

# EXPRESIÓN DE CD63 EN BASÓFILOS COMO INDICADOR DE DEGRANULACIÓN INDUCIDA POR LÁTEX, DICLOFENACO SÓDICO O ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

Fernández P.<sup>1</sup>; Chaparro P.<sup>1</sup>; Pereira, P.<sup>2,3</sup>; Castillo JL<sup>2,3</sup>

(1) Estudiante Tecnología Médica, Mención Laboratorio Clínico, Departamento de Especialidades Médicas, Universidad de Concepción, Chile. (2) Escuela de Tecnología Médica, Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Chile. (3) Laboratorio Citometría de Flujo, Hospital del Trabajador Concepción. (4) Centro de Diagnóstico Oncoinmunológico Limitada.

**Introducción:** Los basófilos ante una segunda exposición a un alérgeno (previa sensibilización) son activados y por medio de transducción de señales vía proteína quinasa expresan en su membrana CD63. Por citometría de Flujo es posible evaluar la expresión de este marcador.

**Objetivo:** Evaluar la degranulación de basófilos, mediante la expresión de CD63 como método de diagnóstico en el estudio de reacciones de hipersensibilidad frente a látex, diclofenaco sódico y ácido acetilsalicílico.

**Metodología:** A partir de sangre periférica heparinizada, de pacientes con y sin antecedentes clínicos de hipersensibilidad, se prepara una suspensión celular conteniendo basófilos, los cuales son estimulados con PMA (phorbol miristato acetato) y desafiados frente a diferentes alérgenos (látex, diclofenaco sódico y ácido acetilsalicílico), para luego ser marcados con anticuerpos anti CD45, anti IgE y anti CD63. Se desarrolla un algoritmo a fin de determinar un índice de discriminación de estimulación de basófilos, indicador de reactividad *in vitro* de estas células para cada alérgeno.

**Resultados:** Los ensayos de reactividad *in vitro* al látex, diclofenaco sódico y ácido acetilsalicílico en los pacientes con antecedentes de hipersensibilidad, resultaron estadísticamente significativos, respecto de pacientes sin antecedentes de hipersensibilidad.

**Discusión:** Se propone el índice de discriminación de la estimulación de basófilos en función de la expresión de CD63 en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a un determinado alérgeno, como una técnica rápida, y reproducible para el estudio *in vitro* de la degranulación de basófilos tras su activación. (REVLAB 2008; 2: 6-10).

**Introduction:** basophils in a second exposure to an allergen (previous after sensitization) are activated by signal transduction via protein kinase and expressed in its membrane CD63. By flow cytometry is it possible to evaluate the expression of this marker.

**Objective:** To evaluate the degranulation of basophils, through the expression of CD63 as a diagnostic method in the study of hypersensitivity reactions against latex, sodium diclofenac and acetylsalicylic acid.

**Methodology:** From heparinized peripheral blood of patients with and without hypersensitivity clinical history, it's prepared a cell suspension containing basophils, which are stimulated with PMA (phorbol myristate acetate) and challenged against with different allergens (latex, sodium diclofenac and acetylsalicylic acid). After that, there were labeled with anti CD45, anti CD63 and anti -IgE. An algorithm was developed to determine an discrimination index of basophils stimulation, as an indicator of responsiveness of these cells *in vitro* to each allergen.

**Results:** The assays of *in vitro* reactivity to latex, sodium diclofenac and acetylsalicylic acid in patients with a hypersensitivity history, were statistically significant regarding with respect to patients without it.

**Discussion:** It is proposed the rate of stimulation basophils discrimination based on the expression of CD63 in patients with a hypersensitivity history to a particular allergen, as a rapid and reproducible technique, for the *in vitro* study of the basophils degranulation after activation. (REVLAB 2008; 2: 6-10)

**Palabras Clave:** Hipersensibilidad tipo I, Basófilos, CD63, alérgenos, Citometría de Flujo, degranulación

**Key words:** Type I hypersensitivity, basophils, CD63, allergens, flow cytometry, degranulation

(\*) Correspondencia a: Juan Luis Castillo N., TM MsC. Laboratorio Citometría de Flujo, Hospital del Trabajador Concepción, Cardenio Avello 36. Dpto. Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Fono/Fax: 56-41-2204807, Casilla 160-C E-mail: [jucastillo@udec.cl](mailto:jucastillo@udec.cl)



## Introducción

La efectividad de un sistema homeostático, estará dada por la interacción del genotipo con el ambiente, determinando así el fenotipo que portará el individuo durante su vida. El sistema inmune no es la excepción, de esta forma encontramos diferentes alteraciones entre las cuáles están las llamadas hipersensibilidades, término que hace alusión a una respuesta inmune aumentada, exagerada e inapropiada frente a determinados alérgenos<sup>(1,2)</sup>.

Hacia el año 1963, Gell y Coombs, clasificaron en base a mecanismos inmunológicos, los fenómenos de hipersensibilidad en cuatro tipos: I o IgE dependiente, tipo II o mediada por anticuerpos, tipo III o mediada de complejos inmunes y tipo IV o tardía mediada por linfocitos T<sup>(3)</sup>.

En el caso de la hipersensibilidad Tipo I o también llamada hipersensibilidad inmediata, son característicos los niveles elevados de IgE sérica debido a la hiperreactividad a antígenos que normalmente carecen de patogenicidad<sup>(4)</sup>, dentro de los que destacan *Dermatophagoides sp*<sup>(2)</sup>, anti inflamatorios no esteroideos<sup>(5)</sup>, antibióticos betalactámicos<sup>(6)</sup> y látex<sup>(7)</sup>. La secuencia de acontecimientos típica de la hipersensibilidad inmediata mediada por la IgE consta de varias etapas, que comienzan con la exposición inicial de un alérgeno. El encuentro inicial con un alérgeno recibe el nombre de fase de sensibilización<sup>(1)</sup>. Frente a una segunda exposición al mismo alérgeno se desarrollará la fase de activación generando dentro de la célula ya sea basófilo y/o mastocito<sup>(8,9)</sup>, una cascada de activación en base a proteínas del tipo quinasas. Esta activación culminará con la liberación de mediadores preformados, productos del metabolismo del ácido araquidónico y a nivel celular se realiza una síntesis de *ново* de citoquinas principalmente del tipo Th2<sup>(10)</sup> y expresión de nuevos antígenos de membrana, entre ellos CD63<sup>(11)</sup>. *In vitro*, el CD63 es expresado cuando los basófilos son estimulados con alérgenos o anticuerpos anti-IgE<sup>(12)</sup>. En 1962, W.B. Shelley<sup>(13)</sup> introduce un método basado en la degranulación de los basófilos tras su incubación con el correspondiente alérgeno específico.

En la actualidad la Citometría de Flujo ha sido utilizada para evaluar *in vitro* la degranulación de los basófilos de sangre periférica frente a diversos alérgenos, a partir de la detección de la expresión del marcador CD63<sup>(14)</sup>. Más aún si se consideran los riesgos inherentes que presenta la realización de una prueba de desafío cutáneo, la cual se realiza *in vivo*, no estando libre de

complicaciones para el paciente. Dentro de este contexto, el objetivo de este estudio de tipo experimental, es evaluar la degranulación de basófilos como método de diagnóstico en el estudio de reacciones de hipersensibilidad frente a alérgenos de tipo medicamentoso y a látex, procedimiento efectuado *in vitro* a partir de una muestra de sangre periférica.

## Materiales y métodos

**Pacientes:** En el caso del látex, el grupo estudiado correspondió a un total de 16 pacientes, de los cuales, 7 (43.8%) tenía historia clínica de manifestaciones de Hipersensibilidad tipo I y 9 (56.2%) sin historia clínica de esta enfermedad. Para diclofenaco sódico, se estudió un grupo total de 15 pacientes, 8 (53.8%) tenía historia clínica de manifestaciones de hipersensibilidad tipo I y 7 (47.2%) sin historia clínica de esta enfermedad. Los individuos estudiados corresponden a pacientes del Laboratorio de Citometría de Flujo, Hospital del Trabajador de Concepción, los cuales mediante la firma de un consentimiento informado aceptaron participar en este estudio.

**Tipo de muestra:** Se obtuvo mediante flebotomía, 3 ml de sangre periférica usando heparina de litio como anticoagulante.

**Obtención de suspensión celular conteniendo basófilos:** La muestra de sangre periférica fue sometida a centrifugación a 400g durante 5 minutos, a fin de poder retirar la inter fase leucocitaria (conteniendo eritrocitos, leucocitos y plasma), la cual nuevamente centrifugada para eliminar el plasma. A continuación se procedió a lavar con buffer salino fosfato (PBS), obteniéndose finalmente una suspensión celular en este buffer.

**Estimulación de Basófilos:** Brevemente, usando un buffer de estimulación (HEPES 20mM, NaCl 133mM, KCl 5mM, CaCl 7mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5mM, pH 7,0), se estimulan las células con PMA (phorbol miristato acetato) a una concentración final de 10 µg/ml. El control positivo, además contenía el alérgeno a estudiar en una concentración de al menos cinco veces la utilizada en cada ensayo en particular, a fin de asegurar una de granulación y la consiguiente expresión de CD63<sup>(6,11,15)</sup>. Posteriormente se procedió a una incubación de 15 minutos a 37°C. Para detener la estimulación, las muestras son sometidas durante 5 minutos a un golpe de frío y lavadas con PBS.

**Marcación con anticuerpos monoclonales:** Se utilizó anticuerpo anti IgE-FITC, anti CD63-PE y CD45-TC, todos Invitrogen. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad, posterior a lo cual se procedió a lisar glóbulos



rojos (FACS Lysing Solution, BD), incubando en oscuridad por 10 minutos con una solución de lisis comercial, para luego centrifugar a 400g por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue lavado con PBS, para finalmente ser resuspendido en 0.5 ml de PBS, para luego proceder a la adquisición de los datos en el citómetro de Flujo.

**Adquisición en citómetro de flujo:** La adquisición de los datos se realizó en un Citómetro de Flujo FACSCalibur equipado con un láser de argón (488nm) y usando el programa de adquisición y análisis CellQuest versión 3.3, con un mínimo de 10.000 y un máximo de 20.000 eventos celulares. La adquisición se realizó definiendo el umbral de detección (threshold) en función de FL-1(IgE) a fin de eliminar interferencias de células no basófilos y restos celulares.

**Análisis de Expresión IgE y antígeno CD63 positivo:** El análisis se efectuó usando el programa de adquisición y análisis CellQuest v.3.3, identificándose la población de basófilos mediante la combinación de los parámetros de tamaño (FSC), granularidad (SSC), expresión de CD45 y de IgE utilizando múltiples ventanas de análisis. Una vez identificada la población de basófilos se evaluó porcentualmente la expresión de CD63.

**Análisis estadístico:** Se consideraron las variables de antecedentes hipersensibilidad tipo I, y porcentaje de expresión de CD63 en basófilos (media y desviación estándar). Como prueba de significación estadística se utilizó la diferencia de promedios muestrales con base en la distribución t de Student<sup>®</sup>, utilizando el software Microsoft Excel 2007. Como medición de calidad se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de la técnica tanto en forma particular para cada alérgeno como en su totalidad, utilizando el software "evaluación de pruebas diagnósticas v.1.0.2 (unidad de Bioestadística clínica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España).

## Resultados

La expresión *in vitro* de CD63 en basófilos previamente activados frente determinados alérgenos se expresó en función del porcentaje de expresión de CD63. A fin de relacionar la expresión de CD63 frente a un determinado alérgeno, tanto para el control negativo (CN), control positivo (CP), como para concentración ensayada (CE) y así compararlas entre sí, se desarrollaron relaciones matemáticas, según las siguientes formulas:

$$\Delta T = \%CD63\ CE - \%CD63\ CN \quad (i)$$

Donde  $\Delta T$  es el porcentaje real de expresión de CD63 (o incremento del porcentaje de expresión de basófilos en la ventana de análisis correspondiente a la concentración ensayada, respecto del control negativo). Tomando como base la relación existente entre las concentraciones del alérgeno para el control positivo y la concentración estandarizada<sup>(6, 11, 15)</sup>, se obtiene el porcentaje de expresión de CD63 en basófilos (%D), el cual corresponde al producto de la expresión porcentual de la concentración del alérgeno ensayada con respecto al control positivo (30%, 25% y 20% para látex, diclofenaco de sodio y ácido acetilsalicílico, respectivamente) y que se definió como X, más el porcentaje de expresión de CD63 en el control negativo:

$$\%D = X\% \Delta T + \%CD63\ CN \quad (ii)$$

Finalmente para realizar la discriminación entre las muestras hipersensibilizadas *in vitro* y las no hipersensibilizadas *in vitro*, se definió un índice de discriminación de la estimulación de basófilos (IE), el cual esta dado por la razón entre el porcentaje de expresión de basófilos (%D) y el porcentaje de expresión de CD63 del control positivo:

$$I.E = \%D / \%CD63\ CP \quad (iii)$$

Este índice de discriminación de la estimulación de basófilos, debiera ser igual o superior a 0,5 para considerar una muestra hipersensible *in vitro* al alérgeno tratado.

En el grupo de pacientes en los cuales se ensayó reactividad *in vitro* al látex, el 50% presentó reactividad *in vitro*, es decir todos los pacientes con antecedentes clínicos de hipersensibilidad más un paciente sin antecedentes. El índice de discriminación de la estimulación de basófilos en función de la expresión de CD63 en los pacientes con antecedentes de hipersensibilidad, es significativamente mayor al de los pacientes sin antecedentes de hipersensibilidad ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1). La sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el ensayo de reactividad *in vitro* para látex fue de 100%, 88.89%, 87.59% y 100%, respectivamente, con un intervalo de confianza de 95% (Tabla 2).

El ensayo de reactividad *in vitro* a diclofenaco sódico, representado en la Tabla 3, muestra que el 50% de los pacientes presentaron reactividad *in vitro*, es decir, exactamente todos los pacientes con antecedentes clínicos de hipersensibilidad. Al igual con el ensayo para látex, el índice de discriminación de la



estimulación de basófilos en función de la expresión de CD63 en los pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a diclofenaco sódico, es significativamente mayor al de los pacientes sin antecedentes de hipersensibilidad ( $p < 0,05$ ). La sensibilidad diagnóstica para el ensayo de reactividad *in vitro* para diclofenaco sódico fue de un 100%, así como también la especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fue de 100%, también con un intervalo de confianza de 95% (Tabla 2).

Finalmente, en el grupo de pacientes con en los cuales se ensayó reactividad *in vitro* al ácido acetilsalicílico, sólo dos de los cuatro pacientes (50%) con antecedentes clínicos de hipersensibilidad, presentaron reactividad. A pesar de lo anterior, el índice de discriminación de la estimulación de basófilos en función de la expresión de CD63 en los pacientes con

antecedentes de hipersensibilidad a ácido acetilsalicílico, es significativamente mayor al de los pacientes sin antecedentes de hipersensibilidad ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4). Para el ensayo de reactividad *in vitro* para ácido acetilsalicílico, con un intervalo de confianza de 95%, la sensibilidad diagnóstica fue de 50%, la especificidad diagnóstica y el valor predictivo positivo fueron de 100% y valor predictivo negativo fue de 66.67% (Tabla 2).

Finalmente, considerando todos los alérgenos en conjunto, y con un intervalo de confianza de 95%, la sensibilidad diagnóstica de este ensayo fue 87.50%, la especificidad diagnóstica fue 94.44%, el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron de 93.35% y 69.47%, respectivamente (Tabla 2).

Paciente	% C(+)	30% ΔT + C(-)	IE	Hipersensibilidad Clínica	Reactividad in vitro
1	57.09	42.24	0.72	SI	SI
2	33.33	15.94	0.30	NO	NO
3	67.27	21.19	0.73	SI	SI
4	52.63	35.79	0.64	SI	SI
5	11.21	7.67	0.23	NO	NO
6	39.04	24.09	0.54	SI	SI
7	22.82	12.94	0.28	NO	NO
8	21.96	15.84	0.25	NO	NO
9	35.30	28.29	0.55	NO	SI
10	9.74	5.12	0.28	NO	NO
11	24.48	15.24	0.47	NO	NO
12	44.29	29.88	0.43	NO	NO
13	43.15	31.13	0.57	SI	SI
14	37.32	23.94	0.52	SI	SI
15	32.01	18.37	0.42	NO	NO
16	29.33	30.19	0.53	SI	SI

%C(+): Porcentaje de expresión de CD63 en basófilos en el control positivo. 30% ΔT + C(-): porcentaje de expresión de CD63 en función de la concentración del alérgeno respecto del control positivo. IE: Índice de discriminación.

Tabla 1: Ensayo de Reactividad *in vitro* a Látex.

**Discusión**

A través del tiempo, se han utilizado diferentes medios para el diagnóstico y posterior tratamiento de la Hipersensibilidad tipo I, basándose en la determinación de la IgE específica<sup>(14)</sup>. Estas técnicas poseen una gran

especificidad y sensibilidad cercana al 100%, sin embargo no siempre son rápidas y además permiten identificar el proceso de hipersensibilidad una vez que éste ya está en curso, no constituyendo un examen preventivo ante un alérgeno.



Ensayo Reactividad <i>in vitro</i>	Sensibilidad diagnóstica	Especificidad diagnóstica	VVP	VVPN
Látex (n=16)	100	88.89	87.50	100
Diclofenaco sódico (n=10)	100	100	100	100
Acido acetilsalicílico (n=8)	50	100	100	66.7
Todos (n=34)	87.50	94.44	93.35	89.47

VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo. (\*) Intervalo de confianza 95%.

Tabla 2: Pruebas diagnósticas para ensayo de reactividad *in vitro* a diferentes alérgenos

La citometría de flujo ha sido empleada para cuantificar la degranulación de los basófilos en reacciones de hipersensibilidad tipo I, comparándose sus resultados con diversas pruebas, entre ellas la detección de IgE específica<sup>(15)</sup>. El estudio de la expresión del antígeno de membrana CD63 por esta técnica ha permitido evaluar la activación *in vitro* de los basófilos por fármacos y alérgenos<sup>(5)</sup>. Esta metodología, ha permitido discriminar poblaciones de pacientes hipersensibles y no hipersensibles. En este estudio, proponemos el índice de discriminación de la estimulación de basófilos en función de la expresión de CD63 en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a un determinado alérgeno, como una técnica rápida, y reproducible para el estudio *in vitro* de la degranulación de basófilos tras su activación (evidenciada por la expresión de CD63). Esto se ha demostrado con los resultados obtenidos, ya que fue posible discriminar un grupo de pacientes estudiados en hipersensibles *in vitro* y no hipersensibles *in vitro* frente a determinado alérgenos, sin la necesidad de que el cuadro clínico esté instalado en el paciente, ni tampoco exponer al paciente aun test in vivo (prick test), el cual conlleva un riesgo asociado considerable.

Si bien nuestros resultados fueron estadísticamente significativos para los tres alérgenos ensayados ( $p < 0.05$ ), el reducido número de pacientes estudiados utilizados en los cálculos para pruebas diagnósticas, precisa realizar a futuro un mayor número de determinaciones con el fin de reafirmar las conclusiones obtenidas.

## Referencias

- ABBAS A., LITCHMAN A., Inmunología Celular y Molecular. Editorial Saunders, 2004; 3-5.
- GUZMÁN M<sup>a</sup> A. Alergias. Guía Clínica. Editorial Mediterráneo, 2004; 1; 15-37.
- BOUSQUET J., BIEBER T., FOKKENS M., HUMBERT M., KOWALSKI M., NIGGEMANN B., SIMON H-U. Themes in Allergy. Allergy. 2006; 61 (1); 1.
- ACERO S., TABAR A.I., GARCÍA B.E., ECHECHIPIÁ S., OLAGUIBEL J.M. Anaphylaxis: Etiological. Allergol Immunol. Clin. Diagnosis. 1999; 14 (3): 133-137.
- SANZ Ma. L., GAMBOA P., GARCÍA- AVILÉS C., DE WECK A., Drug Hypersensitivities: Which Room for Biological Test?. European Annals of Allergy And Clinical Immunology. 2005; 37 (6): 230-235.
- SANZ Ma , GARCÍA M.C., CABALLERO M.R. , DIEGUEZ I., GAMBOA P.M. "Test de Activación de Basófilos en el Diagnóstico de Alergia a Medicamentos". An. Sis. Sanit. Navar. 2003; 26 (2): 39-47.
- PORRAS O. Alergia al Látex una Revisión. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica). 2004; 39 (1); 12-23.
- ONO J. Molecular Genetics of Allergic Diseases. Annu. Rev. Immunol. 2000; 18: 347-366.
- GOULD H., SUTTON B., BEAVIL A., BEAVIL R., MCCLOSKEY N., COKER H., FEAR D., SMURTHWAITE L. The Biology Of Ige And The Basis Of Allergic Disease. Annu. Rev. Immunol. 2003; 21: 579-628.
- GALLI S., KALESNIKOFF J., GRIMBALDESTON ., PILIPONSKY ., WILLIAMS ., TSAI . Mast Cells as "Tunable" Effector And Immunoregulatory Cells: Recent Advances. Annu. Rev. Immunol.. 2005; 23; 749-786.
- MALBARÁN A., RIERA N., REY G., DE BRACCO M. ., GALASSI N.. Estudio del recuento y la activación de basófilos por citometría de flujo y su aplicación al diagnóstico de las enfermedades por hipersensibilidad inmediata. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica. 2003; 34:(2); 47-53.
- MALBARÁN A, LEVY Y., GALASSI N. La degranulación de basófilos de pacientes sensibles a diclofenac no se asocia con aumento de la expresión de CD63. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica. 2005; 36 (1): 3-8.
- SHELLEY WB. New serological test for allergy in man. Nature. 1962; 195: 1181-1183.
- QUIROS, J. Diagnóstico de alergias utilizando IgE alérgeno-específico, Revista Médica. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica). 2003; 38:(1-2); 20-25.
- SANZ Ma L., GARCÍA- AVILEZ M., TABAL A., ANDA M., GARCÍA B.E., BARBER D., SALCEDO G., RIHS H-R., RAULF-HEIMSOOTH M. Basophil Activation Test and IgE specific measurements using a panel of recombinant natural rubber latex allergens to determine the latex allergen sensitization profile in children. Pediatric Allergy and Immunology. 2005; 35:(9); 1-9.

