

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MARCADORES ASOCIADOS A LINAJE  
CELULAR EN MUESTRAS NORMALES DE MEDULA OSEA

Diana Carolina Roa Higuera

TRABAJO DE GRADO  
BACTERIOLOGIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BACTERIOLOGIA  
BOGOTA D.C. 2009

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MARCADORES ASOCIADOS A LINAJE  
CELULAR EN MUESTRAS NORMALES DE MEDULA OSEA

Diana Carolina Roa Higuera

Sandra Quijano Gómez MSc. PhD.  
Director

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BACTERIOLOGIA  
BOGOTA, 2009

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MARCADORES ASOCIADOS A LINAJE  
CELULAR EN MUESTRAS NORMALES DE MEDULA OSEA

Diana Carolina Roa Higuera

Viviana Rodríguez MSc. Cand. PhD  
Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BACTERIOLOGIA  
BOGOTA, 2009

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MARCADORES ASOCIADOS A LINAJE  
CELULAR EN MUESTRAS NORMALES DE MEDULA OSEA

Diana Carolina Roa Higuera

---

Ingrid Schuller. PhD  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

Luz Amparo Maldonado  
Directora  
Carrera Bacteriología

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BACTERIOLOGIA  
BOGOTA, 2009

## NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución n°13 de julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por la que la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## 1.0.- Justificación-Planteamiento del problema:

Desde el punto de vista diagnóstico, el análisis inmunofenotípico de las células hematopoyéticas normales mediante citometría de flujo multiparamétrica (CMF), ha representado una herramienta fundamental para clasificar diferentes tipos de neoplasias derivadas de estas células. En relación con las leucemias agudas y los síndromes mielodisplásicos (SMD), el estudio inmunofenotípico mediante CMF, está dirigido a la identificación de la línea celular implicada en el proceso de proliferación clonal y el estadio madurativo de la misma, empleando diferentes paneles de marcadores en el que se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos frente a antígenos con diferentes especificidades para cada línea. De esta manera, el análisis de la expresión combinada de diferentes antígenos en los blastos leucémicos y en los diferentes linajes linfoides y mieloides, en comparación con los fenotipos de células normales en distintos estadios de diferenciación es muy útil para clasificar inmunológicamente distintos tipos de leucemias y para el seguimiento terapéutico de estos pacientes, permitiendo discriminar las células neoplásicas de las células normales incluso cuando estas están presentes en frecuencias muy bajas.

En la actualidad se comercializan una gran cantidad de anticuerpos que se emplean para el diagnóstico inmunofenotípico de neoplasias hematopoyéticas. Estos reactivos deben haberse testado previamente para asegurar que emiten la intensidad de señal esperada y que identifican aquellos antígenos que expresan una señal débil, así como excluir con antelación la aparición de interacciones no deseadas entre reactivos. La intensidad de fluorescencia de cada anticuerpo debe ser probada en una muestra de sangre periférica normal o médula ósea normal que contenga poblaciones positivas y negativas para el anticuerpo de interés con el fin de optimizar cada reactivo.

Esta propuesta de trabajo de grado, busca cuantificar distintas subpoblaciones celulares hematopoyéticas de médula ósea normal, en términos absolutos y relativos y analizar la expresión de diferentes marcadores celulares cuya reactividad está asociada a la diferenciación linfóide y mielóide, con el fin de establecer diferentes rangos de expresión para los mismos.

## 2.0.- Marco teórico:

La hematopoyesis es un proceso complejo a través del cual las células madre hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, en donde una red de células estromales regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células en diferentes estadios de diferenciación y maduración (1-4). El proceso de diferenciación hematopoyética se describe como una jerarquía de células progenitoras, en la que cada estadio sucesivo se distingue del siguiente por un fenotipo y morfología característico, así como por el número y tipo de células hijas maduras que son capaces de generar. Alteraciones clonales en la hematopoyesis como consecuencia de alteraciones genéticas recurrentes presentes en diferentes poblaciones celulares, pueden conducir al desarrollo de distintas patologías que cursan con sobreproducción de células hematopoyéticas (como las leucemias y linfomas), o con una producción deficiente de las mismas (anemias y síndromes mielodisplásicos) (1-4).

Hasta hace relativamente poco tiempo, el conocimiento de la hematopoyesis normal se basaba en gran medida en los cambios morfológicos y citoquímicos detectados en los precursores hematopoyéticos en diferentes condiciones de cultivo, así como en las características de las células leucémicas, que se consideraba reflejaban un determinado estadio de la diferenciación normal. La introducción de anticuerpos monoclonales en el estudio de la médula ósea normal ha confirmado la gran heterogeneidad de los precursores hematopoyéticos, demostrando que los cambios morfológicos coexisten con distintos patrones de expresión inmunofenotípicos, de los distintos antígenos asociados a diferenciación celular (1).

Los anticuerpos monoclonales empleados en los análisis inmunofenotípicos están incluidos en el mismo CD (grupo de diferenciación) presentando reactividad para un mismo antígeno celular, pero con relativa frecuencia pueden identificar distintos epítopes mostrando en el mismo grupo de células una reactividad diferente. Por esta razón, es necesario evaluar su intensidad de expresión con el fin de establecer parámetros comparativos entre grupos de células normales y en diferentes tipos de muestras respecto a las células aberrantes de distintas neoplasias hematopoyéticas (5).

### **3.0.- Objetivo:**

#### **3.1.- Objetivo general:**

- Caracterizar fenotípicamente y cuantificar subpoblaciones celulares de médula ósea normal con el fin de ser utilizadas en un futuro como parámetro de análisis para la clasificación inmunológica y diagnóstico de las leucemias mieloides agudas y síndromes mielodisplásicos que se estudien en la Unidad de Citometría del Hospital Universitario San Ignacio.

### **4.0.- Metodología:**

**4.1.- Diseño del estudio:** Es un estudio básico descriptivo.

#### **4.2.- Recolección de muestras de médula ósea (MO):**

Se obtuvieron 5 muestras de MO de pacientes sometidos a reemplazo de cadera en el servicio de ortopedia del Hospital Universitario San Ignacio, quienes de forma voluntaria donaron la muestra después de firmar un formato de consentimiento informado. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

- a) Pacientes mayores de 60 años.
- b) Pacientes sin enfermedad hematológica de base.
- c) Pacientes no sometidos a tratamiento con factores de crecimiento, o drogas quimioterapéuticas-citotóxicas/inmunosupresoras.

#### **4.3- Disgregación de las muestras de MO:**

Una vez obtenidas las muestras de MO en condiciones de esterilidad, éstas se transportaron de forma inmediata al laboratorio de citometría de la facultad de ciencias, y en una cabina de flujo laminar y empleando un mortero, las MO fueron maceradas con el

fin de disgregar las diferentes poblaciones celulares y posteriormente filtradas (al menos en dos pasos) para eliminar exceso de grasa y espículas de hueso que posteriormente puedan impedir la manipulación de la muestra para marcaje por citometría de flujo. Después de realizar este proceso se obtuvieron aproximadamente 3-5 mL de muestra total.

#### **4.4- Marcaje de antígenos de membrana y citoplasma mediante citometría de flujo:**

Para realizar el análisis inmunofenotípico de las distintas subpoblaciones celulares en las muestras de MO disgregadas y filtradas, se empleó un panel de anticuerpos monoclonales y policlonales combinados en 4 fluorescencias distintas (Fluorocromos: FITC/PE/PERCPY5.5/PECY7/APC/APCCY7), con un protocolo que combina marcaje celular de antígenos de membrana y de citoplasma (ver descripción de los anticuerpos empleados en la tabla 1). En los tubos a los que se realizó exclusivamente el marcaje de antígenos de membrana (Tabla 2: tubos 4-9), a 100 ul de muestra de MO se les adicionó la cantidad adecuada de anticuerpo conjugado con fluorocromo (indicados en la tabla 2) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, una vez transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mL de solución de lisis durante 10 minutos y se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS, seguidos de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm.

Para llevar a cabo el marcaje simultáneo de antígenos de membrana y citoplasma (tubo 3), se empleó el kit de “fijación y permeabilización” (Dako). En primer lugar se realizó el marcaje de antígenos de membrana, seguido de incubación con 100 uL solución fijadora (Reactivo A de Intrastain) y posteriormente se adicionó solución de permeabilización (Reactivo B IntraStain) los cuales permiten la detección inmunológica de antígenos intracelulares permitiendo que la superficie celular continúe intacta en conjunto con el anticuerpo específico del antígeno de citoplasma. Las incubaciones en cada paso fueron realizadas durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, seguidas de lavados con PBS. Como control de autofluorescencia, se procesaron 2 tubos adicionales (Tabla 1: tubos 1- 2), sometidos a los mismos tratamientos descritos para los tubos 3-9, a excepción que a estos no se les adicionó anticuerpo conjugado.

Una vez realizado el marcaje y comprobada la compensación y calibración del citómetro, a cada tubo se le adicionó 10 uL de esferas fluorescentes (Cytocount-Dako) y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur BDB. Se adquirieron 100.000 eventos totales y se realizó un “gate” de 1.000.000 de eventos CD34+.



**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje de subpoblaciones celulares en médula ósea normal en combinaciones de 4 fluorescencias distintas**

CD	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Reactividad
CD45	PercP	2D1	BDB	Antígeno común leucocitario
CD34	APC	8G12	BDB	Células progenitoras hematopoyéticas
TdT	FITC	IS001	Dako	Precursores linfoides
MPO	PE	HM47	Dako	Linaje mieloide (Línea granulocito-neutrófilo, monocitos)
CD13	APC	WM15	BDB	Linaje mieloide (Precursores mieloides, Línea granulocítica: neutrófilo, eosinófilo, basófilo), monocitos, células dendríticas mieloides
CD11b	PE	M1/70	BDB	Línea granulocítica: neutrófilo, eosinófilo, basófilo), monocitos, células dendríticas mieloides
CD64	FITC	MOPC21	BDB	Línea granulocítica: neutrófilos y monocitos
CD14	PE	M5E2	BDB	Monocitos maduros
CD15	FITC	MMA	BDB	Línea granulocítica: neutrófilos y eosinófilos
CD33	PerCP	P67.6	BDB	Linaje mieloide
CD117	PE	104D2	BDB	Precursores mieloides, mastocitos, promielocitos
CD123	PE	9F5	BDB	Precursores mieloides, basófilos, células dendríticas, monocitos
CD36	PE	G155-228	Pharmingen	Línea eritroide, monocitos, células dendríticas, plaquetas
CD71	FITC	L01.1	BDB	Precursores mieloides, Línea eritroide, neutrófilos, monocitos
HLA-DR	FITC	L243(G46-6)	BDB	Células progenitoras hematopoyéticas, monocitos, células dendríticas, linfocitos B

CD: *cluster differentiation*; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; BDB: Becton Dickinson Bioscience.

**Tabla 2. Panel Inmunofenotípico utilizando 4 fluorescencias**

Fluorocromo	FITC	PE	PERCP	APC	Esferas
Cantidad por tubo	5 uL	5 uL	5 uL	3 uL	10uL
Tubo 1	supBLANCO	supBLANCO	supBLANCO	supBLANCO	+
Tubo 2	citBLANCO	citBLANCO	citBLANCO	citBLANCO	+
Tubo 3	nTdT	cyMPO	CD45	CD34	+
Tubo 4	CD34	CD11b	CD45	CD34	+
Tubo 5	HLA-DR	CD117	CD45	CD34	+
Tubo 6	CD64	CD14	CD45	CD38	+
Tubo 7	CD71	CD36	CD45	CD34	+
Tubo 8	CD15	CD16	CD33	CD45	+
Tubo 9	HLA-DR	CD123	CD45	CD34	+

Sup: superficie; Cit: citoplasma. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina.

#### **4.5.- Análisis de resultados:**

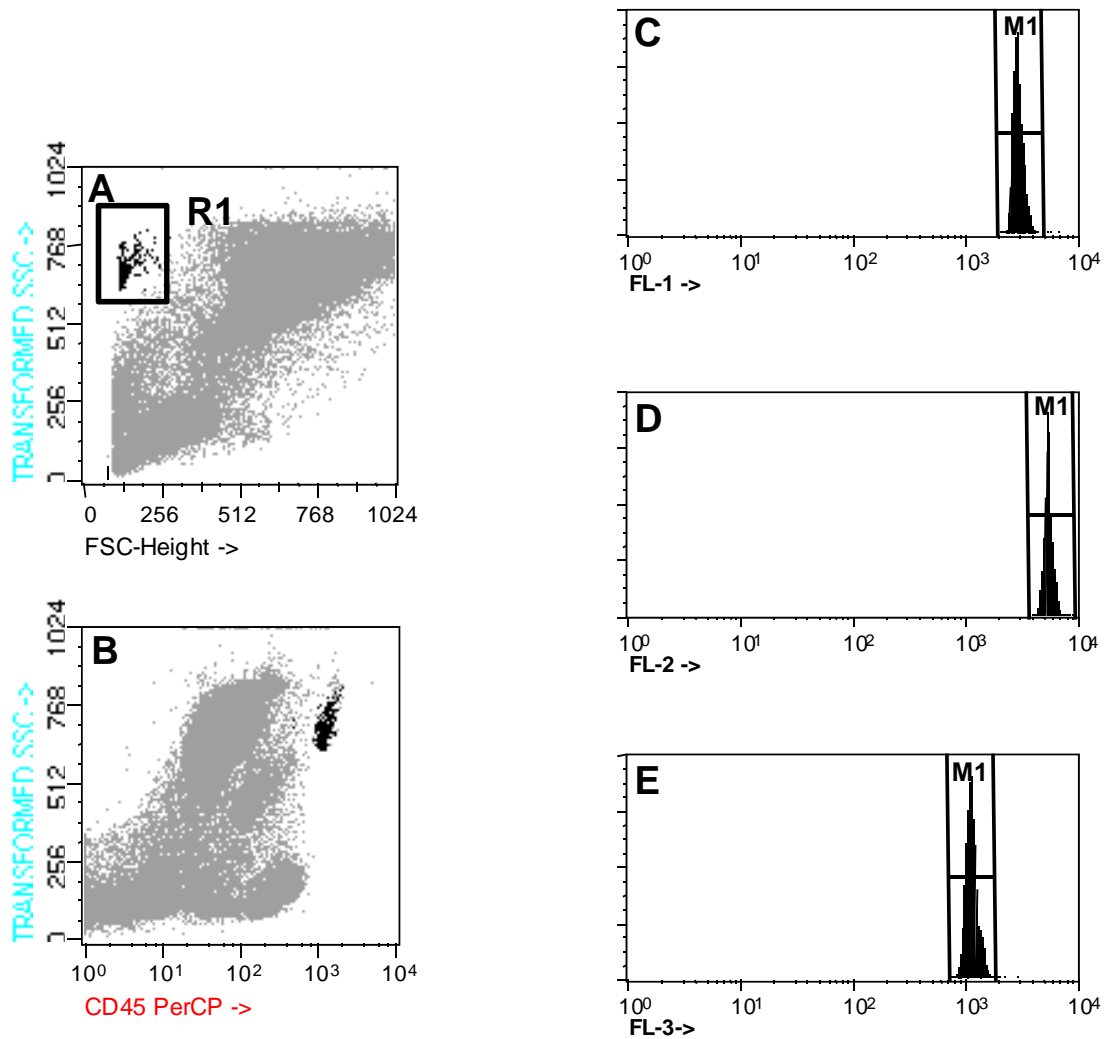
El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa informático Paint-A-Gate BDB, seleccionando las células de interés por su expresión de marcadores específicos de línea y su granularidad, así como una selección dual por medio de CD45 versus granularidad (SSC) (Figura 1). En este análisis se evaluaron las siguientes variables: frecuencia de las distintas subpoblaciones celulares en términos absolutos y relativos y la expresión de los diferentes antígenos en las distintas subpoblaciones en términos de porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia (MFI).

Para calcular el número absoluto de cada subpoblación celular en cada tubo realizado, se aplicó la siguiente fórmula (5):

$$\frac{\text{\# células en el gate}}{\text{\# de microesferas en el gate}} \times \frac{\text{\# microesferas añadidas por tubo}^a}{\text{volumen de muestra (ul)}^b} \times \text{factor de conversión}^c = \text{Células/uL}$$

- El número total de microesferas añadidas al tubo se calcula de la siguiente forma: volumen de microesferas añadidas al tubo (por ejemplo, 20 uL) x concentración de microesferas (microesferas/u) (este dato lo provee el fabricante).
- Volúmen total de la muestra de MO en el momento de su obtención.
- El factor de corrección será igual al volumen de la muestra una vez disgregada y concentrada (p.ej., 5000 ul) dividido por el volumen de la muestra concentrada utilizado para el marcaje en cada tubo (p.ej. 100ul). Así, en el protocolo descrito el factor de corrección será: 5000ul/100ul= 50.

Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un análisis descriptivo, determinando para las variables cuantitativas: media, mediana, desviación estándar y para las variables cualitativas las frecuencias absolutas y relativas, empleando el paquete estadístico SPSS versión 15 y se aplicó el test de Mann Whitney. Se consideraron como diferencias significativas cuando  $p < 0.05$ .



**Figura 1.** Ejemplo de análisis de esferas en una muestra de MO (eventos de color negro en los paneles A y B) para estimar un recuento absoluto por unidad de volumen de MO. En el panel A se representa el tamaño (*side scatter* –SSC-) y la complejidad (*forward scatter* –FSC-). El análisis se inicia realizando una selección de las esferas en FSC vs SSC (Región 1: panel A). El panel B muestra la región de esferas (R1) en relación con la expresión de CD45 de las diferentes subpoblaciones celulares de MO. Los paneles C-E muestran la intensidad de fluorescencia de la esferas para los canales FL-1, FL-2 y FL-3.

## 5.0.- Resultados

### 5.1.- Distribución de las diferentes subpoblaciones celulares de MO normal

En la tabla 3 se muestran los valores absolutos y relativos de las poblaciones leucocitarias de MO normal de 5 individuos diferentes.

Tabla 3. Valores normales (relativos y absolutos) de subpoblaciones celulares de médula ósea.

Subpoblación celular	Porcentaje de la celularidad Total		Número absoluto (células/uL)	
	Media $\pm$ DS	Rango	Media $\pm$ DS	Rango
Células CD34 totales	1.5 $\pm$ 0.7	0.7-2.5	117 $\pm$ 92	14-245
CD34+ linfoides	418 $\pm$ 196	205-603	201 $\pm$ 88	125-300
CD34+ mieloides	1.4 $\pm$ 0.5	0.6-1.9	102 $\pm$ 91	12-235
Línea granulocítica total	56 $\pm$ 9	42-64	3486 $\pm$ 3138	685-8151
Promielocitos	1.3 $\pm$ 1.1	0.7-2.1	108 $\pm$ 77	5-204
Mielocitos	9 $\pm$ 2	6-11.6	800 $\pm$ 622	92-1538
Metamielocitos	22 $\pm$ 11	14-42	1589 $\pm$ 1102	227-2895
Neutrófilos	30 $\pm$ 9	22-46	2272 $\pm$ 1533	311-4201
Promonocitos	0.7 $\pm$ 0.2	0.5-0.1	49 $\pm$ 27	2-72
Monocitos	4 $\pm$ 1	3-5	323-225	40-603
Eosinófilos	3.6 $\pm$ 1	2-5	150 $\pm$ 109	2-309
Basófilos	0.2 $\pm$ 0.2	0.1-0.7	13 $\pm$ 7	5-22
Células dendríticas plasmocitoides	0.3 $\pm$ 0.08	0.2-0.4	37 $\pm$ 23	3-70
Serie roja	17 $\pm$ 10	8-34	1286 $\pm$ 706	146-1870
Mastocitos	0.01 $\pm$ 0.006	0.01-0.02	8.5 $\pm$ -11	1 -28
Células dendríticas derivadas de monocito	0.3 $\pm$ 0.007	0.3-0.4	3 $\pm$ 1.7	2-5

Resultados expresados como media  $\pm$ 1 desviación estándar (DS).

### 5.2.- Características de dispersión de luz e inmunofenotipo de las diferentes subpoblaciones celulares de MO normal

En las tablas 4-6 se muestran los valores promedio, desviación estándar y rangos para las características de dispersión de la luz e intensidad de fluorescencia de marcadores de linaje linfóide y mielóide en las distintas poblaciones leucocitarias de MO normal de 5 individuos diferentes.

Al investigar las posibles diferencias existentes entre los marcadores inmunofenotípicos expresados en las células CD34+ de origen linfóide y mielóide, observamos que a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, las células CD34+ de origen mielóide se caracterizan por una expresión más elevada de CD34, CD45, y HLA-DR en conjunto con valores superiores de tamaño y granularidad (tabla 4; figura 2).

**Tabla 4. Células CD34+ hematopoyéticas: análisis de intensidad media de fluorescencia de complejidad interna y marcadores de linaje linfoide y mieloide.**

Parámetro	Precusores linfoides CD34+		Precusores mieloides CD34+		Valor de P
	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	
FSC	418±196	206-630	608±136	378-316	NS
SSC	201±88	125-300	324±329	282-373	
CD45	17±3	13-21	33±15	15-53	
CD34	165±139	30-325	278±92	147-375	
HLA-DR	203±21	188-218	572±155	396-729	
TdT	185±81	96-290	NE	NE	
MPO	NE	NE	306±318	22-256	
CD117	NE	NE	153±56	111-218	
CD123	NE	NE	35±12	27-50	
CD13	NE	NE	16±3	12-19	
CD71	NE	NE	61±48	26-116	

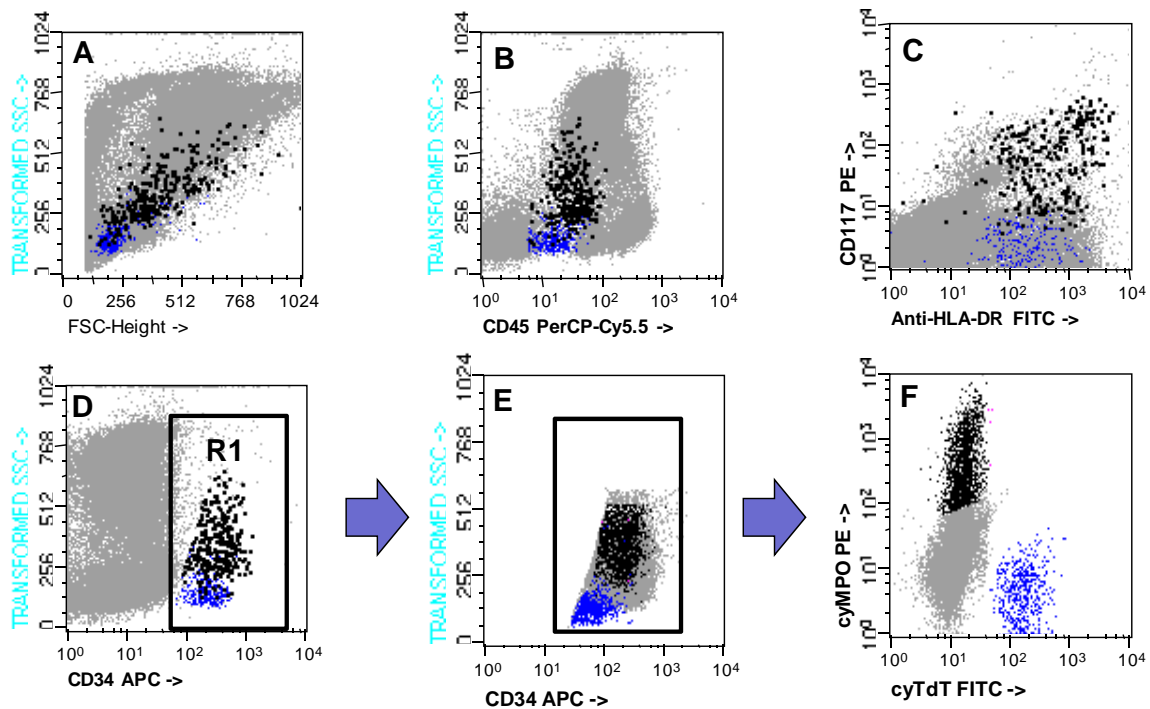
Resultados expresados como media ±1 desviación estándar (DS); NE: marcador fenotípico no evaluado en esta línea; NS: no estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ); FSC: *Forward scatter*, SSC: *side scatter*.

En relación con la línea granulocítica, observamos tal como está reportado en la literatura (4) que los neutrófilos se caracterizan por presentar una expresión significativamente más elevada de CD45 y CD11b respecto a los promielocitos, mielocitos y metamielocitos y son más complejos (granularidad –SSC-) respecto a los metamielocitos. Por otra parte, los promielocitos muestran niveles elevados de CD13 y corresponden a la única subpoblación celular dentro de este linaje con expresión de CD117 (Tabla 5; figura 3). Además la línea granulocítica mostró expresión para los marcadores CD15, CD16, MPO, CD33 y CD71, marcadores expresados principalmente desde el estadio madurativo de promielocito (tabla 6) (2).

**Tabla 5. Línea granulocito-neutrófilo: análisis de intensidad media de fluorescencia de complejidad interna y marcadores de linaje mieloide.**

Parámetro	Línea granulocítica total		Promielocito		Mielocito		Metamielocito		Neutrófilo		Valor de P
	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	
FSC	671±66	614-780	723±73	645-826	800±622	92-1538	659±71	600-764	642±69	574-754	NS
SSC	699±18	671-717	551±279	65-744	693±64	595-752	599±221	203-711	715±4	712-722	0.008 <sup>+</sup>
CD45	43±15	30-70	33±34	23-42	35±10	22-50	34±9	27-50	57±19	39-88	<0.05 <sup>*</sup>
CD13	18±8	10-32	59±17	35-78	8.6±2	6-12	5±0.9	4-6	26±17	15-58	<0.05 <sup>**</sup>
CD11b	1249±537	554-1957	28±8	15-40	32.4±9.3	17-41	592±715	8-1432	2094±712	999-2858	0.008 <sup>***</sup>
CD117	NE	NE	137±316	111-163	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NA

Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar (DS); NE: marcador fenotípico no evaluado en esta línea; NS: no estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ); FSC: *Forward scatter*, SSC: *side scatter*. <sup>+</sup> $p<0.05$  al comparar metamielocitos vs neutrófilos; <sup>\*</sup> $p<0.05$  al comparar neutrófilos vs las demás poblaciones celulares; <sup>\*\*</sup> $p<0.05$  al comparar promielocitos vs las demás poblaciones celulares; <sup>\*\*\*</sup> $p<0.05$  al comparar neutrófilos vs las demás poblaciones celulares.



Precursos linfoides: Bajo FSC/SSC, CD45+ débil, CD117-, HLA-DR+, CD34+, TdT+, MPO-

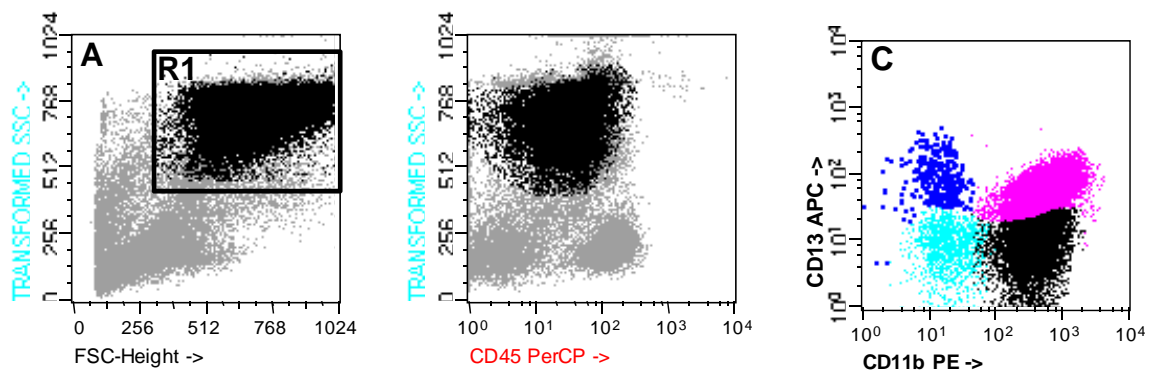
Precursos mieloides: FSC/SSC intermedio, CD45+ débil, CD117+, HLA-DR+, CD34+, TdT-, MPO-/

**Figura 2.** Análisis fenotípico de precursos hematopoyéticos CD34+ utilizando un marcaje con cuatro fluorescencias (Azul: representación de precursos linfoides; Negro: representación de precursos mieloides). Panel A: Análisis del tamaño (*side scatter* –SSC-) y la complejidad (*forward scatter* –FSC-). Panel B: Expresión de CD45. Panel C: Expresión de HLA-DR y CD117. Paneles D y E: Selección de los eventos CD34+ y posterior análisis de la expresión de MPO y TdT (Panel F).

**Tabla 6.** Línea granulocito-neutrófilo: análisis de intensidad media de fluorescencia de otros marcadores de linaje mioide.

Parámetro	Línea granulocítica total	
	Media ± DS	Rango
CD15	1401±369	873-1734
CD33	23±2	22-25
CD16	213±261	28-398
MPO	1424±1105	330-2527
CD64	44±12	29-57
CD71	255±196	43-481

Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar (DS).



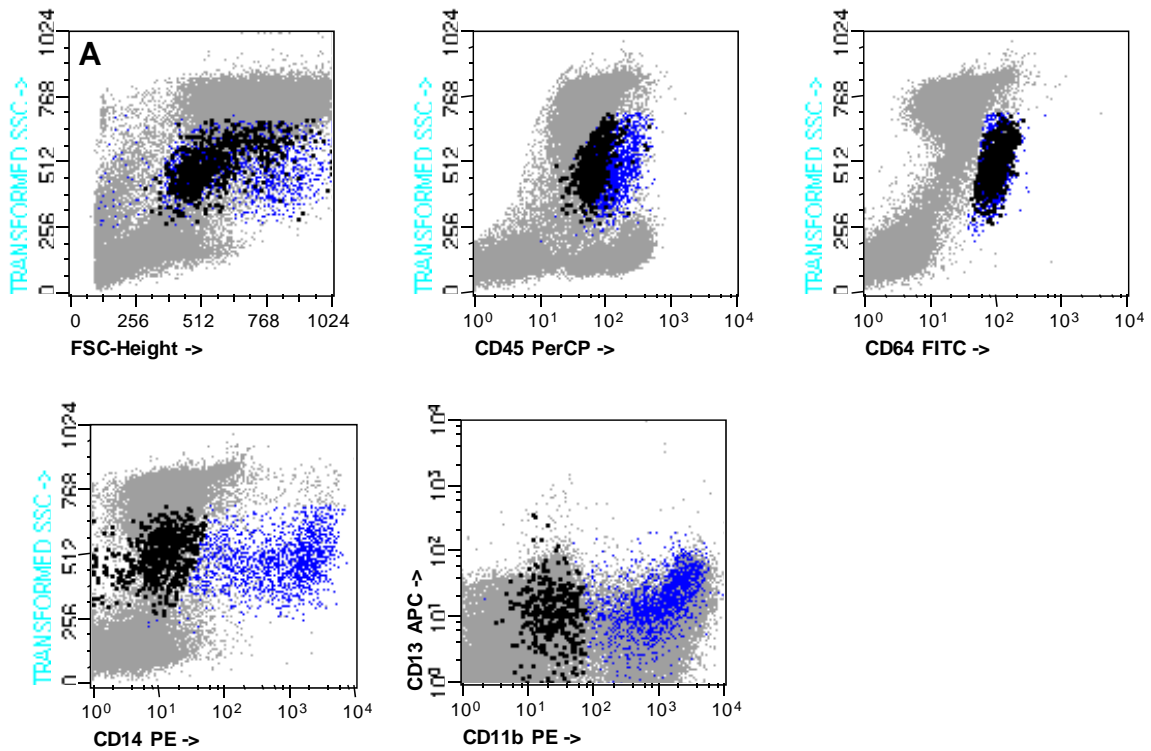
**Figura 3.** Análisis fenotípico de la línea granulocítica. Selección de la línea granulocítica por el tamaño (*side scatter* –SSC-) y la complejidad (*forward scatter* –FSC-) (Región R1, panel A). Posteriormente se realiza una segunda selección según la intensidad de fluorescencia para el marcador CD45 (Panel B). Las distintas subpoblaciones celulares se diferencian por su expresión de CD13 y CD11b: población de promielocitos CD13<sup>++</sup>/CD11b<sup>-</sup> (eventos azúles), población de mielocitos CD13<sup>-/+</sup>/CD11b<sup>-</sup> (eventos cian), población de metamielocitos CD13<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> (eventos negros) y población de neutrófilos CD13<sup>++</sup>/CD11b<sup>++</sup> (eventos violeta).

En la línea monocítica se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los marcadores CD45, CD13, CD11b, y CD14 en los monocitos respecto a promonocitos (tabla 7; figura 4). Por otra parte las células dendríticas derivadas del monocito muestran niveles elevados de expresión del antígeno CD45 respecto a los monocitos (tabla 7).

**Tabla 7: Linaje Monocítico: análisis de intensidad media de fluorescencia y marcadores de linaje monocítico**

Parámetro	Promonocito		Monocito		Célula dendrítica derivada del Monocito		Valor de P
	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	Media ± DS	Rango	
FSC	581±107	434-734	564±225	390-562	766±163	581-890	NS
SSC	528±82	398-609	470±92	327-562	493±32	465-513	NS
HLA-DR	NE	NE	557±427	138-1248	NE	NE	NA
CD45	46±27	18-82	131±40	87-180	514±206	369-751	0.008
CD14	12±4	9-19	1532±856	1021-1050	NE	NE	0.008
CD64	118±34	92-178	112±32	88-168	NE	NE	NA
CD11b	32±17	9-49	1234±776	119-1819	NE	NE	0.029
CD13	14±4	8-18	31±9	20-41	NE	NE	0.029
CD15	NE	NE	63±43	27-122	129±23	113-146	NA
MPO	NE	NE	338±282	42-406	NE	NE	NA
CD33	NE	NE	54±8	45-65	35±16	24-47	NA
CD123	NE	NE	58±40	27-126	NE	NE	NA
CD16	NE	NE	42±24	16-73	226±39	189-254	NS

Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar (DS); NA: no analizado; NE: marcador fenotípico no evaluado en esta línea NS: no estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ); FSC: *Forward scatter*, SSC: *side scatter*



**Figura 4.** Análisis de la línea monocítica según el tamaño (*side scatter* –SSC-) y la complejidad (*forward scatter* –FSC-) (panel A). Inmunofenotipo de promonocitos (CD45+ débil, CD64++, CD14-, CD13+, CD11b+ débil) y monocitos (CD45+, CD64++, CD14+, CD13+, CD11b+) (paneles B-E).

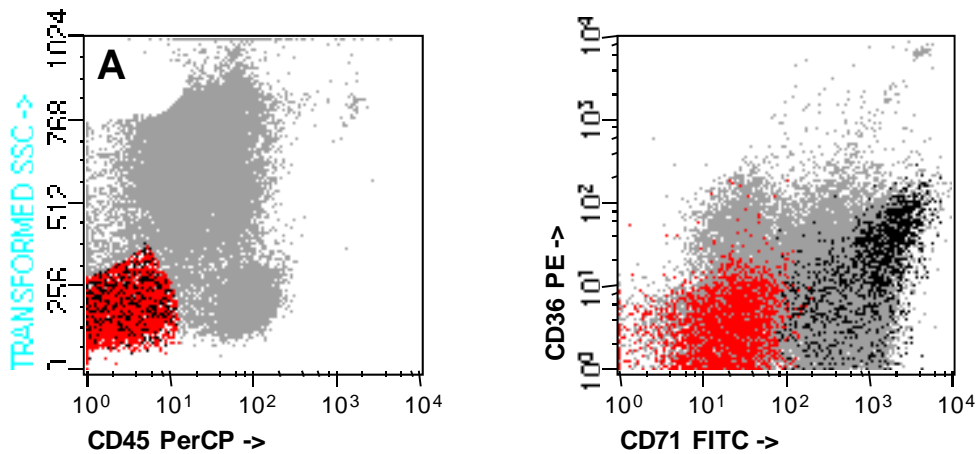
El análisis de los precursores eritroides mostró pérdida de expresión del marcador CD45, con expresión de CD36 (tabla 8). Además se identifican dos subgrupos fenotípicos en relación a la expresión de CD71, una proporción (aproximadamente el 40%) son CD71+ (corresponden según la literatura a proeritroblastos) (2) y el 60% restante son CD71+ débil correspondiendo a eritroblastos (2) (tabla 8; figura 5).

**Tabla 8.** Línea eritroide: análisis de intensidad media de fluorescencia de marcadores asociados a este linaje.

Serie Eritroide		
Parámetro	Media ± DS	Rango
FSC	224±75	180-357
SSC	162±36	120-200
CD45	4±3	2-10
CD71+	1249±1388	681-1640
CD71 débil	22±7	12-128
CD36	78±59	30-173

Resultados expresados como media ± 1 desviación estándar (DS)





**Figura 5.** Análisis inmunofenotípico de la serie eritroide. Proeritroblastos CD45-, CD71-/+, CD36+ (eventos de color rojo, paneles A-B) y eritroblastos CD45-, CD71+, CD36+ (eventos de color negro, paneles A-B).

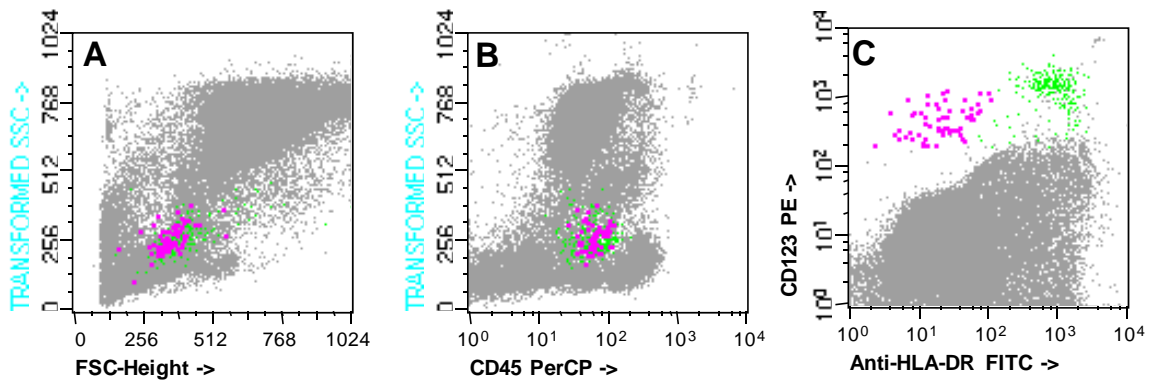
En la tabla 9 se muestra el análisis de intensidad media de fluorescencia de los marcadores HLA-DR, CD45 y CD123 en las células dendríticas plasmocitoides, donde se observan niveles elevados de expresión de HLA-DR y CD123 característicos de estas células (Figura 6) (6).

**Tabla 9.** Análisis de intensidad media de fluorescencia de marcadores fenotípicos en células dendríticas plasmocitoides.

Célula linfoplasmocitoide		
Parámetro	Media $\pm$ DS	Rango
FSC	420 $\pm$ 110	350-615
SSC	292 $\pm$ 38	248-331
HLA-DR	827 $\pm$ 291	530-1273
CD45	68 $\pm$ 36	29-110
CD123	1463 $\pm$ 293	1123-1911

Resultados expresados como media  $\pm$  1 desviación estándar (DS)

En la tabla 10 se representa el análisis de intensidad media de fluorescencia de marcadores fenotípicos en basófilos, los cuales se caracterizan por ser CD45+/CD13+/CD11b+/CD123+ (figura 6).



**Figura 6.** Análisis inmunofenotípico de basófilos (eventos de color violeta, paneles A-C): FSC/SSC bajo, CD45+, HLA-DR-, CD123+ y de células dendríticas plasmocitoides (eventos de color verde, paneles A-C): FSC/SSC bajo, CD45+, HLA-DR+, CD123+.

**Tabla 10.** Análisis de intensidad media de fluorescencia de marcadores fenotípicos en basófilos.

Parámetro	Basófilos	
	Media $\pm$ DS	Rango
FSC		
SSC	420 $\pm$ 110	350-615
CD45	827 $\pm$ 291	530-1273
CD123	68 $\pm$ 36	29-110
CD11b	438 $\pm$ 73	386-490
CD13	41 $\pm$ 34	17-65

Resultados expresados como media  $\pm$  1 desviación estándar (DS).

## **6.0.- Discusión**

Las leucemias agudas (LA) y los síndromes mielodisplásicos (SMD) son hemopatías malignas de características clínicas, biológicas y evolutivas muy heterogéneas (1, 2). Desde el punto de vista clínico-biológico, se ha avanzado notablemente en la identificación y caracterización molecular de estas enfermedades (3). En la actualidad, los criterios empleados para la clasificación diagnóstica de los pacientes con LA y SMD se fundamentan en gran medida en el análisis inmunofenotípico de las distintas subpoblaciones celulares presentes en el tejido afectado (principalmente médula ósea), estableciendo la línea celular, su estadio madurativo y las aberraciones fenotípicas presentes en las células neoplásicas (2, 3, 4). Por otra parte, el análisis inmunofenotípico de células normales de médula ósea mediante citometría de flujo multiparamétrica es una herramienta de gran utilidad para la identificación de los fenotipos aberrantes en células hematopoyéticas malignas con implicación directa en el pronóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad (9).

En el presente trabajo se describe el procesamiento técnico de las muestras de médula ósea, marcaje en cuatro fluorescencias distintas, lectura (adquisición en el citómetro de flujo), análisis de los ficheros de datos y los valores absolutos y relativos de las diferentes subpoblaciones celulares por medio de la adición de esferas para la realización de estos recuentos, en conjunto con los valores promedio y rangos de intensidad media de fluorescencia para cada uno de los marcadores fenotípicos evaluados en estas poblaciones.

Los diferentes paneles de reactivos (anticuerpos monoclonales y policlonales conjugados con diversos fluorocromos) y las distintas técnicas de marcaje de antígenos localizados a nivel de la membrana celular como de citoplasma empleadas en el análisis, han sido previamente seleccionados, titulados y estandarizados en la unidad de citometría para obtener una sensibilidad adecuada en el análisis del inmunofenotipo y caracterización de las diferentes subpoblaciones celulares de MO.

Diferentes estudios han establecido con gran precisión la secuencia de expresión de un amplio número de antígenos a lo largo de los distintos estadios madurativos de las células de linaje mielóide y linfóide. Así, se reconoce la presencia en MO de precursores hematopoyéticos CD34+ dentro de los que se encuentran estadios madurativos bien definidos como son los precursores linfoides y precursores mieloides (1-2). Los precursores linfoides B CD34+/CD19+ muestran además positividad nuclear para la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt), expresión débil de CD45 y CD22, expresión citoplasmática (cy) de CD79a y reactividad fuerte para CD10 y HLA-DR entre otros marcadores (2, 10-11). Por otra parte, los precursores que darán origen al linaje mielóide muestran expresión débil de CD45 pero en conjunto con los marcadores CD117, CD123, HLA-DR, CD38, CD71, CD13 con expresión parcial de CD15 y mieloperoxidasa (MPO) a nivel citoplasmático (2).

Cuando la célula CD34+ de origen mielóide inicia la maduración hacia la línea granulocítica, monocítica y eritroide, va perdiendo progresivamente la molécula CD34 en su superficie e incrementa los niveles de expresión de CD45, CD13, CD33, disminuyendo la reactividad para CD117 (2, 11) y a medida que estas células se comprometen hacia estos linajes van expresando de forma dinámica marcadores específicos de los mismos. Precisamente el incremento en los niveles de expresión de MPO se asocia con la maduración hacia neutrófilo, la adquisición de CD64 y/o CD14 se observa en la diferenciación hacia línea monocítica, y la pérdida de expresión de CD45, en conjunto

con la fuerte positividad para CD71 y la adquisición de glicoforina A y CD36 definen la maduración hacia el linaje eritroide (2, 11).

Se han descrito diferentes combinaciones de anticuerpos para evaluar la maduración hacia neutrófilo, incluyendo marcadores como CD11b y CD16 como CD13 y CD11b (1-2). En el presente trabajo la maduración desde promielocito hasta neutrófilo se evaluó empleando la combinación CD13/CD11b, donde los promielocitos son característicamente CD13<sup>++</sup>/CD11b<sup>-</sup>, los mielocitos CD13<sup>+</sup> débil/CD11b<sup>-</sup>, los metamielocitos CD13<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> y los neutrófilos CD13<sup>+</sup>/CD11b<sup>++</sup> (1-2). Otros marcadores expresados en esta línea desde el estadio de promielocito son MPO, CD15, CD33, y CD16 (2).

El linaje monocítico proviene del progenitor mielóide CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>, a medida que ocurre la diferenciación a promonocito y monocito se observan variaciones fenotípicas que incluyen aumento en la expresión de CD45, CD64 y CD33, bajos niveles de expresión de CD15 y adquisición del marcador CD14 en monocitos. Por otra parte, las células dendríticas derivadas de monocito expresan altos niveles de CD16 (2).

Las células de linaje eritroide se caracterizan fenotípicamente por la pérdida secuencial del marcador CD45, desde los proeritroblastos hasta el eritrocito maduro (2). Adicionalmente, durante la diferenciación a eritrocito estas células adquieren en su superficie el receptor de transferrina CD71 en conjunto con el CD235a (glicoforina A), hasta que el eritrocito maduro pierde el CD71 conservando el marcador CD235a (2).

Las células dendríticas (DCs) pueden diferenciarse a partir de un progenitor mielóide CD34<sup>+</sup> (la gran mayoría), o a partir de un precursor linfóide (DCs plasmocitoides). En la actualidad diferentes estudios han ampliado la información disponible en relación con las diferencias inmunofenotípicas entre las distintas subpoblaciones de DCs de MO estableciendo que las DCs mieloides son CD11c<sup>+++</sup>/CD33<sup>+++</sup>/CD16<sup>-</sup>/CD123<sup>+</sup>, las DCs derivadas del monocito son CD11c<sup>+</sup>/CD33<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>, mientras que las DCs plasmocitoides son CD11c<sup>+</sup>/CD33<sup>+/+</sup>/CD16<sup>-</sup>/CD123<sup>++</sup>. En conjunto estas células muestran expresión intensa de HLA-DR con positividad variable para marcadores mielomonocíticos, moléculas de adhesión (CD11a, CD18), receptores para complemento (CD21, CD35, CD23 y receptores de quemoquinas (CXCR4, CXCR3) entre otros (4, 6).

Los mastocitos corresponden a otra subpoblación celular derivada de precursores mieloides CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD13<sup>+</sup>, con una baja frecuencia reportada a nivel de MO normal (aproximadamente 0.02% ± 0.02% de la celularidad total; rango: 0.001%-0.09%) (12-14). Diferentes estudios han mostrado que los mastocitos expresan dos marcadores fenotípicos con alta intensidad: el antígeno CD117 y el receptor Fc de la IgE (FcεRI) (13). Sin embargo, estas moléculas no son específicas de este subgrupo celular, ya que el CD117 es positivo en progenitores mieloides de MO y en células de origen no hematopoyético (p.ej. melanocitos) y el FcεRI es positivo en basófilos (13). Otra molécula expresada es el CD45 con valores de intensidad de fluorescencia cercanos a los observados en el linaje neutrófilo (14). Otros marcadores positivos en estos reportes son CD71, CD44, CD13, CD11b, y CD40 entre otros (14). Aberraciones fenotípicas en los mastocitos son observadas con alta frecuencia en el caso de las mastocitosis sistémicas y las leucemias de mastocitos, en las que se observa ganancia de marcadores de linaje linfóide CD2 y CD25 (en más del 90% de los casos) en conjunto con CD117, por lo que constituyen marcadores muy útiles para diferenciar mastocitos normales de los mastocitos aberrantes en estas enfermedades (12).

Finalmente los basófilos, que constituyen una población de baja frecuencia ( $0.2\% \pm 0.2\%$  de la celularidad total), se pueden distinguir fenotípicamente por la expresión de CD123 en ausencia de HLA-DR, y expresión de otros marcadores de linaje mielóide como CD13 y CD11b, tal como lo observamos en nuestro estudio.

En este trabajo de grado se utilizaron 5 muestras de pacientes que fueron sometidos a reemplazo total de cadera y que cumplían con características específicas como la edad, tratamientos y que, se consideraba, tenían una médula ósea normal, al compararlos con resultados de otros estudios(2) donde se presentaban mayor cantidad de muestras las cuales cumplían con condiciones similares a este trabajo se encontró que los resultados de los valores absolutos y relativos en la diferenciación celular en pacientes normales en médula ósea son comparables y no presentan cambios significativos en los valores de la media y la desviación estándar obtenidas en este estudio. Los artículos relacionados con este trabajo de grado que ya han sido publicados con anterioridad en revistas como *clinical cytometry* y *Leukemia*. (4) han sido de gran importancia a nivel clínico e investigativo por dilucidar aun más el comportamiento fenotípico de la hematopoyesis en médula ósea.

#### **7.0.- Conclusión**

En el presente estudio, la determinación de los valores absolutos y relativos y los resultados del inmunofenotipaje empleando un panel de 18 anticuerpos en cuatro fluorescencias distintas, permitieron la identificación de forma inequívoca de las distintas poblaciones leucocitarias normales en MO incluyendo poblaciones que se encuentran en muy baja frecuencia (p.ej. mastocitos, basófilos, células dendríticas y células stem hematopoyéticas). Estos resultados podrán ser utilizados por la Unidad de Citometría del Hospital Universitario San Ignacio como parámetros de referencia para el análisis fenotípico de leucemias mieloides agudas y síndromes mielodisplásicos.

## 8.0.- Bibliografía

1. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Cytometry Part A*. 58A:62–71 (2004).
2. Van Lochem E., Van der Velden, V., Wind, H., Marvelde, J., Westerdaal N., Van Dongen J. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 604B:1–13 (2004).
3. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 111:3941-67 (2008).
4. Matarraz S., López A., Barrena S., Fernandez C., Jensen E., Flores J., et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 22(6):1175-83 (2008).
5. Kraan J, Gratama J, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, Quijano S, Stetler-Stevenson M, Subira D, and Wilson W. Flow Cytometric Immunophenotyping of Cerebrospinal Fluid. *Curr. Protoc. Cytom.* 45:6.25.1-.25.16 (2008).
6. Martín L, Almeida J, Hernández P, Sánchez ML, Lécresse Q, Orfao A. Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion* Epub ahead of print (2009).
7. Kantarjian,H.M., Walters,R.S., Smith,T.L., Keating,M.J., Barlogie,B., McCredie,K.B., & Freireich,E.J. Identification of risk groups for development of central nervous system leukemia in adults with acute lymphocytic leukemia. *Blood* 72, 1784-1789 (1988).
8. Pui CH, Robison L, Thomas A. Look Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 371: 1030–43 (2008).
9. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J, Barrena S, Lécresse Q, Van Dongen JJ, Orfao A. EuroFlow Consortium. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 73A(12):1141-50 (2008).

10. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martinez A, González M, et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 83(12):1069-75 (1998).
11. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia*. 13(3):419-27 (1999).
12. Escribano L, Garcia A, Nuñez R, Orfao A. Flow Cytometric Analysis of Normal and Neoplastic Mast Cells: Role in Diagnosis and Follow-Up of Mast Cell Disease. *Immunol Allergy Clin N Am* 26: 535–547 (2006).
13. Escribano L, Navalón R, Nuñez R, et al. Flow cytometry immunophenotypic analysis of human mast cells. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean P, et al, editors. *Current protocols in cytometry*. New York: John Wiley & Sons; p. 6.6.1–18 (2000).
14. Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples. Identification and enumeration. *Am J Pathol*. 149:1493–9 (1996).