3	186	24	162	150	Pass	15051J

Parameter	Detector	Amplifier	Threshold	Blue Laser Current 6.16 Amps
FSC	E00	2.00		Blue Laser Power 14.95 mWatts
SSC	393	1.00		
FL1	610	Log		
FL2	481	Log		
FL3	672	Log	300	

**Compensation** FL1-%FL2 FL2-%FL1 FL2-%FL3 FL3-%FL2  
 0.9 15.0 0.0 12.1



**Comments:**

**ANEXO No. 4**

# HOSPITAL GENERAL I.G.S.S.

## MultiSET™ Lab Report

Director: DRA. ELY OCANA DURAN  
Operator: KARLA MEJIA BONIFAZI

Software: MultiSET V1.1.1  
Cytometer: FACSCalibur (#E2890)

Sample Name: FEMENINO-06  
Sample ID: ZONA 5 (GUATEMALA)  
Case Number: 45 ANOS  
Panel Name: 3/4/45 TruC

Date Acquired: Wed, Mar 22, 2000 10:13 AM  
Date Analyzed: Wed, Mar 22, 2000  
Ref. Range Type: BD

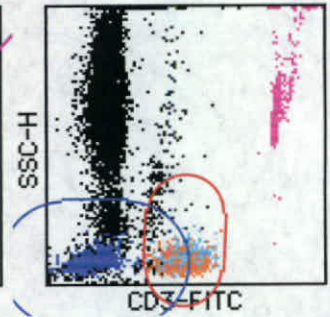
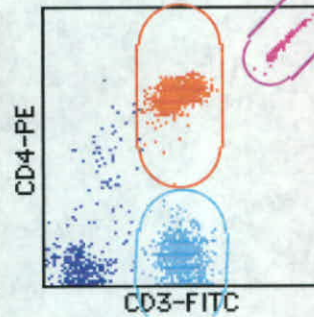
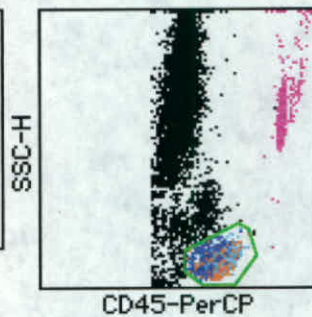
### CD3/CD4/CD45 TruC

Data Set [ 1 ] Data File: FEMENINO-0607.01

Reagent Lot ID: 13198 Events Acquired: 10000  
Beads Per Pellet: 47950

Abs Cnt Bd Lot ID: 10360 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0

Lymph Events	2953
Bead Events	1211
CD3+ %Lymph	68
CD3+ Abs Cnt	1592
CD3+CD4+ %Lymph	39
CD3+CD4+ Abs Cnt	915
CD45+ Abs Cnt	2339



### Multi-tube QC

T Helper/Suppressor Ratio: 0.00

# HOSPITAL GENERAL I.G.S.S.

## MultiSET™ Physician Report

Director: DRA. ELYOCANA DURAN  
 Operator: KARLA MEJIA BONIFAZI

Software: MultiSET V1.1.1  
 Cytometer: FACSCalibur (#E2890)

Sample Name: FEMENINO-06  
 Sample ID: ZONA 5 (GUATEMALA)  
 Case Number: 45 ANOS  
 Panel Name: 3/4/45 TruC

Date Acquired: Wed, Mar 22, 2000 10:13 AM  
 Date Analyzed: Wed, Mar 22, 2000  
 Reference Range Type: BD

Result Name	%/Ratio	Abs Cnt (cells/ $\mu$ L)	Reference Range
T Lymphs % of Lymphs (CD3+/CD45+)	68		55%  84%
T Lymphs (CD3+) Abs Cnt		1592	690  2540
T Helper % of Lymphs (CD3+CD4+/CD45+)	39		31%  60%
T Helper Lymphs (CD3+CD4+) Abs Cnt		915	410  1590
Lymphocyte (CD45+) Abs Cnt*		2339	

\*For quality control purposes only

**Multi-tube QC**

T Helper/Suppressor Ratio: 0.00

Comments:

---



---



---



---



---

Laboratory Director: \_\_\_\_\_

**ANEXO No. 5**

# HOSPITAL GENERAL I.G.S.S.

## MultiSET™ Lab Report

Director: DRA. ELYOCANA DURAN  
 Operator: DRA. GLENDA ESCALANTE DE RAMIREZ

Software: MultiSET V1.1.1  
 Cytometer: FACSCalibur (#E2890)

Sample Name: CONTROLES  
 Sample ID: 01  
 Case Number: 001  
 Panel Name: 3/4/45 Control

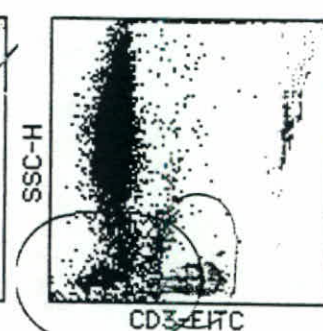
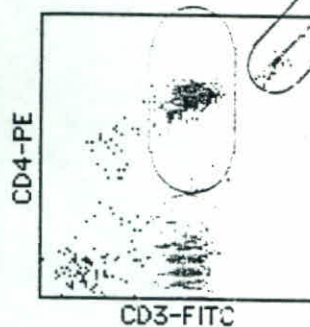
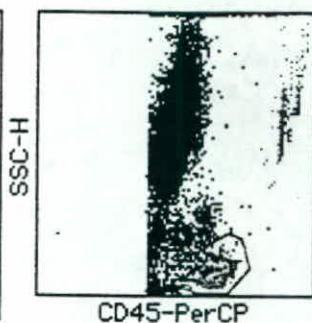
Date Acquired: Tue, Mar 21, 2000 12:51 PM  
 Date Analyzed: Tue, Mar 21, 2000  
 Ref. Range Type: BD

### CD3/CD4/CD45 TruC Ctrl L

Data Set [ 1 ] Data File: CONTROLES01.01

Reagent Lot ID: 13198 Events Acquired: 10000 Abs Cnt Bd Lot ID: 10360 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC C v2.0  
 Beads Per Pellet: 47950 Ctrl Bead Lot ID: 14361 Mean Count: 47 Std Dev: 7.60

Lymph Events	2193
Bead Events	963
Control Bead Events	54
CD3+ %Lymph	79
CD3+ Abs Cnt	1730
CD3+CD4+ %Lymph	34
CD3+CD4+ Abs Cnt	746
CD45+ Abs Cnt	2184
Control Bead Abs Cnt	54



QC Messages:

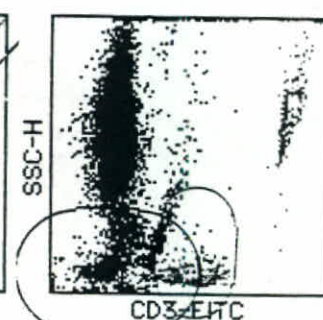
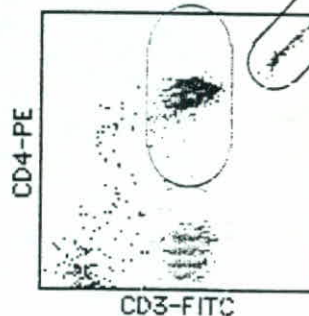
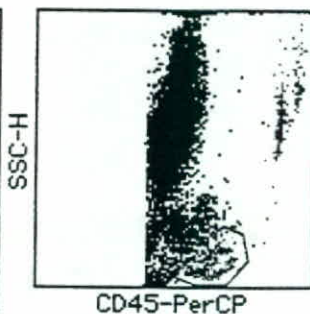
Code 7: Manual Gate is in effect.

### CD3/CD4/CD45 TruC Ctrl M

Data Set [ 1 ] Data File: CONTROLES01.02

Reagent Lot ID: 13198 Events Acquired: 11000 Abs Cnt Bd Lot ID: 10360 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC C v2.0  
 Beads Per Pellet: 47950 Ctrl Bead Lot ID: 14361 Mean Count: 237 Std Dev: 20.60

Lymph Events	2339
Bead Events	1113
Control Bead Events	279
CD3+ %Lymph	78
CD3+ Abs Cnt	1567
CD3+CD4+ %Lymph	33
CD3+CD4+ Abs Cnt	672
CD45+ Abs Cnt	2015
Control Bead Abs Cnt	240



QC Messages:

Code 7: Manual Gate is in effect.

Sample ID: CONTROLES

Case Number: 01

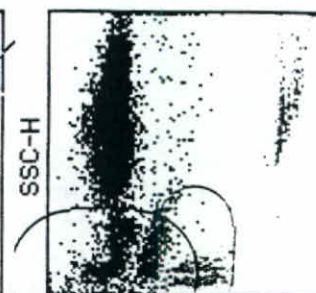
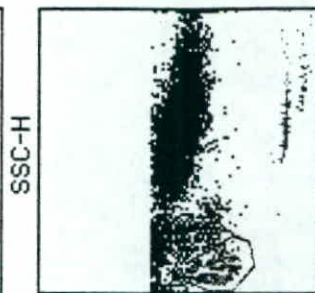
Panel Name: 001

**CD3/CD4/CD45 TruC Ctrl H**

Data Set [ 1 ] Data File: CONTROLES01.03

Reagent Lot ID: 13198 Events Acquired: 11000 Abs Cnt Bd Lot ID: 10360 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC C v2.0  
 Beads Per Pellet: 47950 Ctrl Bead Lot ID: 14361 Mean Count: 969 Std Dev: 63.00

Lymph Events	2048
Bead Events	940
Control Bead Events	962
CD3+ %Lymph	81
CD3+ Abs Cnt	1689
CD3+CD4+ %Lymph	35
CD3+CD4+ Abs Cnt	728
CD45+ Abs Cnt	2089
Control Bead Abs Cnt	981



QC Messages:

ode 7: Manual Gate is in effect.

**Multi-tube QC**

CD3 % Lymph Difference: 3  
 CD3 Abs Cnt Range: 1567 - 1730  
 T Helper/Suppressor Ratio: 0.00

La gráfica PerCP vs. SSC-H permite localizar con precisión una región que representa la población de linfocitos, impresa en colores celeste y naranja, igualmente, en la gráficas FITC vs. PE, se identifican las subpoblación de linfocitos T en celeste, los linfocitos T ayudadores/inductores en naranja, las micropartículas de control en amarillo y el control interno del reactivo en fucsia. La gráfica FITC vs. SSC-H ([c] en el anexo), permite identificar la subpoblación de linfocitos T CD4+ en naranja y celeste [c-1].



**HOSPITAL GENERAL I.G.S.S.**

**MultiSET™ Physician Report**

Director: DRA. ELY OCANA DURAN  
 Operator: DRA. GLENDA ESCALANTE DE RAMIREZ

Software: MultiSET V1.1.1  
 Cytometer: FACSCalibur (#E2890)

Sample Name: CONTROLES  
 Sample ID: 01  
 Case Number: 001  
 Panel Name: 3/4/45 Control

Date Acquired: Tue, Mar 21, 2000 12:51 PM  
 Date Analyzed: Tue, Mar 21, 2000  
 Reference Range Type: BD

Result Name	%/Ratio	Abs Cnt (cells/ $\mu$ L)	Reference Range
T Lymphs % of Lymphs (CD3+/CD45+)	79		55%  84%
T Lymphs (CD3+) Abs Cnt		1662	690  2540
T Helper % of Lymphs (CD3+CD4+/CD45+)	34		31%  60%
Helper Lymphs (CD3+CD4+) Abs Cnt		715	410  1590
Lymphocyte (CD45+) Abs Cnt*		2096	

\*For quality control purposes only

**Multi-tube QC**

CD3 % Lymph Difference: 3  
 CD3 Abs Cnt Range: 1567 - 1730  
 T Helper/Suppressor Ratio: 0.00

Comments:

---



---



---



---



---

Laboratory Director: \_\_\_\_\_

**ANEXO No. 6**

ANEXO No. 6

RESULTADOS DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS PARA EL SUBGRUPO HOMBRES DE UNA POBLACION DE DONADORES QUE ACUDEN AL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL GENERAL DE INFERMEDAD IGSS

No.	EDAD	CD4+	%CD4+	CD8+	%CD8+	CD4+/CD8+
1	24	793	35	617	27	1.3
2	19	894	41	550	27	1.6
3	26	1102	44	713	28	1.5
4	22	1050	35	939	29	1.1
5	27	919	50	357	20	2.6
6	23	679	43	343	24	2.0
7	19	857	42	483	24	1.8
8	39	988	32	1296	41	0.8
9	21	545	34	497	30	1.1
10	22	984	37	516	20	1.9
11	24	899	38	608	28	1.5
12	29	1102	36	934	32	1.2
13	42	918	28	600	20	1.5
14	19	1230	36	620	19	2.0
15	26	1044	31	1179	38	0.9
16	31	941	47	347	19	2.7
17	32	1050	37	831	29	1.3
18	29	1164	35	998	31	1.2
19	24	560	37	195	19	2.9
20	31	521	28	437	21	1.2
21	36	751	39	434	22	1.7
22	30	833	36	468	20	1.8
23	22	750	34	858	37	0.9
24	26	606	37	572	34	1.1
25	34	805	46	592	35	1.4
26	30	961	38	1035	41	0.9
27	30	1066	33	840	27	1.3
28	24	572	27	745	31	0.8
29	24	500	47	278	25	1.8
30	25	681	41	486	28	1.4
31	32	665	33	482	24	1.4
32	35	926	34	1025	32	0.9
33	36	599	31	225	13	2.7
34	25	695	26	705	24	1.0
35	21	772	27	481	17	1.6
<b>X</b>	27.4	840.6	36.42	636.7	26.74	1.49
<b>DS</b>	5.77	197.4	5.95	266.9	6.78	0.55

**ANEXO No. 7**

ANEXO No. 7

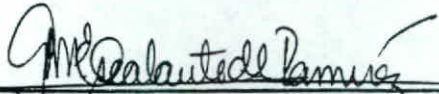
RESULTADOS DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS PARA EL SUBGRUPO MUJERES DE UNA POBLACION DE DONADORES QUE ACUDEN AL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL GENERAL DE INFERMEDAD IGSS

No.	EDAD	CD4+	%CD4+	CD8+	%CD8+	CD4+/CD8+
1	23	803	38	801	38	1.0
2	37	720	45	482	31	1.5
3	29	796	40	537	26	1.5
4	21	868	41	577	28	1.5
5	24	926	38	428	18	2.2
6	26	776	36	486	21	1.6
7	30	666	42	202	13	3.3
8	45	915	39	594	27	1.5
9	27	1121	43	544	19	2.1
10	27	666	46	347	26	1.9
11	24	904	54	385	22	2.3
12	35	720	36	513	25	1.4
13	35	715	32	953	45	0.8
14	42	1417	51	527	21	2.7
15	30	758	40	741	36	1.0
16	43	629	43	388	26	1.6
17	26	889	34	580	23	1.5
18	42	559	25	345	16	1.6
19	43	1230	54	367	16	3.4
20	41	968	41	386	16	2.5
21	34	970	38	600	25	1.6
22	26	1278	44	752	28	1.7
23	41	1132	44	628	25	1.8
24	44	1080	35	884	27	1.2
25	27	722	29	974	35	0.7
26	24	1277	51	508	21	2.5
27	26	1173	45	577	22	2.0
28	37	963	43	346	16	2.8
29	30	1099	42	593	26	1.9
30	32	1517	40	453	14	3.3
31	20	1184	34	795	23	1.5
32	45	608	38	570	33	1.1
33	31	789	36	375	17	2.1
34	31	751	36	663	34	1.1
35	28	1762	47	984	24	1.8
<b>X</b>	32.2	952.9	40.57	568.1	24.65	1.83
<b>DS</b>	7.47	274.5	7.19	191.7	6.36	0.67



---

**Br. Karla Maritza Mejía Bonifazi**  
**TESISTA**



---

**Licda. Glenda Escalante de Ramírez**  
**ASESORA**



---

**Licda. Heidi Elke Logemann Lima**  
**DIRECTORA**



---

**Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta, MA.**  
**DECANA**