

## Estudio de las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo en un período de cuatro años

Sánchez-Balleste A, Marsán-Suárez V, Díaz-Domínguez G, Macías-Abraham C, Casado-Hernández I, Pagés-Rodríguez AI, Palma-Salgado LE  
Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba  
Email: [amanda@hemato.sld.cu](mailto:amanda@hemato.sld.cu)

### RESUMEN

La determinación de linfocitos T, B y células asesinas naturales (AN) es esencial para diagnosticar inmunodeficiencias, trastornos linfoproliferativos y enfermedades oncohematológicas. La citometría de flujo (CF) ha sido en los últimos años un instrumento indispensable para el diagnóstico y seguimiento de dichas patologías, por ser una técnica de análisis celular altamente precisa para la separación y clasificación de células en suspensión, por ello es usada también para la determinación de subpoblaciones linfocitarias en forma de porcentaje. El objetivo fue evaluar las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias y su relación con las causas. Se analizaron 1403 muestras de sangre periférica del 2013 al 2016. Las subpoblaciones linfocitarias se determinaron por CF, utilizando anticuerpos monoclonales a antígenos linfoides y células AN. La lectura se realizó en un citómetro GALLIOS, Beckman Coulter y se analizaron utilizando el software Kaluza. Las impresiones diagnósticas más frecuentes durante los cuatro años fueron las infecciones respiratorias, en 276 pacientes; 68 con sepsis cutáneas; 60 con hipoplasia tímica; 38 con Síndromes Genéticos y 13 pacientes con alergias, el resto presentaron disímiles padecimientos. Los valores medios de las determinaciones de linfocitos T para éstas causas fueron: CD3+/CD4+ (32,74 %, 33,12 %, 32,02 %, 32,22 % y 35,68 %), CD3+/CD8+ (23,83 %, 24,42 %, 21,14 %, 24,03 % y 25,11 %), CD19+ (14,77 %, 13,54 %, 15,85 %, 12,51 % y 10,16 %) y AN (14,11 %, 15,46 %, 13,97 %, 13,8 % y 15,16 %), respectivamente. Para las cuatro primeras causas existe entre 20 y 30% de los valores

CD3+/CD4+ que se incluyen por debajo del límite inferior de los intervalos por edades, mostrando un comportamiento similar al marcador CD19+, para las mismas causas. Esta última determinación se comportó igual en los casos de alergias, pero no así con el resto de las determinaciones. La cuantificación de linfocitos T CD3+/CD4+ y de linfocitos B CD19+ muestran mayor alteración con respecto a los intervalos, en las principales causas analizadas.

**Palabras clave:** subpoblaciones linfocitarias, citometría de flujo.

## INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias tanto celulares como humorales, y su estudio, se encuentran constantemente en actualización para lograr la mejor caracterización inmunológica, un diagnóstico, tratamiento y pronóstico de estos pacientes. El estudio de las subpoblaciones linfocitarias de las células de línea T, B y AN, es de gran interés en la evaluación del estado inmunológico de varios trastornos de la misma naturaleza. Este estudio incluye diferentes marcadores de membrana celular, específicos de cada linaje, basándose en la diferenciación de cada subpoblación celular.<sup>1-3</sup> Por ello, es de gran importancia conocer la cuantificación de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias para orientar el estudio de las alteraciones inmunológicas que presentan estas enfermedades, y definir su diagnóstico.

Un elemento de diagnóstico esencial en algunas inmunodeficiencias ha sido la CF. Los resultados iniciales pueden sugerir las pruebas más útiles en la identificación final de estas enfermedades.<sup>2</sup> La CF es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido, que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz<sup>2</sup>. Entre las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad interna y cualquier componente celular que pueda ser marcado con un fluorocromo.

La utilización de la CFen la inmunología clínica ha contribuido a la mejor categorización de enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias primarias y secundarias, síndromes linfoproliferativos y hemopatías malignas<sup>4</sup>. Esta técnica es crucial en el contexto de la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de IDP, que incluye la enumeración de las subpoblaciones celulares y la evaluación de su funcionalidad<sup>5</sup>.

## **OBJETIVOS**

Evaluar las alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias y su relación con las causas que las originaron.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se estudiaron 1 403 pacientes con edades de 1 mes hasta 86 años, entre 2013 y 2016. El inmunofenotipaje celular se realizó mediante la técnica de CF. Se utilizaron 100 µL de sangre periférica, al que se le añadieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de diferenciación linfoides y de células AN. Se incubaron durante 20 a 30 min, protegidas de luz y a temperatura ambiente. El lisado de los hematíes se realizó con cloruro de amonio, durante 10 min. Luego, las células fueron lavadas en dos ocasiones con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. Para conservar la viabilidad, las células se fijaron con 300 µL de formaldehído a 1 %. Fueron leídas en un citómetro GALLIOS, Beckman Coulter y los datos obtenidos se analizaron con el software Kaluza versión 1.2. Los resultados obtenidos mediante este programa se compararon con intervalos de valores de referencia por edades.

## **RESULTADOS**

Los promedios de las determinaciones analizadas durante los cuatro años para linfocitos T CD3+/CD4+ fueron de 19,89 % en el 2013, 35,84 % en el 2014, 31,25 % en el 2015 y 33,43 % en el 2016; para un promedio de 30,10 % en el total de años. Para los linfocitos T CD3+/CD8+ se obtuvo un promedio en el 2013 de 11,72 %, en el 2014 21,37 %, en el 2015 24,31 % y en el 2016 23,71 %; para un promedio general de esa determinación de 20,28 %. En el caso de los linfocitos B CD19+ en el 2013 se obtuvo un promedio de 10,91 %; en el 2014, 13,68 %; en el

2015, 12,34 % y en el 2016, 14,24 %; para un total de 12,79 % durante los cuatro años. Las células AN se comportaron de manera similar a los linfocitos B CD19+, teniendo en el 2013 un promedio de 10,83 %, 15,15 % en el 2014; 15,49 % en 2015 y 13,03 % en 2016; para un total de 13,63 %.

Durante todo el período, las impresiones diagnósticas más frecuentes en los pacientes fueron infecciones respiratorias, en 276 pacientes; 68 con sepsis cutáneas; 60 con hipoplasia tímica; 38 con Síndromes Genéticos y 13 pacientes con alergias. Con menor cantidad de representantes y combinados con otros padecimientos estuvieron las inmunodeficiencias celulares, reacciones a vacunas, inmunodeficiencias primarias, diabetes mellitus, meningoencefalitis virales y bacterianas, osteomielitis, déficit humoral, síndrome adénico, leucopenia y trombocitopenia, trasplante de médula ósea, infecciones por citomegalovirus, leucemia, síndrome linfoproliferativo y VIH.

Las causas presentadas por mayor número de pacientes tuvieron valores promedios que se encontraron dentro de los intervalos de valores de referencias. Las determinaciones de linfocitos T, B y células AN para las infecciones respiratorias para el total años fueron: 32,74 %, 23,83 %, 14,77 % y 14,11 %, respectivamente. En los casos de las sepsis cutáneas se obtuvo un promedio para cada determinación de 33,12 %, 24,42 %, 13,54 % y 15,46 %. Para los pacientes con hipoplasia tímica, las determinaciones de linfocitos T, B y células AN fueron 32,02 %, 21,14 %, 15,85 % y 13,97 %, respectivamente. Estas determinaciones para los síndromes genéticos presentaron promedios de 32,22 %, 24,03 %, 12,51 % y 13,80 %; y para los casos de alergias 35,68 %, 25,11 %, 10,16 % y 15,16 %.

Para las primeras cinco causas más frecuentes se determinaron los porcentajes de los resultados que estuvieron inferiores y superiores a los intervalos de referencia de cada determinación. (tabla)

Los linfocitos T cooperadores se comportaron de manera similar a los linfocitos B CD19+ con respecto a los valores de referencia para los pacientes con infecciones respiratorias, sepsis cutáneas, hipoplasia tímica y síndromes genéticos. Los valores que se encontraron por debajo del límite inferior de los intervalos oscilaron entre el 20 y el 30 %. En los pacientes con alergias, solo los linfocitos CD19+ exhibieron valores inferiores al intervalo de referencia.

## CONCLUSIONES

- 40 % del total de pacientes estudiados presenta alteraciones en al menos una de las determinaciones analizadas (CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD19+ y células AN).
- Las impresiones diagnósticas que se encuentran en la mayoría de los pacientes son: las infecciones respiratorias altas y bajas, las infecciones cutáneas, hipoplasias tímicas, síndromes genéticos y las alergias.
- Las determinaciones que presentan mayor porcentaje de alteraciones son los linfocitos T CD3+/CD4+ y B CD19+.

## RECOMENDACIONES

Ampliar los fenotipos según las alteraciones encontradas en esta investigación y realizar el estudio en un período mayor de tiempo.

**Tabla 1.** Relación de porcentaje de los pacientes con resultados inferiores/superiores a los intervalos de valores de referencias por edades según las principales impresiones diagnósticas

Impresión Diagnóstica	Determinaciones (%)			
	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	AN
<b>Infecciones respiratorias</b>	22,83/4,71	6,88/8,33	21,01/3,62	3,99/7,61
<b>Sepsis cutáneas</b>	26,47/7,35	10,29/11,70	29,41/7,35	8,82/13,23
<b>Hipoplasia tímica</b>	20/8,34	11,67/6,67	35/3,34	3,34/8,33
<b>Síndromes Genéticos</b>	28,95/0	15,79/10,53	31,58/0	7,89/7,89
<b>Alergias</b>	7,69/0	0/15,38	23,08/0	0/0

## BIBLIOGRAFÍA

1. Boldt A, Borte S, Fricke S, Kentouche K, Emmrich F, Borte M, et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK- cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry: Part B - Clinical Cytometry*.2014; 86(3):191-206.
2. Hasan M, Beitz B, Rouilly V, Libri V, Urrutia A, Duffy D, et al.Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clin Immunol.* 2015 Apr;157(2):261-76. doi: 10.1016/j.clim.2014.12.008.
3. Leach M, Drommond M, Doig A, McKay P, Jackson B, Bain B. *practical Flow Cytometry in Haematology: 100 Worked Examples*. Oxford: Wiley Blackwell; 2015.
4. Maecker H.T, McCoy J.P, Nussenblatt R.Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* .2012; 12(3):191-200.
5. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2014;22(5): 162.