

## Anticuerpos linfocitotóxicos en donantes de sangre. Relación con anticuerpos Anti-VIH

*Sergio Rivera Pirela\*, Luigi de Salvo Cardullo, Jesús Weir Medina, Georgina Márquez Bohórquez, Dalida Salas, Hilda Pirela y Hassanhi Manzur*

*Instituto Hematológico de Occidente, Banco de Sangre del Estado Zulia, Maracaibo, Venezuela*

Recibido: 20-05-94. Aceptado: 22-11-94

### Resumen

El estudio serológico en ELISA ABBOTT VIH de 217.539 sueros de donantes voluntarios de sangre del Instituto Hematológico de Occidente, reveló la presencia de anticuerpos antiVIH en un total de 202 sueros (0,093%). Se estudiaron 559 sueros de donantes VIH seronegativos para detectar en ellos la presencia o no de linfocitotoxinas contra linfocitos normales observándose un 3,1% de linfocitotoxicidad en el suero de mujeres y 2,8% en los hombres. En 57 sueros VIH seropositivos se encontraron 13 sueros (22,8%) con actividad linfocitotóxica de los cuales 7 correspondieron a individuos de sexo masculino (18,7%) y 6 sueros (33%) correspondían al sexo femenino. La mayoría de los sueros VIH seropositivos con actividad linfocitotóxica presentaron lecturas por ELISA, mayores de "1" (87,5%). Los sueros con linfocitotoxicidad negativa VIH seropositivo con lecturas por ELISA con absorbancia inferior a "1" representaron el 91,84%. Dos sueros VIH positivos, linfocitotóxicos positivos reconocieron selectivamente la sub-población linfocitaria CD4 en linfocitos provenientes de donantes normales. La presencia de anticuerpos linfocitotóxicos se encuentra asociada a lecturas elevadas (mayores de 1) en individuos VIH seropositivos.

**Palabras clave:** CD4; ELISA; linfocitotoxinas; SIDA; VIH.

## Lymphocytotoxic antibodies in blood donors and their relation whit anti HIV antibodies

### Abstract

The serologic study in HIV ELISA Abbott from 217,539 wheys of volunter givers of blood from the Instituto Hematológico de Occidente, revalaed the presence of antibodies anti HIV in a total of 202 wheys (0.093%). 559 wheys were studied from seronegative HIV givers. To detect whether or hot the presence of lymphocitotoxicity againdst normal limphocytes obseving a 3.1% of lymphocitotoxicity in the whey of women and 2.8% in men. In 57 wheys HIV seropositive were found 13 wheys (22.8%). With lymphocitotoxic activity from which. 7 correspond to individuals of masculine sex (18.7%) and 6. Wheys (33%) correspond to the feminine sex. The most of the wheys HIV seropostive. With lymphocytotoxic activity presented readings with HIV ELISA, more than "1" (87.5%). The wheys with negative lymphocitotoxicity HIV seropositive with reading HIV ELISA less than "1" represented the 91.84%, two HIV seropositive wheys positive - lymphocitotoxic selectively acknonlige the lymphocyte

\* Autor para la correspondencia. Lab. HLA e Inmunología. Banco de Sangre del Edo. Zulia. Final Av. 20 al lado Maternidad "Castillo Plaza". 4001A. Maracaibo, Venezuela.

subpopulation CD4 in lymphocyte proceeding from normal givers. The presence of lymphocitotoxic antibodies is associated with higs readings (more the "1") in HIV seropositive individuals.

**Key words:** AIDS; CD4; ELISA; HIV; lymphocitotoxins.

## Introducción

Los anticuerpos linfocitotóxicos de la clase IgG, activos de presencia de complemento y con diferentes especificidades, han sido descritos en varios estados patológicos asociados con infecciones por virus o con alteraciones del aparato inmunológico, sugiriendo una participación de los mismos en la patogénesis de estas enfermedades (1-7).

Kiprov y col. 1984 (8) y Kloster y col., 1984 (9), han publicado la presencia de estos anticuerpos en un 90% de pacientes con el síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida (SIDA), demostrando una estrecha correlación entre la presencia de anticuerpos antilinfocitarios y la seropositividad contra agentes virales relacionados con el SIDA. Los anticuerpos estarían dirigidos preferencialmente contra la población linfocitaria CD4 (8), Szabo B. (10) Stroncek DF (11) en 1992 y Silvestris F en 1994 confirmaron la presencia de estos anticuerpos linfocitotóxicos en individuos VIH positivos con especificidad TCD4. (12).

Nuestro interés en este trabajo fue el de estudiar la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos en los sueros de donantes VIH seropositivos y la posible correlación existente entre estos dos parámetros, además, se trató de establecer la especificidad de estos anticuerpos linfocitotóxicos.

## Material y Métodos

### Toma de la Muestra

Las muestras de sangre fueron obtenidas de donantes voluntarios de diferentes edades y sexos. El suero fue extraído por la

técnica convencional. Para la purificación de los linfocitos se tomaron 5 ml de sangre periférica en tubos heparanizados (250 UI/ml sangre). Se prepararon series (pool) de 4 donantes hasta completar 38 donantes sanos VIH negativos.

Los linfocitos se separaron sobre His-topaque (Sigma) y se resuspendieron en medio de Hank's (Sigma), pH 7,2 más 10% de suero de bovino fetal, más antibióticos (penicilina, streptomycin, anfotericina B, 100 unidades/ml, 100 µg/ml - 2 µg/ml respectivamente), colocando los linfocitos a una concentración de  $3 \times 10^6$  ml.

### Sueros

Se recuperaron 559 sueros de donantes voluntarios de sangre, adultos, de ambos sexos, y se enfrentaron a los linfocitos totales de los 38 donantes antes mencionados, en la prueba de linfocitotoxicidad descrita por Terasaki (13).

### Determinación de Anticuerpos Anti VIH

Los sueros de 217.539 donantes voluntarios de sangre fueron estudiados utilizando el equipo ELISA ABBOTT para VIH (ABBOTT - VIH - EIA), considerándose como positivos los sueros con lecturas comprendidas entre 0,115 y mayores de 2,0 según instrucciones. Todos los sueros VIH positivos fueron confirmados por la técnica de Western Blot (Dupont Laboratories).

### Separación de poblaciones linfocitarias

Se realizaron separaciones de linfocitos T y B en un pool de 20 donantes, utilizando columnas de fibras de nylon según la técnica descrita por Danilov y col. (14). La pureza de los mismos fue verificada con anticuerpos monoclonales por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Monoclonal-

Tabla 1  
Estudio de la pureza de las poblaciones linfocitarias

| Anticuerpos | Población no adherente<br>(Linfocitos T) | Población adherente<br>(Linfocitos B) |
|-------------|--|---------------------------------------|
| CD2         | 99%                                      | 10%                                   |
| CD3         | 93%                                      | 15%                                   |
| CDW 14      | 0%                                       | -                                     |
| CD19 (B4)   | -  | 80%                                   |
| CD20 (B1)   | 0%                                       | 69%                                   |

\*Pool: 20 donantes.

les COULTER COUNTER: CD19, CD20, CD3, CD2 y CDW14, Florida, EE.UU) (Tabla 1)

#### Determinación de la clase y la especificidad de los anticuerpos

Para determinar la clase de inmunoglobulina, nueve sueros fueron tratados con 2 mercapto ethanol (2ME) para eliminar la actividad IgM.

Se utilizó la prueba de inmunofluorescencia a dos colores descrita por Van Rood en 1976 (15), con ciertas modificaciones. Los linfocitos T purificados, provenientes de sangre de donantes normales, fueron marcados inicialmente con los anticuerpos monoclonales CD4 o CD8 separadamente (técnica equipo COULTER COUNTER). Una suspensión de linfocitos T (0,1 ml) a una concentración de  $1 \times 10^6$ , se incubó (30 min, 4 grados centígrados) con 100  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal, se lavaron tres veces (lavados con PBS, 1% BSA y 0,1% de azida de sodio) y luego se incubaron con 50  $\mu$ l de conjugado antiinmunoglobulina G fluorescente (COULTER COUNTER) 20 min a 4 grados centígrados. Posteriormente las células fueron tratadas separadamente con 0,4 ml de suero de 2 donantes VIH seropositivos (ambos con lecturas mayores de 2,0) durante 30 min, y se les agregó 0,8 ml del complemento de conejo (PEL FREEZ) deján-

dose en incubación por una hora a 37 grados centígrados, seguida de 3 lavados, 2 minutos (450g).

El índice de células muertas fue revelada con bromuro de etidium 1/50 (solución madre 100mg/ml en EDTA al 5%), en el microscopio de fluorescencia (ZEISS con sistema de epifluorescencia). Se observó la coloración verde de la fluorescencia dada por el complejo ligado al monoclonal anti CD8 o anti CD4 en la periferia de las células y la coloración naranja de las células muertas en el núcleo de aquellas que incorporaron el bromuro de etidium.

#### Métodos Estadísticos

La prueba de  $X^2$  fue utilizada para determinar la diferencia entre los parámetros evaluados en este estudio.

#### Resultados

El estudio de los sueros provenientes de donantes voluntarios de sangre dio un total de 202 sueros VIH seropositivos, lo cual representa un 0,093% para 1993 (Tabla 2).

El estudio de linfocitotoxicidad de 559 sueros de donantes voluntarios de sexo

Tabla 2  
 Incidencia de positividad de anticuerpos Anti-VIH en donantes de sangre del Estado Zulia  
 Lapso: 1987 - 1993

| Distrito    | No. Casos | No. Positivos | % de Positividad |
|-------------|-----------|---------------|------------------|
| Maracaibo   | 151.164   | 189           | 0,086            |
| Bolívar I   | 51.823    | 8             | 0,0036           |
| Bolívar II  | 3.946     | 1             | 0,0004           |
| Baralt      | 3.123     | -             | -                |
| Colón       | 2.090     | 2             | 0,0009           |
| Sucre       | 2.593     | 1             | 0,0004           |
| Perijá      | 4.561     | 1             | 0,0004           |
| El Vigía    | -         | -             | -                |
| Mara / Páez | 1.362     | -             | -                |
| TOTALES     | 217.539   | 202           | 0,093            |

Tabla 3  
 Estudio de anticuerpos linfocitotóxicos en donantes VIH-negativos y VIH-positivos

| Donantes | VIH - Seronegativo |      |       | VIH - Seropositivo |      |        |
|----------|--------------------|------|-------|--------------------|------|--------|
|          | N                  | LCT+ | %     | N                  | LCT+ | %      |
| Hombres  | 521                | 15   | 2,87% | 38                 | 7    | 18,42% |
| Mujeres  | 38                 | 1    | 2,63% | 19                 | 6    | 31,57% |

N = Número de sueros.

LCT = Número de sueros con actividad linfocitotóxica.

masculino, VIH-sero-negativos y de edades comprendidas entre los 18 y 53 años, fue positivo en el 2,8% de los casos para los hombres y en el 2,63% de los casos para las mujeres (Tabla 3).

De los sueros VIH-seropositivos (57 en total), 38 fueron de donantes masculinos y 19 femeninos. De los masculinos 7 resultaron con actividad linfocitotóxica (18,42%) y de los femeninos 6 mostraron también actividad linfocitotóxica (31,57%) (Tabla 3).

Sólo 4 sueros mostraron especificidad contra linfocitos T. Un suero proveniente de

una mujer destruyó exclusivamente linfocitos B. Los sueros restantes, con actividad linfocitotóxica detectaron por igual T y B.

La mayoría de los sueros con actividad linfocitotóxica (87,5%) presentaron lecturas en ELISA VIH comprendidas entre 1 y 2. En el grupo de sueros sin actividad linfocitotóxica la mayoría (91,84%) se situaron en el rango de lecturas comprendidas entre 0,115 y 1. Esta diferencia fue altamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabla 4).

Dos sueros con lecturas ELISA VIH mayores de 2 y con especificidad por los

Tabla 4  
Actividad linfocitotóxica en sueros VIH positivos según el rango de lecturas obtenidas por ELISA

| Actividad linfocitotóxica | No. Sueros | Rango de positividad<br>0,115-1,0 | Anti-VIH ELISA<br>1,0-2,0 |
|---------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Positiva                  | 13         | 8,16%                             | 87,5%                     |
| Negativa                  | 44         | 91,84%                            | 12,5%                     |

P < 0.001

Tabla 5  
Estudio hematológico de la población linfocitaria en pacientes VIH seropositivos

| No. PAC | Edad | D.O   | Pob. CD4% | Pob. CD8% | No. Linf/mm <sup>3</sup> | No. Linf.T1 | No. Linf.T11 | No. Linf.T4 | No. Linf.T8 | Indice T4/T8 |
|---------|------|-------|-----------|-----------|--------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| 35      | 19a. | 2.000 | 19        | 22        | 2.197*                   | 1.889       | 2.057        | 868         | 1.001       | 0,86         |
| 31      | 22a. | 1.470 | 10        | 56        | 1.231*                   | 1.593       | 1.663        | 159         | 892         | 0,17         |
| *64     | 30a  | 0.986 | 18        | 45        | 1.007                    | 684         | 664          | 123         | 307         | 0,40         |
| *66     | 27a  | 2.000 | 20        | 70        | 1.720                    | 1.462       | 1.410        | 292         | 1.023       | 0,28         |
| *69     | 45a. | 1.257 | 1         | 81        | 1.359                    | 1.114       | -            | 11          | 902         | 0,01         |
| *78     | 28a. | 1.807 | 39        | 48        | 3.286                    | 2.793       | 2.694        | 1.089       | 1.340       | 0,81         |
| +79     | 23a  | 1.056 | 8         | 76        | 859                      | 704         | -            | 56          | 535         | 0,1          |
| *81     | 28a  | 2.000 | 8         | 63        | 2.574                    | 1.750       | 1.102        | 140         | 1.102       | 0,12         |

\* Con Sintomatología

+ Fallecido

linfocitos T exclusivamente fueron estudiados frente a poblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+, encontrándose una actividad linfocitotóxica exclusivamente frente a la población T CD4+. La relación T CD4/CD8 en estos dos pacientes fue de 0,17 y 0,86 (Tabla 5).

Se trataron 9 sueros con 2-ME y sólo 2 perdieron su actividad linfocitotóxica.

## Discusión

El estudio de un alto número de donantes voluntarios para detectar anticuerpos anti VIH demostró la presencia de 0,093% de individuos positivos hasta diciembre de 1993 en el servicio de Inmunología del Banco de Sangre del Instituto Hematológico de Occidente del Estado Zulia, Venezuela.

La búsqueda de anticuerpos anti linfocitario en los sueros VIH seropositivos reveló un alto porcentaje de sueros positivos en comparación los VIH negativos en los cuales sólo se detectó un 2,8% de linfocitotoxicidad. Estos anticuerpos mostraron actividad linfocitotóxica en presencia de complemento y a juzgar por el ensayo del 2-ME pertenecen principalmente a la clase IgG.

Igualmente, dentro del grupo VIH seropositivo la mayoría de los sueros con actividad linfocitotóxica se situaron dentro del rango de lecturas obtenida por inmunoen ensayo enzimático (ABBOTT-ELISA VIH) entre 1 y 2, indicando la existencia de una correlación entre estos dos parámetros.

Aun cuando la mayoría de los sueros con actividad linfocitotóxica reconocieron por igual linfocitos T y B, aquellos que mostraron especificidad por la población linfocitaria T detectaron exclusivamente la subpoblación TCD4+. El único suero específico contra linfocitos B provino de un paciente femenino.

Los anticuerpos linfocitotóxicos dependientes de complemento han sido descritos en más del 90% de pacientes VIH seropositivos (8,9). Estos anticuerpos se reportan principalmente como perteneciendo a la clase IgG (16). Sin embargo en 2 de los casos estudiados la actividad linfocitotóxica fue inhibida por el tratamiento del 2-ME sugiriendo la presencia además de anticuerpos de la clase IgM.

El mayor porcentaje de linfocitotoxicidad se observó en mujeres VIH seropositivas, el mismo duplicó las cifras obtenidas en hombres del mismo grupo. Estas cifras pueden indicar que los anticuerpos observados en mujeres vayan dirigidos además contra antígenos de histocompatibilidad (1).

La especificidad de los anticuerpos linfocitotóxicos en sueros de pacientes VIH seropositivos con sintomatología de SIDA ha sido descrita contra población T CD4 "preferencialmente" (8), lo cual coinciden

con nuestro resultado en el sentido de que estos anticuerpos son capaces de reconocer otras subpoblaciones linfocitarias.

La correlación observada entre la actividad linfocitotóxica en sueros con lecturas ELISA-VIH mayores de 1 muestra la participación de estas linfocitotoxinas en la evolución de la enfermedad como ha sido sugerido por Kiprov y Klosteren en 1984 (8,9).

Este modelo de autoinmunidad ha sido propuesto para otras patologías especialmente en Lupus Eritematoso Sistémico, donde han sido relacionados los anticuerpos linfocitotóxicos con los estadios de actividad de la enfermedad (3,5). No pueden descartarse que en el SIDA los anticuerpos linfocitotóxicos pueden intervenir en la linfopenia anti T-CD4 producto de una defensa antiviral que repercute en la destrucción del sistema inmune (17,10,11).

En nuestro estudio hemos demostrado que la actividad linfocitotóxica no está dirigida exclusivamente contra la población CD4, sino que también se encuentran anticuerpos contra linfocitos B. Sin embargo, dos sueros estudiados por la prueba de inmunofluorescencia a dos colores muestran una especificidad anti CD4 exclusivamente. Esto, ligado al hecho de que el virus VIH posee un tropismo especial para los linfocitos CD4 y que la destrucción de los mismos conlleva a la marcada deficiencia de la inmunidad celular en los pacientes, hace pensar que los anticuerpos linfocitotóxicos pudiesen jugar un papel importante en la fisiopatogenia de la enfermedad, como ha sido sugerido por Kiprov y Klosteren en 1984 (8,9), y por Silvestris F y colaboradores en 1994 (11).

En conclusión podemos decir que los anticuerpos linfocitotóxicos se encuentran en mayor porcentaje en los individuos VIH positivos que en los donantes de sangre normales. La presencia de anticuerpos linfocitotóxicos está asociada con lecturas superiores a "1" en el ensayo VIH ELISA en

aqueellos individuos seropositivos, pudiendo utilizarse este parámetro como valor pronóstico en un estudio donde se tomen en cuenta, además, un conjunto de síntomas asociados al SIDA.

### Agradecimiento

Al personal de Laboratorio de Histo-compatibilidad e Inmunología del Banco de Sangre del Estado Zulia.

### Referencias bibliográficas

1. KREISLER M.S., TERASAKI P. E.: Cytotoxins in diseases. *Transplant Proc* 3:112-118, 1971.
2. MITTAL K.K., ROSSEN R.D., SHARP J. T., LIDSY M.D., BUTLER W.T.: Lymphocyte cytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nature* 255:1255-1259, 1970.
3. OOI B.S., ORLINA A.R., PESCE A.J., MENDOZA N., MASAITIS POLLACK V.E.: Lymphocytotoxic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 17:237-245, 1974.
4. STASTNY P., ZIFF M.: Antibodies against cell membrane constituents in systemic lupus erythematosus and related disease. Cytotoxic effect of serum from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) for allogenic and for autologous lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 8:543-550, 1971.
5. TERASAKI P.I., MOTTIRONI V.D., BARNETT E.V.: Cytotoxins in disease. Autocytotoxins in lupus. *N Engl J Med* 283:724-727, 1970.
6. WINFIELD K.B., WINCHESTER J.R., WERNET P., KUNKEL H.G.: Nature of cold reactive antibodies to lymphocyte surface determinant in systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 18:1-8, 1975.
7. WINFIELD K.B., WINCHESTER J.R., WERNET P., KUNKEL H.G.: Specific concentration of antilymphocyte antibodies in the serum cryoprecipitates of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 19:399-406, 1975.
8. KIPROV D., ANDERSON R., MORAND P., SIMPSON D., CHERMANN J.C., LEVY J., MOSS A.: Antilymphocyte antibodies and seropositivity for retroviruses in groups at high risk for AIDS. *N Engl J Med* 312 (23): 1517-1521, 1984.
9. KLOSTER B., TOMAS R., SPIRA T.: Lymphocytotoxic antibodies in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Clin Immunol and Immunopathol* 30: 330-339, 1984.
10. SZABO-B., TOTTH F.D., KISS J., FUST G., UJHELYI E., BANHELYI D., HORVATH A.A., HOLLAN S.R.: Prevalence and specificity of lymphocytotoxic antibodies in different stages of HIV infection. *Acta Virol Praha* 36(4):392-400, 1992.
11. STRONCEK DF., KLINE WE., CLAY ME., PLACHTA LB., STRICKER RB., HOLLANDER H., GREENSPAN JS., SKUBITZ KM.: Antibodies to granulocytes in patients in infected with human immunodeficiency virus. *J Lab Clin Med* 119(6):724-731, 1992.
12. SILVESTRIS F., CAFFORIO P., ROMITO A., DAMMACCO F.: Molecular specificities of CD4+ T cell-reactive IgM in human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *Clin Immunol Immunopathol* 70(1):40-46, 1994.
13. TERASAKI P., BERNOCO D., PARK M.S., OZTURK G., IWAKY Y.: Microdot testing for HLA-A.B.C. and D antigens. *Amer J Clin Pathol* 69(2):103-120, 1978.
14. DANILOV J.A., AYOUB G., TERASAKI P.I.: *Lymphocyte isolation by trombin nylon wold. Histocompatibility testing.*

- UCLA Laboratory, California (USA), 1980, pp. 287-288.
15. VAN ROOD J. J., VAN LEEUWEM A., PLOEM J.S.: Simultaneous detection of two cell populations by Two color fluorescence and application recognition of B cells determinants. *Nature* 262:795-797, 1976.
16. KIPROV D., BUSH D.F., SIMPSON D.M.: ***Antylmphocyte serum factors in patients with acquired immunodeficiency syndrome.*** Gottlieb M, Groopman I (eds). New York (USA), 1984, pp. 299-308.
17. WEIMER R., VoOLKER D., ZIMMERMANN R., SHIMPF K., OPELZ G.: Autoantibodies Against CD4 cells are associated with CD4 helper defects in human immunodeficiency virus - Infected Patients. *Blood* 77 (1):133-144, 1991.