

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Rango de referencia de linfocitos T (CD4, CD8) en una población adulta
sana HIV negativa**

Diego Fernando Bonilla Arcos

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención
del título de Doctor en Medicina

Quito, Abril del 2007

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Rango de referencia de linfocitos T (CD4, CD8) en una población adulta
sana HIV negativa.**

Diego Fernando Bonilla Arcos

Manuel Baldeón, Ph.D. Inmunología
Director de Tesis

.....

Rafael Febres-Cordero, Médico Hematólogo
Miembro del Comité de Tesis

.....

Marco Fornasini, Ph. D. Epidemiología
Miembro del Comité de Tesis

.....

Mauricio Espinel, Ph. D. Medicina Tropical
Miembro del Comité de Tesis

.....

Enrique Noboa, Médico Neumólogo
Decano del Colegio de Ciencias de la Salud

.....

Quito, Abril 2007

© Derechos de autor (Copyright).

Diego Bonilla Arcos

2007

Dedicatoria

A mi familia que con su apoyo ha hecho que mis sueños se hagan realidad.

Agradecimientos

Al Doctor Gonzalo Mantilla que me ayudó a ingresar a la *University of Miami* para realizar la investigación.

Al Doctor Deshratn Asthana jefe del departamento de inmunología de *University of Miami*, que me brindó todas las facilidades para poder realizar la investigación.

A mis profesores de la Universidad San Francisco de Quito que siempre estuvieron prestos a resolver mis dudas durante la investigación.

Finalmente a mis padres que sin su impulso no hubiese logrado cumplir mis objetivos.

Resumen

Rango de referencia de linfocitos T (CD4, CD8) en una población adulta sana HIV negativa.

La investigación estuvo basada en el análisis de una población sana HIV negativa de entre 21 a 60 años. Por medio de la presente investigación se midió los valores de leucocitos, linfocitos T (CD4 y CD8) en la población antes mencionada para comparar los rangos estándar de linfocitos con los obtenidos en nuestro estudio, para conocer de mejor manera si la exposición a la infección por HIV han alterado los valores de linfocitos de manera especial CD4 y CD8 que tienen relación directa a la afección de sus valores en la infección por HIV.

En este estudio se escogieron 75 personas sanas en riesgo de infección por HIV, a las cuales se tomaron muestras y se las analizó por medio de citometría de flujo, en donde se obtuvieron valores de linfocitos T totales así como de linfocitos CD4 y CD8. Los resultados obtenidos fueron analizados y se obtuvieron promedios que fueron de 998 células/ul para CD4 y 551 células/ul para CD8. Los resultados se compararon con los valores antes establecidos, pudiéndose observar diferencias que muestran una mayor producción de linfocitos por parte del sistema inmune, en el caso de CD4 el rango es de 1294 células/ul en comparación al estándar que permite 1000 células/ul de variación, en tanto el rango de CD8 obtenido es de 736 en comparación al estándar de 850. Los resultados obtenidos son interesantes y abren la posibilidad de futuros estudios que permitan evaluar la interacción del sistema inmune humano ante infecciones como es el caso del HIV, lo cual permitirá un mejor abordaje de la enfermedad, permitiendo otras formas de combatir la enfermedad.

Abstract

Rank of reference of lymphocytes T (CD4, CD8) in a healthy adult population HIV negative.

The investigation is support in the analysis of a healthy population HIV negative of between 21 to 60 years. By means of the present investigation were measured the values of leukocytes, lymphocytes T (CD4 and CD8) in the population before mentioned to be able to compare the standard ranks of lymphocytes with result obtained in our study. The objective is know if the exhibition to antigens has altered the values of lymphocytes of special way CD4 and CD8 that have direct relation to the affection of their values in the HIV infection and are useful for the follow of the patients .

In this study 75 healthy people HIV negative were chose. Blood samples were obtained and analyzed by means of flow cytometry, where values of total lymphocytes T as well as of lymphocytes CD4 and CD8 were obtained. The number ob CD4 was 998 cell/ul and the number of CD8 was 551 cells/ul.

The obtained results were analyzed and averages were obtained and compared with the values before established. We observed differences that show a greater activation of the immune system. The obtained results are interesting and open the possibility of future studies that allow evaluating the interaction of the human immune system against infections as it is the case of the HIV, which will allow a better boarding of the disease, allowing other forms of fight against the disease.

Tabla de Contenido

Lista de figuras	ix
Introducción	1
Metodología	9
Resultados	13
Discusión	13
Conclusiones	15
Recomendaciones	16
Bibliografía	17

Lista de Figuras

Tabla Número 1

Datos totales del estudio con valores de leucocitos, CD4 y CD8.

SEXO	EDAD	LEUCOCITOS	LINFOCITOS	CD4	No Células	CD8	No Células	CD4/CD8
M	48	6600	30	42	832	37	729	1,14
M	48	7300	30	39	848	38	837	1,01
M	48	6700	28	39	731	37	698	1,05
M	35	4700	43	44	897	26	518	1,73
M	35	4000	41	49	796	22	367	2,17
M	27	5100	43	42	912	24	518	1,76
M	45	5700	30	52	896	31	527	1,70
M	45	6900	33	44	990	34	783	1,27
M	45	9500	24	44	1010	34	781	1,29
M	45	7000	33	57	1320	27	631	2,09
M	45	5300	27	57	817	28	400	2,05
M	45	6000	24	49	702	34	487	1,44
M	43	6800	23	46	713	23	358	1,99
M	43	7500	29	48	1049	23	490	2,14
M	43	6400	32	52	1055	24	490	2,15
M	43	6700	31	50	1042	24	507	2,05
M	43	7500	34	46	1174	25	641	1,83
M	36	4600	33	54	822	26	397	2,07
M	25	4500	42	56	1054	19	363	2,90
M	43	5000	37	43	797	20	374	2,13

M	49	9300	22	61	1251	16	337	3,71
F	59	5100	52	53	1397	14	375	3,73
F	59	4900	53	52	1362	19	504	2,70
F	35	7600	30	55	1254	25	561	2,24
F	35	8000	32	52	1343	21	545	2,47
F	35	7100	31	51	1122	23	515	2,18
F	35	7800	34	55	1447	23	608	2,38
F	35	8700	21	53	961	24	434	2,21
F	35	8300	35	55	1598	22	641	2,49
F	35	7100	26	44	816	23	427	1,91
F	35	8400	26	54	1187	23	513	2,31
F	35	7600	31	49	1163	21	503	2,31
F	35	8600	26	56	1261	21	473	2,67
F	35	7900	24	51	957	23	435	2,20
F	27	5600	39	45	979	34	732	1,34
F	27	8300	39	51	1644	33	1058	1,55
F	25	6000	24	52	751	25	361	2,08
F	39	4000	36	53	764	22	322	2,37
F	32	8600	30	56	1437	24	621	2,31
F	50	7300	33	37	894	28	685	1,31
F	50	5200	32	42	697	27	451	1,54
F	50	6400	26	38	637	29	474	1,34
F	50	5600	25	38	529	31	428	1,24
F	50	4900	41	37	739	28	553	1,34

F	45	8400	27	41	922	28	634	1,45
F	45	8000	22	43	765	28	498	1,54
F	45	7700	28	41	880	28	610	1,44
F	45	7200	33	44	1040	27	646	1,61
F	33	5200	36	48	901	31	580	1,55
F	62	9600	33	58	1824	25	791	2,30
F	24	3700	40	45	660	32	471	1,40
F	32	6700	25	45	750	28	465	1,61
F	32	6300	23	45	659	31	456	1,45
F	32	5500	31	47	794	29	493	1,61
F	32	6600	32	36	768	30	632	1,21
F	32	8100	31	43	1068	28	709	1,51
F	32	7600	29	43	940	28	617	1,52
F	49	7000	18	55	687	33	412	1,67
F	49	4500	28	46	574	36	448	1,28
F	49	6200	26	53	857	31	498	1,72
F	49	5100	22	49	553	34	384	1,44
F	37	7000	29	39	799	32	652	1,23
F	21	5700	35	38	765	23	460	1,66
F	35	5900	46	49	1327	25	668	1,98
F	35	6900	45	51	1584	25	761	2,08
F	31	6300	36	47	1065	29	648	1,64
F	31	7100	38	47	1273	31	841	1,51
F	33	5900	40	53	1251	26	608	2,06

F	41	5100	31	45	708	31	489	1,45
F	41	5000	34	45	765	34	583	1,31
F	41	7600	25	47	884	30	578	1,53
F	49	6600	38	58	1458	25	639	2,28
F	49	8600	34	55	1615	25	738	2,19
F	38	8600	27	47	1094	21	489	2,24
F	38	9500	22	47	980	20	427	2,30

Tabla Número 2

Datos de la población para CD8 y CD4 en porcentajes

<i>CD8 Porcentaje</i>	
Promedio obtenido	26,96
Error típico	0,58
Mediana	27,13
Desviación estándar	5,02
Varianza de la muestra	25,17
Curtosis	-0,31
Coefficiente de asimetría	0,11
Rango	24,08
Mínimo	14,13
Máximo	38,21
Suma	2021,78
Cuenta	75,00
Nivel de confianza(95,0%)	1,15

<i>CD4 Porcentaje</i>	
Promedio obtenido	47,87
Error típico	0,70
Mediana	47,18
Desviación estándar	6,02
Varianza de la muestra	36,29
Curtosis	-0,85
Coefficiente de asimetría	-0,03
Rango	24,78
Mínimo	36,35
Máximo	61,13
Suma	3590,09
Cuenta	75,00
Nivel de confianza(95,0%)	1,39

Tabla número 3

Datos de la población de CD8 y CD4 en números absolutos de células.

<i>CD8</i>	
Promedio obtenido	551,72
Error típico	16,31
Mediana	514,59
Desviación estándar	141,29
Varianza de la muestra	19962,84
Curtosis	0,99
Coefficiente de asimetría	0,83
Rango	736,52
Mínimo	321,98
Máximo	1058,50
Suma	41378,92
Cuenta	75,00
Nivel de confianza(95,0%)	32,51

<i>CD4</i>	
Promedio obtenido	998,04
Error típico	33,52
Mediana	921,72
Desviación estándar	290,32
Varianza de la muestra	84284,71
Curtosis	-0,02
Coefficiente de asimetría	0,77
Rango	1294,44
Mínimo	529,06
Máximo	1823,50
Suma	74852,87
Cuenta	75,00
Nivel de confianza(95,0%)	66,80

Tabla número 4

Valores obtenidos del estudio.

Subset	n	Promedio Obtenido	Estándar
Leucocitos	75	6684	4500-11000
Linfocitos T Helper (%) CD4	75	48	31-62
Linfocitos T Citotóxicos (%) CD8	75	27	12-49
Total Linfocitos T (%)	75	32	22-44
Linfocitos T Helper (células/ul) CD4	75	998	500-1500

Linfocitos T Cítotoxicos (células/ul) CD8	75	552	150-1000
Total Linfocitos T (células/ul)	75	1597	1513
Radio CD4/CD8	75	1.86	0.9-1.9

Tabla número 5

Radio CD4/CD8.

<i>CD4/CD8</i>	
Promedio obtenido	1,86
Error típico	0,06
Mediana	1,73
Desviación estándar	0,54
Varianza de la muestra	0,29
Curtosis	2,10
Coficiente de asimetría	1,09
Rango	2,71
Mínimo	1,01
Máximo	3,73
Suma	139,68
Cuenta	75,00
Nivel de confianza(95,0%)	0,12

Rango de referencia de linfocitos T (CD4, CD8) en una población adulta sana HIV negativa.

Introducción

El agente causante del SIDA es el virus de inmunodeficiencia humana HIV. HIV fue por primera vez relacionado con el SIDA en el año de 1981 (2,3). En algunas comunidades, la tasa de infección es tan alta como entre 30-40% entre la población adulta. Dos tipos de HIV, determinados HVI-1 y HIV-2, son responsables por la mayoría de infecciones en el mundo (1).

HIV es un retrovirus tipo C perteneciente a la familia de los lentivirus. Su genoma codifica doce proteínas(19), la mas importante son gag (codifica las proteínas virales del núcleo), pol (transcriptasa reversa), y env (proteínas de envoltura), (3,8).

El ARN nuclear está rodeado por una cubierta lipídica que es derivada de la membrana plasmática del huésped. La membrana viral contiene la proteína de transmembrana gp160. Esta proteína es normalmente detectada por western blot como dos fragmentos-gp41, que promueve la fusión de la cubierta viral con la membrana del huésped, y gp120, una molécula de adhesión que une CD4 sobre células Th. Las proteínas de núcleo incluyen transcriptasa reversa y dos proteínas no glicosiladas denominadas p18 y p24 (1,8).

Los grupos de riesgo para la infección por HIV incluyen hombres homosexuales, usuarios de drogas intravenosas, niños que nacen de madres infectadas, parejas sexuales de la población en alto riesgo, y los receptores de productos sanguíneos o secreciones de personas infectadas (2,3).

Las últimas estadísticas nos indican:

Personas que vivían con el VIH en 2006

Total

39,5 millones (34,1–47,1 millones)

Adultos

37,2 millones (32,1–44,5 millones)

Mujeres

17,7 millones (15,1–20,9 millones)

Menores de 15 años

2,3 millones (1,7–3,5 millones)

Nuevas infecciones por el VIH en 2006

Total

4,3 millones (3,6–6,6 millones)

Adultos

3,8 millones (3,2–5,7 millones)

Menores de 15 años

530 000 (410 000–660 000)

Defunciones causadas por el SIDA en 2006

Total

2,9 millones (2,5–3,5 millones)

Adultos

2,6 millones (2,2–3,0 millones)

Menores de 15 años

380 000 (290 000–500 000)

Fuente: OMS y ONUSIDA, AIDS epidemic update, december 2006

Modo de infección

El HIV es primariamente diseminado por contacto con fluidos de individuos infectados tales como semen y sangre. Relaciones sexuales entre homosexuales o heterosexuales es la ruta principal de transmisión, la transmisión vertical de madre a hijo es también fuente de infección. El compartir aguja por parte de los consumidores de drogas intravenosas continúa siendo una fuente importante de transmisión (1, 2, 3, 4,13).

Fisiopatología

Una consecuencia central de la infección con HIV es la pérdida de Th CD4 +. Sin embargo además de la pérdida de CD4+, existe una disminución de la respuesta de las células T ante el antígeno, dándose una producción irregular de citoquinas tales como IL-2 e IFN- γ , lo que produce disminución de la señal intracelular. El síndrome hipermetabólico visto en pacientes infectados con HIV puede ser causado por niveles incrementados de citoquinas como TNF- Δ . Los pacientes con infección temprana parecen tener activación policlonal de células B con complejos inmunes circulantes en plasma, perdiendo la capacidad de establecer una respuesta efectiva de anticuerpos ante nuevos antígenos (1, 2, 3,8).

El HIV puede entrar a los macrófagos a través de la unión de gp120 a CD4 y a un segundo receptor de membrana, CCR5 (un receptor de citoquinas) (7). Ambos macrófagos y monocitos sirven como reservorios para el virus. A pesar de una mayor resistencia a la muerte causada por la infección viral, los macrófagos infectados tienen una secreción disminuida de IL-1 así como una habilidad disminuida para presentar antígenos a las células T (1,3).

Clínica

El centro para control de enfermedades en Estados Unidos (CDC) ha propuesto tres subgrupos clínicos para los individuos infectados por HIV (1).

Categoría A. Este grupo de individuos se caracteriza por una infección aguda. Después de la infección, el paciente puede desarrollar un síndrome que se parece a una mononucleosis infecciosa, caracterizada por una erupción cutánea, faringitis, fiebre o incluso meningitis aséptica. La enfermedad o la sintomatología típicamente se resuelven después de 1 a 2 semanas, mientras la seroconversión a HIV toma lugar. La infección se vuelve clínicamente latente y se puede mantener así por 7 a 10 años (1).

Categoría B. Este grupo se caracteriza por una linfadenopatía persistente generalizada junto con fiebre, una erupción cutánea y fatiga. El complejo relacionado a SIDA representa un grupo de signos y síntomas no específicos sin que ocurra una disminución en células CD4+. Un diagnóstico temprano se da si el individuo tiene uno o dos de los siguientes síntomas: fatiga, fiebre, pérdida de peso, erupción cutánea persistente, leucoplaquia oral, herpes simple, y candidiasis oral. Un diagnóstico avanzado es determinado si el individuo tiene dos o más de estos síntomas (1,3,4).

Categoría C. Este grupo está caracterizado por enfermedad generalizada, incluyendo infecciones neurológicas oportunistas y neoplasias secundarias. Finalmente la enfermedad progresa a la afección completa del sistema inmune, caracterizado por desarrollo de tumores secundarios y numerosas infecciones oportunistas. Entre los tumores comunes al SIDA están el Sarcoma de Kaposi, causado por HVS8. Linfomas no Hodgkin se han incrementado en pacientes severamente inmunocomprometidos (1, 3, 4, 15).

Individuos infectados con HIV son susceptibles a infecciones oportunistas por protozoarios (criptospora y toxoplasma), hongos (criptococis, candidiasis y pneumocystis jiroveci), bacterias (micobacterium avium, tuberculosis), y virus (citomegalovirus, herpes simples y varicela zoster).

La afección del sistema nervioso central es una característica común del SIDA (60%) que puede ser el resultado de una afección directa del HIV o de una infección oportunista (1, 2, 4,15).

Diagnóstico

La seroconversión ante las proteínas de HIV usualmente ocurre dentro de los dos meses después de la infección o en casos raros tardíamente. Los anticuerpos en el suero contra las proteínas de membrana gp41, gp120, gp160 y al menos una proteína gag o una proteína pol puede ser detectadas mediante ELISA y Western blot. El último examen por lo general se utiliza para confirmar la seroconversión detectada en primera instancia por el ELISA (1,3, 14).

EL conteo periférico de CD4 puede adicionalmente ser utilizado como un marcador de progresión de enfermedad y como un predictor de riesgo ante infecciones oportunistas.

PCR puede identificar el HIV ARN de la sangre, líquido céfalo raquídeo, y tejidos de individuos infectados incluso antes de la seroconversión. Adicionalmente PCR puede diferenciar HIV-1 de HIV-2 (14).

Pronóstico y Tratamiento

Solo una pequeña fracción de los pacientes (5%) desarrolla síntomas clínicos dentro de los primeros dos años de la infección. Sin embargo una vez dada la expresión clínica de la enfermedad y las infecciones oportunistas, el promedio de sobrevivencia es de aproximadamente dos años sin tratamiento (1,3). EL tratamiento esta dirigido a reducir los niveles sanguíneos de ARN del HIV (carga viral) y tratar los síntomas de la infección oportunista.

La principal terapia de elección son análogos de nucleótidos que previenen la actividad de transcriptasa reversa de HIV e inhibidores de proteasas. El análogo dideoxidonucleotido más estudiado es azidotimide (AZT), que se utiliza típicamente en terapia de combinación con otros análogos y con inhibidores de proteasas, incluyendo indinavir, saquinavir, y ritonavir. Otros análogos de nucleótidos usados son dideoxicitidina (ddC), dideoxinosine (ddI), didehidrodeoxitimiidine(d4T), dideoxythiacytedine (3TC). Y nevirapine.

En la actualidad, los rangos estándares que se manejan de linfocitos, son del año de 1993 (1), en donde se realizó por última vez un estudio significativo, en cuanto a población, diversidad de género y diversidad racial, lo cual lo hace aplicable a otras poblaciones, en la actualidad, no sabemos que tanto ha influenciado el crecimiento de una enfermedad como el HIV en el sistema inmune del ser humano, lo cual se podrá ver reflejado a través de los niveles de linfocitos que mediremos, los cuales nos mostrarán que tan grande ha sido el impacto de la enfermedad en el sistema inmune humano. El estudio de 1993 fue realizado en el Reino Unido con 286 sujetos participantes, de los cuales 195 fueron mujeres y 91 hombres heterosexuales. Donde los rangos de CD4 reportados fueron en células por milímetro cúbico de sangre, para mujeres fumadoras de 490-1610 y mujeres no fumadoras de entre 430-1350 y para hombres fumadores entre 380- 1600 y hombres no fumadores de 330- 1280. En tanto los rangos se establecieron entre 500 a 1600 células por milímetro cúbico de sangre para mujeres y de entre 400 a 1200 células por milímetro cúbico de sangre para hombres que se establecieron al final del estudio (1). También se realizaron estudios más recientes (12, 17, 18) en donde el número de sujetos estudios fue mayor pero la diversidad racial no ya que solamente se aplicaba a los grupos raciales en estudio, en este caso en las zonas de Nigeria y Singapur, sin embargo un estudio realizado en China (18) fue estudiado un grupo de 614 sujetos sanos con rangos de edad entre 16 a 50 años cuyas muestras fueron enviadas a diferentes laboratorios sin mayor diferencia en sus

valores, en donde se reportó un rango de entre 415-1189 células CD4 por milímetro cúbico de sangre y de entre 336-780 células CD8 por milímetro cúbico de sangre, estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados en el estudio de 1993. En tanto en la mayoría de laboratorios el rango de linfocitos CD4 está entre los 500 a 1400/mm³ (1). Se espera que mediante los resultados obtenidos por nuestro estudio se brinden nuevas cifras para poder establecer valores de linfocitos CD4 y CD8 en una población sana y compararlos con los actualmente existentes. Con esto se puede comparar los valores de linfocitos existentes con los obtenidos y de esta manera saber si ha existido alguna variación en relación a los valores estándares.

La enfermedad durante los últimos años ha alcanzado niveles alarmantes que bordean los 40 millones de infectados, de los cuales una gran parte no sabe siquiera que está infectado, a pesar de mayores campañas de prevención, la cifra de infectados se mantiene en aumento y los grupos de jóvenes y adultos jóvenes presentan el mayor crecimiento, lo cual indica la poca penetración de las campañas entre estos grupos poblacionales. De igual manera la cifra de niños infectados por transmisión vertical es de 2,3 millones, algo que debiese ser plenamente prevenible por medio de sistemas efectivos de screening y vigilancia del embarazo con un adecuado manejo del nacimiento del neonato. Las muertes por año a causa del sida se aproximan a 3 millones en el 2006, a pesar de que existen nuevas terapias, que por otra parte no son accesible a todos los niveles de la población, y de manera nefasta son casi nulos o extremadamente limitados en regiones donde la epidemia ha alcanzado niveles desbordantes como es el caso de África. Así mismo el número de personas contagiadas por relaciones sexuales heterosexuales se ha elevado, incrementando de esta manera el riesgo una mayor diseminación de la enfermedad entre más personas (16).

No hay duda que esta epidemia obliga a reconsiderar los enfoques del desarrollo. El foco en el desarrollo humano destaca la necesidad de asegurar que los beneficios del crecimiento se utilicen para remediar necesidades críticas y para mejorar la condición humana.

Por medio del estudio planteado, intentamos cuantificar el rango de CD4 y CD8 en una población adulta sana, en vista a la gran exposición que ha tenido la población en los últimos años a diferentes antígenos, debido a que un estudio aplicable a todas las poblaciones fue realizado por última vez en el año de 1993 aunque el nuestro fue realizado en USA y solo podría aplicarse a esa población. Por medio de esto podremos tener una visión más completa sobre el comportamiento del sistema inmune humano y su respuesta frente a los diferentes tipos de antígenos en relación al tiempo.

Justificación del Estudio

Objetivos

Objetivo General

Actualizar la información acerca de los rangos de linfocitos del sistema inmune humano.

Objetivos específicos

Medir los niveles de linfocitos CD4.

Medir los niveles de linfocitos CD8.

Hipótesis: Los valores del rango normal de linfocitos en la población adulta sana HIV negativa han variado desde la última medición.

Saber si los valores de linfocitos han cambiado en los últimos años en relación a la exposición a diferentes antígenos.

Tener una referencia de los valores de linfocitos en una población adulta sana HIV negativa.

Materiales y Métodos

Materiales

Computador Dell optiplex 170l.

Impresor HP 670.

Hoja electrónica Excel Office xp.

Guantes de látex.

Mascarillas.

Monoclonal antibodies detecting human antigens CD8, clone sk1, de BD.

MultiTEST CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 ficoeritrina (PE) /CD45 conjugado a la proteína peridinín clorofila (PerCP) /CD4 conjugado a alofococianina (APC), de BD. San José California, BD Biosciences.

Tubos TruCOUNT.

Citómetro de flujo FACSCalibur con láser de 635 nm y de 488 nm, con el software FACSComp versión 4.0

Software MultiSET 2.0.

Cargador FACS Loader de BD.

Microesferas CaliBRITE y APC.

Solución lisante FACS(10X), 100 ml.

Agua de grado reactivo (destilada o desionizada)

Tubos de prueba desechables con tapa de poliestireno Falcon de 12 x 75mm.

Agitador Vortex.

Micropipeta con puntas.

Dispensador de 450 ul.

Líquido de revestimiento FACSTFlow.

Controles TruCOUNT.

Control de sangre entera lisable, BD.

Tubo estéril de recolección de sangre VACUTAINER K3 EDTA (tapa lila)

Metodología

Para la selección de participantes del estudio se publicó un anuncio en las carteleras del campus universitario de la Universidad de Miami en donde se invitaba a las personas a participar de un estudio, para lo cual se ofrecía total confidencialidad. Se captaron en total 116 personas, a las cuales se les sometió a los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión usados en el estudio:

- Personas con una edad entre 21 y 60 años.
- Personas que no hayan estado enfermas durante los últimos 3 meses.
- Personas no sometidas a tratamientos con cortico esteroides.
- Personas que no hayan recibido vacunas en los últimos 3 meses.

Se realizó una encuesta en donde se medía la exposición previa a personas que han estado infectadas con HIV, como son parejas de HIV positivo, personal de salud en exposición directa con HIV positivo para poner más atención en estos participantes y sus resultados de exámenes de sida.

Temas de la encuesta para medir exposición previa al HIV.

Estar en riesgo de la enfermedad, pudiendo ser personal de salud, personas sexualmente activas que hayan tenido más de 3 parejas en el último año.

-Personas que hayan tenido relaciones sexuales sin protección.

-Personas con tatuajes y perforaciones en su cuerpo.

-Personas que hayan sido sometidas a transfusiones.

-Personas que tuvieron contacto íntimo con personas VIH positivas con o sin protección.

Los participantes que cumplieron los criterios de inclusión se les realizó una prueba de Elisa en sangre para descartar que estén infectados con HIV, luego de ser sometidos a este proceso se admitieron un total de 75 participantes a los cuales se les asignó un código con el cual se protegió su identidad. A los pacientes HIV positivos se les ofreció consejería a través de un centro primario de salud y fueron excluidos del estudio, el número de pacientes que dieron positivos no se conocieron en el estudio, los manejó a través del centro primario de salud.

Una vez seleccionados los participantes se procedió a la obtención de muestras de sangre en forma aséptica por punción venosa, en un tubo estéril de recolección de sangre VACUTAINER K3 EDTA, se obtuvieron 10 cm³ de sangre y se utilizaron 100 ul de sangre entera por paciente para el muestreo, el resto se lo almacenó en el laboratorio. La sangre anti coagulada se almacenó a temperatura ambiente (20-25 C), se tiñó en las 48 horas siguientes y las muestras fueron analizadas 24 horas luego de ser teñida.

Tinción

Para cada muestra de paciente, se rotuló un tubo de 12 x 75 mm con el número de identificación de la muestra. Luego se pipetea 20 ul de reactivo MultiTEST CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD8 ficoeritrina (PE) /CD45 conjugado a la proteína peridín clorofila (PerCP) /CD4 conjugado a alofocianina (APC) al fondo del

tubo, se realiza idéntico procedimiento con el otro reactivo Monoclonal antibodies detecting human antigens CD8, clone sk1.

Seguido a esto se pipeteó 50 ul de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo del tubo. Una vez dado esto se tapó el tubo y se lo agitó suavemente en el Vortex para que se mezcle, luego se incubó por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20 a 25 C). Una vez dado esto se añadió 450 ul de solución lisante FACS 1X al tubo, se tapó el tubo y se agito suavemente en el Vortex para que se mezcle, luego se incubo 15 minutos en la oscuridad en temperatura ambiente.

Una vez teñidas las muestras se procedió al análisis por citometría de flujo, para las muestras que no podían ser analizadas de manera inmediata se las almacenaba en la oscuridad a temperatura ambiente.

Las muestras que eran analizadas de manera inmediata se las agitaba a baja velocidad para evitar la agregación. Se colocan los tubos en el citómetro y se corre el análisis, los datos que se obtuvieron son en modalidad de lista con el software MultiSET. Los resultados se imprimen y se archivan.

Con los resultados individuales se creó una base de datos en Excel en donde se detalla el código del participante, el código de la muestra para el laboratorio, la edad, sexo, el valor total de leucocitos, el valor de linfocitos. Los datos se revisaron por dos ocasiones completamente para evitar errores de transcripción. Con los valores de la tabla se corrió el programa de análisis de Excel y se obtuvo los valores promedio de cada colonia de linfocitos. Cada muestra fue medida dos veces y los datos se reconfirmaron antes de ser trasladados a la base de datos.

Resultados

Una vez obtenido los resultados se obtuvo el promedio tanto de leucocitos, linfocitos, de CD4 y CD8 así como resultados de la relación CD4/CD8.

En la tabla número 1 y 2 se observa tanto el porcentaje como los números absolutos de CD4 y CD8.

Para el análisis de los datos se utilizó los porcentajes y números absolutos de los valores obtenidos.

Como datos obtenidos tenemos que el promedio de leucocitos fue de 6684 con un mínimo de 3700 y máximo de 9600. En cuanto a linfocitos tenemos un promedio de 31,72 % con un mínimo de 18% y máximo de 53%.

Se obtuvo también el radio CD4/CD8 con un promedio de 1,86 teniendo un mínimo de 1,01 y un máximo de 3,73.

Discusión

Dentro del primer valor que obtenemos están los leucocitos con un promedio de 6684 con un mínimo de 3700 y un valor máximo de 9600, en comparación al valor referenciado (1) tenemos un rango de entre 4500 a 11000 leucocitos, nuestro valor promedio encaja con el rango antes descrito, no así el valor mínimo y el máximo, teniendo una variación de alrededor del 8 %, lo cual puede estar afectado por el tamaño de la muestra los estudios anteriores presentan un número de participantes es mayor a los 250 participantes en tanto nuestro estudio consta con 75 participantes.

El rango de variación de leucocitos del estudio entre el valor mínimo y el máximo es de 5900 en relación a los valores de referencia en donde existe una variación de 6500 leucocitos.

El porcentaje de linfocitos obtenidos en nuestro estudio es de 31,72 % en promedio con un mínimo de 18% y máximo de 53%, los rangos referenciales están entre 22% a 44%, el valor promedio obtenido en el estudio se encuentra dentro de los rangos de referencia, no así sus valores mínimos y máximos, en donde se puede observar una variación de cuatro puntos porcentuales y once puntos porcentuales respectivamente, esto pudo ser debido a que los sujetos estudiados pudieron estar atravesando un proceso infeccioso a pesar que en el estudio los pacientes que habían estado enfermos o presentaban patología se los excluyó, razón por la cual el porcentaje de linfocitos se vio aumentado o una linfocitosis maligna, en estos casos hubiese sido mejor hacer un estudio más detallado de estos pacientes, lo cual no se realizó, pero se los mantuvo en el estudio ya que al momento de la obtención de la muestra no mostraban una patología evidente. El valor de CD4 obtenido en nuestro estudio es de 47,8%. El valor referencial del rango de CD4 es de entre 31% y 62%, el rango obtenido en el estudio es de 24 puntos porcentuales, en relación al referencial de 31.

En cuanto al valor absoluto de CD4 obtuvimos el promedio de 998 células por milímetro de sangre con un rango de 1294, en relación a los valores referenciales de entre 500 y 1500 células por milímetro de sangre, lo cual nos da un rango de 1000 células por milímetro de sangre. Se puede apreciar que los valores obtenidos presentan un rango mas amplio, en tanto el promedio esta dentro de los valores referenciales.

Los resultados para CD8 fueron de 26,9 %; el rango de referencia se encuentra entre 12 % y 49 %. El rango obtenido en el estudio para CD8 es de 24 puntos porcentuales, en comparación con el rango referencial que permite una variación de 37 puntos porcentuales.

En cuanto al número absoluto de CD8 se obtuvo una media de 551 células por milímetro de sangre, teniendo un rango referencial de entre 150 y 1000 células por milímetro de sangre, teniendo un rango de 850, en comparación al obtenido de 736, dándose una variación de 12 % , siendo más amplio el rango referencial que el obtenido.

La variación de los rangos obtenidos en el estudio se pueden deber a varios factores como la temporada en la cual fue tomada la muestra, la hora de toma de la muestra, ya que se en otros estudios se pudo observar que los valores más altos de CD4 se obtuvieron alrededor de las 8:30 PM en tanto los más bajos alrededor de las 12:30 PM; también las infecciones virales que disminuyen los valores de linfocitos. Para contrarrestar este efecto se tomaron las muestras entre las 9:00 y 15:00 de los meses de mayo, junio y julio; se excluyeron pacientes enfermos al momento de la muestra o previamente enfermos.

Conclusiones

Un vez concluido la investigación se obtuvieron resultados que difirieron de los resultados estándares que normalmente se utilizan en cuanto a los rangos normales, en tanto los valores promedios obtenidos se encuentran dentro de los rangos referenciales, esto abre la posibilidad a estudios más amplios con mas participantes que permitan definir si los rangos obtenidos en el estudio se mantienen o los referenciales se imponen. Sin embargo el obtener rangos más amplios nos indica que algún cambio se ha dado en cuanto a la respuesta del sistema inmune, esto se podría plantear que es debido a la exposición que ha tenido durante el tiempo a antígenos de distinto tipo lo cual pudiese crear tolerancia de esta manera afectando la respuesta del sistema inmune a la infección.

De igual manera se puede observar que los porcentajes en cuanto a CD4 y CD8 se han mantenido, no así el número absoluto de células que se han incrementado entre un seis y diez por ciento de acuerdo a nuestro estudio, lo cual muestra una mayor producción de células del sistema inmune, por lo cual los porcentajes pueden ser de mayor utilidad que los números absolutos de linfocitos para el seguimiento de pacientes enfermos de HIV.

El resultado obtenido nos plantea nuevas interrogantes: ¿el mayor número de linfocitos es debido a células de memoria u otro tipo de células?

Mientras no se descubra una vacuna o una curación, nuestra principal arma contra el VIH/SIDA son los conocimientos. EL futuro de las personas infectadas y nuevos enfermos depende de la investigación que se realice con el afán de encontrar la cura a la enfermedad. El sistema inmune es una de las armas más poderosas contra las infecciones, pero el VIH ha aprendido a Burlarla, la mejor comprensión de su funcionamiento y la interacción frente a la enfermedad nos permitirán encontrar la cura definitiva a esta enfermedad.

Recomendaciones

El presente estudio ha mostrado resultados que ameritan futuras investigaciones, para lo cual es muy recomendable contar con un mayor número de participantes, lo cual permita que los datos sean de mayor aplicabilidad a otros estudios.

De igual manera el costo de la investigación debe ser muy bien analizado para que el proyecto no quede inconcluso.

Bibliografia

1. Amy E , Paul E. Primary HIV-1 infection: Diagnosis and treatment . In: UpToDate, Rose, BD (Ed), UpToDate, Waltham, MA, 2006.
2. Chohan, B, Lavreys, L, Rainwater, S, et al. The biology of HIV-1 transmission and re-infection. Presented at the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, February 22-25, 2005.
3. Dybul, M, Connors, M, Fauci, AS. The immunology of human immunodeficiency virus infection. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Mandell, GL, Bennett, JE, Dolin, R, (Eds), Churchill Livingstone, Philadelphia, PA 2005, p.1527.
4. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural Killer cells. In: Ades E, Lopez C, eds. Natural Killer and Host Defense. Basel: Karger, 1989:1
5. Flanigan, T, Mahajan, H, Kumarasamy, M, et al. Total lymphocyte count (TLC) as a surrogate for CD4 count to initiate and monitor HAART in resource-limited countries. 9th CROI, Seattle, WA. Feb 24-26, 2002.
6. Fremont, D.H., Rees, W.A., Kozono, H.: Biophysical studies of T cell receptors and their ligands. *Curr.Opin.Immunol.* 1996, 8:93-100.
7. Heredia, A, Amoroso, A, Davis, C, et al. Rapamycin causes down-regulation of CCR5 and accumulation of anti-HIV beta-chemokines: an approach to suppress R5 strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10411.
8. Janeway, C. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* 2004, 4:115-169.
9. Kovacs, JA, Lempicki, RA, Sidorov, IA, et al. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med* 2001; 194:1731.
10. Maini M, Gilson RJ, Adolphus N, Fakoya A, Ross E, Phillips AN. Normal range and sources of variability of CD4 counts in HIV- seronegative women and heterosexual men. *Int Conf AIDS.* 1993 Jun 6-11; 9: 557.
11. Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med.* 1989; 113:598-605.
12. Olumuyiwa A, Jelpe D, Manhattan C, Patience A, et al. Reference Values of CD4 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-negative adult Nigerians. *Clin and Diagnostic Laboratory,* Apr. 2005,p. 525-530.

13. Pantaleo-Koup. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* 8, 806-810.
14. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut.* 1989; 59: 200-206.
15. Stebbing, J, Gazzard, B, Douek, DC. Where Does HIV Live?. *N Engl J Med* 2004; 350:1872.
16. Wawer, MJ, Gray, RH, Sewankambo, NK, et al. Rates of HIV-1 Transmission per Coital Act, by Stage of HIV-1 Infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 2005; 191:1403.
17. Wee J. Chng, Guat B. Tan, and Ponnudurai Kuperan. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an asian population by single-platform flow cytometry: influence age, sex, race and comparison with other published studies. *Clin and Diagnostic Laboratory*, Jan 2004, p. 168-173.
18. Weiming j, Laiyi K, et al. Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai. *Clin and Diagnostic Laboratory*, july 2004, p. 811-813.
19. Zhu Ping, Jun Liu, Julian Bess, Jr, Elena Chertova, Jeffrey D. Lifson, Henry Grisé, Gilad A. Ofek, Kenneth A. Taylor and Kenneth H Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Roux, Nature* 441, 847-852 (15 June 2006) | doi:10.1038/nature04817; Received 8 March 2006; Accepted 24 April 2006; Published online 24 May 2006.