

Resúmenes

Presentaciones orales

The EU (European Union) funded EuroFlow project: background, current achievements and future perspectives

J. van Dongen¹ and A. Orfao² for the EuroFlow Consortium¹

¹ Department of Immunology, Erasmus Medical Center, University of Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands

² Cytometry Service, Department of Medicine and Cancer Research Centre, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

Background: Immunophenotyping of haematological malignancies is one of the most extended and useful clinical applications of flow cytometry. In this regard, flow cytometry is currently used in establishing the diagnosis, the prognostic classification and the evaluation of effectiveness of treatment of most haematological malignancies, including both leukemias and lymphomas.

Over the past decade, several molecular techniques have brought new insights into the prognostic classification and monitoring of residual disease after therapy in many different clonal haematological disorders. However, molecular techniques have several major disadvantages. Among other, they are time consuming, they have a limited applicability and they provide information about samples, without focusing on cell populations within a sample, unless preceding purification steps are performed. These limitations can be overcome by innovations in flow cytometry immunophenotyping, because this technology uniquely fulfills the requirements for high speed, accurate focusing on the malignant cell population, at the same time it is broadly applicable at diagnosis and follow-up for the detection of surface bound, intracellular and even soluble proteins, as immunophenotyping targets with well-defined antibodies.

Based on this background, the EuroFlow Consortium defined several key objectives which mainly focused on:

- 1) the development of new antibodies for the detection of proteins (mainly intracellular oncoproteins) in tumour cells,
- 2) the application of novel immunobead technology for fast and easy detection of fusion proteins

resulting from chromosomal translocations for improved immunophenotypic classification of acute leukemias,

3) the development of new software tools for easy and reproducible data analysis,

4) the design and evaluation of 8-color antibody panels and instrument set-up procedures for the diagnosis, classification and monitoring of therapy in patients with different types of haematological diseases. Overall, 10 different groups from 8 public hospitals and/or universities and two small size biotech companies integrated initially the EuroFlow Consortium aimed at developing the pre-defined objectives.

Current achievements: Four years after the project has started, the EuroFlow Consortium has already reached major achievements. Accordingly, an increasingly high number of monoclonal antibodies have been generated directed against oncoproteins (e.g., c-myc, pax5, wt1) and proteins involved in chromosomal translocations (e.g., bcr, abl, pml, rara). In turn, several of these latter reagents have been combined for the development of immunobead assays aimed at the detection of the bcr-abl, pml-rara, aml1-eto, cbfbeta-myh11, tel-aml1, e2a.pbx1 and mll-af4 fusion proteins, the bcr-abl immunobead assay being commercially available since 2009.

As discussed in another presentation in this meeting 8-color flow cytometry antibody panels were also developed for the diagnostic screening and classification of most major groups of haematological malignancies including acute leukemias, chronic lymphoproliferative disorders, plasma cell neoplasms and most clonal myeloid malignancies. In order to facilitate and promote more easy and objective data analysis, new and innovative software tools have been developed and integrated into a complete software package (INFINICYT software). Through such combined panels and software tools easy evaluation of the overall immunophenotypic profile of a given cell population against reference data sets of multiple normal and pathological samples stained with the same (or partially overlapping) reagent

panels. Based on all these activities the EuroFlow Consortium has been recognized as one of the most active Working Groups within the European Haematology Association.

Future perspectives: Ongoing projects within the EuroFlow Consortium are now mainly focused on three different areas related to the immunophenotypic diagnosis, classification and monitoring of patients with haematological malignancies:

- 1) the construction of reference data bases for the 8-color EuroFlow leukemia/lymphoma diagnostic panels which have been recently developed,
- 2) the design of minimal residual disease tubes for monitoring the effectiveness of therapy, and
- 3) extending the detection of fusion proteins to the intracellular level, as a way to provide the possibility of using flow cytometry immunophenotyping for the molecular monitoring of residual disease after therapy. In order to be able to continue these tasks, mechanisms devoted to reach an economical sustainability of the EuroFlow Consortium had to be developed.

Cytometry at the leading edge of discovery

J. Paul Robinson

PhD, SVM Professor of Cytomics & Professor of Biomedical Engineering, Purdue University, USA

Cytometry has been a well defined technology for over 40 years and it might be considered a very mature technology. However, because of the untapped power of cytometry, there are many aspects of the field that are not advanced at all. For example, running a large number of samples and analyzing the data is something that the field struggles with. This area of high content, high throughput flow is an emerging area that is going to have a significant impact on how cytometry is used and how it will effect changes in the clinical and research laboratories. One result of this direction will be a totally new capability in data processing and data analysis. We can expect over the next 5 years, a minor revolution in how we analyze cytometry data. In the clinical domain, the physician does not want to receive data: they want to receive information that supports their decision making process for managing patient treatment. This demands that we reconsider how we analyze files, and more importantly how we present data for clinical review. We will focus

on providing probability data that a certain set of results has a certain probability of impacting the patient treatment. If we are going to provide data that might impact a medical treatment, we will have to translate this into a probability of importance or a probability value that means something with regard to the clinical syndrome of interest. This is totally different to our present day clinical analysis and requires much more sophisticated analytical tools. Advanced data processing where we provide true histogram analyses rather than set cursors on graphs at levels we “feel” are appropriate will not support predictive medicine needs. There are many new technologies that will have future impact – multispectral cytometry, microchip based technologies, high throughput systems, and very low cost systems. This presentation will discuss the future prospects of cytometry and how they will impact our field.

Caracterización fenotípica y funcional de las subpoblaciones de linfocitos B circulantes totales y específicos de rotavirus

Carlos F. Narváez^{1,2,3}, Manuel A. Franco³, Juana Ángel³, Harry B. Greenberg¹

¹ Department of Medicine, Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA, USA

² Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Programa de Medicina, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia

³ Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

cfnarvaez@usco.edu.co

Introducción. La caracterización de las diferentes poblaciones de linfocitos B de memoria es fundamental para el desarrollo y la evaluación de nuevas vacunas contra rotavirus. Se analizaron la frecuencia y la funcionalidad de los linfocitos B de memoria CD27+, IgA/G+ (memoria conmutada), y los linfocitos B de memoria CD27+, IgM+ (LBM IgM+) totales y específicos para rotavirus, usando citometría de flujo y la prueba de dilución límite.

Métodos. Los linfocitos B de memoria con memoria conmutada, los positivos para IgM y los vírgenes (como control), se purificaron por FACS a partir de linfocitos B circulantes. Las células se diluyeron, estimularon y cultivaron bajo varias condiciones. Se determinaron la inmunoglobulina total y la

específica para rotavirus mediante ELISA, para calcular la frecuencia de precursores de linfocitos B de memoria. Después del cultivo, la expresión de marcadores de diferenciación, la funcionalidad y el cambio de isotipo (para los linfocitos B de memoria IgM+) se midieron por citometría de flujo y ELISPOT.

Resultados y conclusiones. La estimulación con IL-2/6/10, CpG y células alimentadoras, generó el mayor número de células secretoras de anticuerpos diferenciadas a partir de linfocitos B de memoria. Bajo estas mismas condiciones de cultivo, los linfocitos B de memoria conmutada expresaron niveles más altos de marcadores de plasmoblastos que los linfocitos B de memoria IgM+, hecho que se asoció con una mayor eficiencia clonal en los cultivos.

Los resultados de la prueba de dilución límite (*limit dilution assay*, LDA) demostraron, además, que 15% a 40% de los linfocitos B de memoria IgM+ pueden diferenciarse a células secretoras de anticuerpos productoras de IgG, hecho que fue confirmado por citometría de flujo y ELISPOT. Cuando la eficiencia clonal y la conmutación de isotipo son tenidas en cuenta, se encuentra una correlación entre los linfocitos B de memoria específicos para rotavirus detectados por citometría de flujo y LDA. Se deben tener en cuenta las diferencias funcionales de los linfocitos B de memoria, para el desarrollo de vacunas.

Fenotipo y actividad funcional de los linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno en pacientes con enfermedad de Chagas

Paola Lasso¹, Diana Mesa¹, Adriana Cuéllar², Fanny Guzmán³, Natalia Bolaños⁴, Fernando Rosas⁵, Víctor Velasco⁵, María del Carmen Thomas⁶, Manuel Carlos López⁶, John Mario González⁴, Concepción Puerta¹

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

³ Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Universidad Católica de Valparaíso, Chile

⁴ Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Fundación Clínica Abood Shaio, Bogotá, D.C., Colombia

⁶ Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada, España

plasso@javeriana.edu.co

Introducción. La respuesta inmunitaria celular es crucial para el control de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Los estudios muestran que el péptido K1 derivado de la proteína KMP-11⁴⁻¹² del parásito, restringido a la molécula HLA-A*0201⁺, es capaz de inducir secreción de interferón gamma (IFN γ) por linfocitos T (LT) CD8⁺. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue determinar la frecuencia, el fenotipo y la actividad funcional de LT CD8⁺ específicos del péptido en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Métodos. Se tipificaron 50 pacientes con enfermedad de Chagas crónica para el alelo HLA-A2 mediante citometría de flujo y se seleccionaron 19 positivos para HLA-A2. Además, se determinó el subtipo del alelo A2 mediante SSP-PCR. Doce individuos sanos, con HLA-A*0201 positivo, se incluyeron como controles. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de cada individuo y se colorearon con los anticuerpos anti-CD3, CD8, CD62L, CCR7, perforina y tetrámero HLA-A2-K1. La producción de citocinas, como IL-2 e IFN γ , se hizo en células estimuladas con el péptido.

Resultados y conclusiones. De los 19 pacientes con enfermedad de Chagas, 15 presentaron LT CD8⁺ específicos para K1 con frecuencias entre 0,09% y 0,34%, sin diferencias estadísticamente significativas entre los estadios (sintomáticos y asintomáticos) y la gravedad (G1, G2, G3) de la enfermedad. Diez de estos respondedores presentaron el subtipo de HLA-A*0201 y cinco, los subtipos A*0205, A*0222, A*0226, A*0259 y A*0287. Por lo anterior, se compararon el fenotipo y la función de los LT CD8⁺ específicos de pacientes positivos y negativos para HLA-A*0201.

Los resultados mostraron que los LT CD8⁺ de ambos, tienen un fenotipo predominante de memoria efectora (CCR7⁻, CD62L⁻) y expresaron IL-2, IFN γ perforina, sin diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos demuestran que no existen diferencias en el fenotipo ni en la actividad funcional entre LT CD8⁺ específicos del péptido K1 de acuerdo con la molécula A2 que intervenga en su presentación; por lo tanto, el péptido K1 es un epítopo promiscuo presentado por el supertipo A2.

Determinación mediante citometría de flujo de la proliferación, activación e IFN γ intracelular en las células NK, NKT, TCD4 y TCD8 de pacientes con tuberculosis pulmonar y convivientes infectados

Victoria Niño¹, Luis Fernando García², Mauricio Rojas², Víctor Campo¹, Gloria Ávila¹, Julio Klinger¹, María Lilia Díaz¹

¹ Grupo de Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

² Grupo de Investigación Inmunogenética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

mdiaz@unicauca.edu.co

Introducción. El estudio de la respuesta inmunitaria de los linfocitos T CD4 y la cuantificación de IFN γ en sobrenadantes de cultivos celulares a antígenos de tuberculosis, ha generado aplicaciones en el diagnóstico de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. También, se sabe que los enfermos producen menos IFN γ que los infectados sanos; sin embargo, se requiere un biomarcador que diferencie los infectados latentes de los enfermos.

Objetivo. Caracterizar la respuesta de activación, proliferación y producción de IFN γ en NK (células asesinas naturales) y subpoblaciones de linfocitos T, en pacientes con tuberculosis pulmonar, en los convivientes con tuberculosis latente y PPD positiva, y en los no convivientes con PPD negativa.

Métodos. Las células mononucleares de sangre periférica de los individuos de cada grupo, se cultivaron con PPD, CFP10 o PHA, o sin estímulo. Por citometría de flujo se determinó el porcentaje de células asesinas naturales, NKT, linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8, células negativas para CFSE, o que expresaran CD69 o que produjeran IFN γ . Los datos de 15 individuos de cada grupo fueron comparados por ANOVA con el dato estadístico de Tahame.

Resultados y conclusiones. Se estableció por primera vez que los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen un aumento en el porcentaje de células asesinas naturales productoras de IFN γ que los diferencia en forma significativa de los convivientes con tuberculosis latente. Se confirmó una mejor respuesta en los linfocitos T CD4 y T CD8 de estos últimos que en los pacientes con tuberculosis pulmonar, aunque la diferencia no es significativa. Las células asesinas naturales se comportan en forma similar en estos últimos.

Linfocitos T CD8⁺/CD4⁺ dobles positivos en dengue: ¿un marcador de activación de los LTCD8⁺ en dengue grave?

Anilza Bonelo

Grupo VIREM, Virus Emergentes y Enfermedad, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Los resultados experimentales apoyan la hipótesis de que los linfocitos T CD8⁺ activados juegan un papel importante en la gravedad del dengue. El conocer si estas células contribuyen a la patología o a la protección es crucial para la prevención y el tratamiento de la enfermedad.

Para explorar si los niveles y el fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica se correlacionan con la gravedad de la infección, se analizaron por citometría de flujo los linfocitos T de los pacientes con dengue hemorrágico o dengue clásico.

No se encontró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje o en los marcadores de activación de los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes con dengue hemorrágico o dengue clásico. Sin embargo, una subpoblación de linfocitos T que expresan simultáneamente las moléculas CD4 y CD8 (linfocitos T doblemente positivos) estaba aumentada en la fase aguda del dengue y fue más frecuente en los pacientes con dengue hemorrágico que en los de dengue clásico (92% Vs. 54%; OR=9,8; IC 95% 1,81-96,9, p=0,02).

Los linfocitos T doblemente positivos se han encontrado en las infecciones virales crónicas y en muy bajos niveles en individuos sanos pero no en dengue ni en ninguna otra enfermedad viral aguda.

El análisis de los niveles de expresión de las moléculas CD4 y CD8 mostraron que estas células eran CD8^{alta}CD4^{baja}, lo que indica que son LT CD8⁺ que expresan nuevamente la molécula CD4 debido a su activación.

El posterior análisis de varios marcadores (CCR7, CD62L, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD28, CD1a), permitió determinar que los linfocitos T doblemente positivos eran linfocitos T maduros, diferenciados, activados y de memoria efectora. Un alto porcentaje de estas células secretan perforinas e IFN- γ comparadas con los LTCD8⁺, lo cual sugiere que los linfocitos T doblemente positivos podrían tener un papel antiviral.

La presencia de los linfocitos T doblemente positivos en los pacientes con dengue podría

deberse a la reactivación de infecciones virales persistentes como las causadas por virus de Epstein-Barr, citomegalovirus o herpes humano 6; sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre los pacientes con LTDP o sin ellos con respecto a la historia de infección previa con ninguno de los virus herpes analizados.

En conclusión, la presencia de los linfocitos T doblemente positivos puede ser un marcador de activación de los linfocitos T CD8⁺ en dengue hemorrágico y podrían estar contribuyendo a la patogénesis del dengue o tener un efecto antiviral.

Cytometry of apoptosis

Zbigniew Darzynkiewicz

Brander Cancer Research Institute, New York Medical College, Valhalla, N.Y.

z_darzynkiewicz@nymc.edu

Cytometry in studies of apoptosis is used to estimate the incidence of cell death in specific cell populations. Methods include the distinction between apoptosis and cell necrosis, and/or the study of cell death biology (necrobiology), for instance, the molecular and cellular mechanisms involved in regulation and execution of apoptosis or necrosis. In these applications, the capability of multiparameter (multivariate) analysis to correlate quantitatively different cell attributes (events) within the same cells is a particular value offered by the cytometry. This feature allows studying the correlation between these events on a cell by cell basis in large cell populations. Such studies reveal mechanisms of intracellular events and may be used to probe a temporal and cause-effect relationship between them.

The following major techniques and methodological approaches to analyze apoptosis will be reviewed:

1. DNA damage (induction of ds DNA breaks), the event initiating mitochondrial pathway of apoptosis, as detected by phosphorylation of histone H2AX and activation of ATM. This event can be correlated by multiparameter analysis with the collapse of mitochondrial potential and caspase activation.
2. Chromatin condensation assessed by the increased proclivity of DNA to denaturation;
3. Three methods of caspases activation:
 - a. Immunocytochemical detection of the activated (cleaved) caspase;

- b. Affinity labeling of caspase active enzymatic center with the fluorochrome-tagged inhibitors (FLICA);

- c. Immunocytochemical detection of cleaved poly(ADP)ribose polymerase (PARP).

4. Probing mitochondrial transmembrane potential. A combination of MitoTracker Red CMXRos and FLICA offers a possibility to directly correlate caspase activation with collapse of mitochondrial potential in the same cells.

5. Externalization of phosphatidylserine detected by fluorochrome-tagged annexin V binding combined with uptake of propidium iodide (PI) or 7-aminoactinomycin D (7-AAD);

6. Detection of DNA fragmentation by:
 - a. Analysis of cellular DNA content ("sub-G₁", cell population) and

- b. *In situ* presence of DNA strand breaks by labeling with fluorescent deoxynucleotides in the reaction catalyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL assay) (10).

7. Application of multicolor SYTO fluorochromes to detect cells undergoing apoptosis.

Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis will be discussed, and examples of application, discussed methods, and clinical material will be presented.

References

Darzynkiewicz Z, Huang X, Okafuji M, King MA. Cytometric methods to detect apoptosis. *Meth Cell Biol.* 2004;75:307-42.

Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, *et al.* Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods.* 2008;44:262-72.

Estudio de la actividad leishmanicida e inmunomoduladora de extractos y compuestos de origen vegetal (especies colombianas)

Gabriela Delgado¹, Diana Granados¹, Luis Enrique Cuca³, Carlos Coy³, Diana Lorena Muñoz⁴, Sara Robledo⁴

¹ Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

lgdelgadam@unal.edu.co

Introducción. La leishmaniasis es una enfermedad considerada un problema de salud pública, endémica en gran parte del territorio colombiano, cuyo tratamiento actual presenta dificultades tales como resistencia de los parásitos, efectos secundarios y alto costo. Por tal razón, es importante realizar estudios en busca de alternativas terapéuticas que, con igual o mayor eficacia, resulten más seguras y, probablemente, más económicas.

Basados en la medicina tradicional y teniendo en cuenta la poca información obtenida sobre la actividad biológica, se estudió la capacidad leishmanicida e inmunomoduladora de especies de plantas colombianas pertenecientes a las familias Rutaceae, Annonaceae, Lauraceae, Piperaceae, Moraceae, Solanaceae y Myristicaceae.

Objetivo. Evaluar la actividad leishmanicida e inmunomoduladora de 40 extractos, 20 aceites esenciales y 57 compuestos puros de las siguientes especies de plantas: *Esenbeckia alata*, *Raputia heptaphylla*, *Xilopia discreta*, *Piper hispidum*, *Zanthoxylum guinduense*, *Ocotea macrophylla* y *Nectandra* sp.

Materiales y métodos. La extracción y caracterización de cada uno de los compuestos se hicieron bajo metodologías estandarizadas por el Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales. Las concentraciones letales y las efectivas, para la obtención del índice de selectividad ($IS = CL_{50}/CE_{50}$), se determinaron mediante la técnica espectrofluorométrica de resazurina y por citometría de flujo, respectivamente. El método de *Cytometric Bead Array* permitió establecer el perfil de citocinas inducido diferencialmente por aquellos compuestos que resultaron promisorios.

Resultados. De todos los extractos, compuestos puros y aceites esenciales analizados, un nuevo limonoide (11 β , 19 α , dihidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-changin) aislado de hojas de *Raputia heptaphylla* Pittier, resultó ser uno de los más específicos en su potencial leishmanicida ($IS \geq 20$) y, además, favorece el desarrollo de una respuesta reguladora, manifiesta en la secreción de IL-12 e IL-10 por parte de macrófagos infectados y tratados con el compuesto.

Estas dos condiciones resultan favorables para el propósito de nuestra investigación: terapias

profilácticas que controlen el patógeno y que, simultáneamente, promuevan un entorno inmunológico que despierte una memoria adecuada y de preferencia prolongada.

Al margen de la actividad biológica, ponemos en discusión la utilidad de los estudios bioguiados, toda vez que el extracto de donde proviene el nuevo limonoide caracterizado no mostró actividad alguna en los modelos empleados para la búsqueda de actividad biológica.

Conclusiones. Los compuestos provenientes de plantas colombianas, en particular de *Raputia heptaphylla* Pittier, se convierten en promisorios prototipos terapéuticos para el control de la leishmaniasis cutánea en nuestro país.

Modulación de las funciones de las células dendríticas por *Leishmania (Viannia) panamensis*

María M. Zorro, Katherine Gilchrist, Carmen E. Bernal, José R. Ramírez-Pineda

Grupo Inmunomodulación (GIM), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

ramirezpineda@yahoo.com

Introducción. Las células dendríticas juegan un papel crucial en la respuesta inmunitaria a las infecciones.

Objetivo. Estudiar la interacción de las células dendríticas con *Leishmania panamensis*, principal agente causal de la leishmaniasis en Colombia.

Métodos. Se produjeron células dendríticas y se expusieron a la infección con *L. panamensis*. Se determinaron la expresión de moléculas de superficie celular (CD86, CD40 y MHC clase II) por citometría de flujo, la secreción de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-10 y FNT- α) por ELISA y la estimulación de los linfocitos T CD4+ vírgenes.

Resultados y conclusiones. Las células dendríticas expuestas a la infección expresaron levemente más CD86 y CD40, y secretaron IL-6. Sin embargo, por citometría de flujo fue evidente que las células dendríticas que maduraban eran las espectadoras y que las infectadas permanecían inmaduras. Se observó, además, que la expresión de CD86 y CD40 inducida por el lipolisacárido de las células dendríticas estaba seriamente comprometida cuando las células estaban infectadas. Mientras las células dendríticas CFSE⁺ permanecían inmaduras

(CD40^{-/bajo} CD86^{-/bajo}), las espectadoras respondían eficientemente al lipolisacárido (CD40^{alto} CD86^{alto}). La infección, también, inhibió la secreción de IL-12p70, mientras que estimuló la de IL-10 inducidas por el lipolisacárido.

Los ensayos de presentación demostraron que la infección influye negativamente la secreción de IFN γ por las células T CD4+. Los ensayos *in vivo* demostraron que en ratones BALB/c, *Leishmania major* es virulenta mientras que *L. panamensis* es avirulenta. *In vitro*, *L. major* mostró un efecto cualitativa y cuantitativamente más inhibitorio que *L. panamensis* en células dendríticas, lo cual sugiere una relación entre virulencia y efecto inhibitorio en este compartimiento celular.

Los resultados revelan el poder inhibitorio de *L. panamensis* sobre las células dendríticas y la relación de esta propiedad con la virulencia en estos patógenos.

Caracterización de poblaciones celulares en la urticaria papular por picadura de pulga

Omar Domínguez¹, Elizabeth García², Silvia Duarte³, Evelyne Halpert², María Claudia Ortega¹, John Mario González⁴, Adriana Rodríguez³, Adriana Cuéllar¹

¹ Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Alergia y Dermatología, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Alergia y Dermatología, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

odominguez@javeriana.edu.co

Introducción. La urticaria papular es una enfermedad alérgica crónica que se manifiesta en los primeros años de vida, cuyo cuadro clínico mejora alrededor de los siete años de edad, y representa un modelo natural de adquisición de tolerancia.

En este trabajo se realizó la caracterización de poblaciones celulares, como las células dendríticas y T reguladoras naturales; además, la respuesta específica a antígenos de pulga de linfocitos T CD4+ con presencia del marcador de migración a la piel CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*), en pacientes con urticaria papular por

picadura de pulga, divididos de acuerdo con el tiempo de evolución de la enfermedad.

Métodos. Se incluyeron 20 pacientes con diagnóstico clínico de urticaria papular, distribuidos por el tiempo de evolución de la enfermedad (10 menos de 5 años y 10 más de 5 años), y 10 controles sanos en el mismo rango de edad. Las poblaciones celulares se caracterizaron por citometría de flujo y se utilizó extracto completo de cuerpo de pulgas para la estimulación específica. Las comparaciones se hicieron utilizando la prueba U Mann-Whitney, con un nivel de significancia de 0,05.

Resultados y conclusiones. Los resultados muestran que todos los pacientes tenían una menor cantidad de células dendríticas totales y mayor proporción de linfocitos T CD4+ CLA+ y células T efectoras CD4+ que secretan IL-10, IL-17, IL-4 e IFN γ , al compararlos con los controles sanos. En el análisis por tiempos de evolución se encontró que en las células CLA+ hay mayor proporción de células productoras de IL-4 e IL-17 y menor proporción de células CLA- productoras de IL-10, en los pacientes de menos de 5 años de evolución comparados con los de más de 5 años de evolución de la enfermedad, contrario a lo observado para IFN γ .

Estos resultados muestran que hay un predominio de células efectoras que migran a la piel a menor tiempo de evolución de la enfermedad, aunque de forma interesante aumenta la proporción de linfocitos con potencial regulador (productores de IL-10) a mayor tiempo de evolución de la enfermedad en poblaciones CLA-, lo que sugiere un mecanismo de control sistémico que podría contribuir a la adquisición de tolerancia a los antígenos de pulga.

New applications of flow cytometry in the diagnosis B-cell chronic lymphoproliferative disorders

A. Orfao, W. Nieto, A. López, S. Barrena, J. Flores, S. Quijano, C. Fernández, J. Ciudad, A. Rasillo, J. Almeida
Cytometry Service, Department of Medicine and Cancer Research Centre, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Flow cytometry has now been used for many years in the diagnosis and characterisation of haematological malignancies. Despite the fact that flow cytometry can distinguish between normal and

leukemic cells based on the presence on the latter of aberrant phenotypic characteristics, in most occasions, flow cytometry immunophenotyping techniques are used only once diagnosis of an haematological disease has already been established by morphology.

Expansions of mature-appearing lymphocytes are frequently detected in either peripheral blood or lymphoid tissues in a routine blood analysis or during physical examination. Additionally, expansions of mature-appearing lymphoid cells can also be detected in the cerebrospinal fluid, the skin and other tissues or body fluids. A major goal of the study of those expansions of mature lymphocytes in both peripheral and central lymphoid tissues is to establish (or rule out) the clonal nature of the expanded cell population.

For decades now, flow cytometry immunophenotyping techniques have proven to be of great utility for the diagnostic screening of B cell vs T/ NK cell clonality. Accordingly, the screening (and frequently also the diagnosis) of B cell clonality has been based for many years on the existence of an excess of either immunoglobulin (Ig) kappa+ or Ig-lambda+ B cells as detected by flow cytometry; in contrast, molecular techniques have been restricted to confirmation of clonality in a relatively restricted number of cases.

Recent advances in the knowledge of the phenotypic differences existing between normal and leukemic mature B lymphocytes, together with the availability of multicolor flow cytometers and large panels of high quality, fluorochrome conjugated monoclonal antibodies directed against an increasingly high number of unique cell surface and intracellular markers, have changed the way B cell clonality can be performed; as a consequence, flow cytometry immunophenotyping based on the identification of presence of phenotypically aberrant B cells has become increasingly used to replace the more traditional clonal kappa/lambda ratio excess in the primary diagnostic screening of B cell clonality; at the same it had opened the possibility of using flow cytometry immunophenotyping for the investigation of minimal residual disease in B-cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD) with high sensitivity.

Among others, such major advances include the possibility of performing highly efficient (sensitive and specific) rapid and cost-effective flow cytometry studies for the identification of the lineage of the expanded lymphocytes. Such screening

in peripheral blood and lymphoid tissues can currently be done in a single tube combining five (CD3, CD4, CD8, CD56 and CD19), seven (CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, sIgkappa and sIglambda) or up to 12 (CD3, CD4, CD5, CD8, CD38, CD56, CD45, CD19, CD20, TCRgamma/delta, sIgkappa and sIglambda) different antibodies in 3-, 4- and 8-color flow cytometry, respectively. These approaches typically provide a sensitivity and specificity of >95% as compared to conventionally used algorithms for the diagnosis of clonality, results being obtained in a few minutes. Once B or T cell clonality are suspected, the identification of the presence of cells carrying aberrant phenotypic features, which are present in virtually all chronic lymphoproliferative disorders, that show restricted usage of an Ig light chain, constitute unequivocal signs of B cell clonality.

In addition, flow cytometry immunophenotyping has also been extensively used also for the phenotypic characterization of different subtypes of chronic lymphoproliferative disorders. Accordingly, unique phenotypes have been associated with the most frequent B-cell disorders such as B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) (sIg^{dim}, CD20^{dim}, CD22^{dim}, CD79b^{dim}, FMC7-, CD5+, CD23+, CD200++), hairy cell leukaemia (CD103+, CD11c+, CD25+, LAIR1++), splenic marginal zone lymphoma (CD25-, CD11c+), mantle cell lymphoma (CD5+, CD23-, CD43+, CD200-/low) follicular lymphoma (bcl2^{high}, CD10+, CD38+) Burkitt lymphoma (bcl2-/low, CD10+, CD38^{high}) and Waldenström macroglobulinemia (CD25+, FMC7-/+, CD22^{dim}, CD5-, CD23- in the presence of clonal plasma cells), among others.

As a result, flow cytometry immunophenotyping has become essential for the diagnostic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders. At the same time, extensive characterization of neoplastic B cell phenotypes has shown the presence of aberrant patterns of protein expression in virtually every case, leading to the possibility of using flow cytometry for monitoring residual disease in these patients, after therapy. Although, few minimal residual disease studies have been reported in other disease conditions, in B-CLL and HCL, they have proven the high sensitivity (between 10⁻⁴ and 10⁻⁵) and specificity of the method and its clinical utility.

At the same time, the increased knowledge about the phenotypic aberrations present in neoplastic cells from patients with chronic lymphoproliferative disorders has also facilitated the identification of

an increasingly high number of cases carrying two or more different, unrelated neoplastic cell clones, its frequency among B-chronic lymphoproliferative disorders, being close to 5% of all cases.

More recently, new strategies have been built for the evaluation of the immunophenotypic features of neoplastic vs. normal cells based on the application of multivariate statistical analyses to flow cytometric data.

Based on such strategies, pattern-guided immunophenotypic classification of B-CLPD is now possible, which will certainly contribute to an improved standardization and higher reproducibility of flow cytometric analyses in this field. Similarly, these approaches provide a more objective evaluation of the performance of antibody reagent panels, which also facilitates improved immunophenotyping.

References

- Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M, et al.** CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathologic, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica*. 2009, on line publication (doi: 10.3324/haematol.2009.011049)
- Böttcher S, Ritgen M, Buske S, Gesk S, Klapper W, Hoster E, et al.** Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica*. 2008;93:551-9.
- Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, et al.** Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia*. 2009;23:2007-17.
- Braylan RC.** Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A*. 2004;58:57-61.
- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH.** Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*. 2001;46:23-7.
- Brunetti L, Di Noto R, Abate G, Gorrese M, Gravetti A, Raia M, et al.** CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells. *Br J Haematol*. 2009;145:665-7.
- Greig B, Oldaker T, Warzynski M, Wood B.** 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: recommendations for training and education to perform clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72(Suppl.1):S23-33.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al.** World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999;17:3835-49.
- Kaleem Z.** Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:1850-8.
- Matutes E.** Immunophenotype of the chronic lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1998;83(Suppl.):93-198.
- Matutes E.** New additions to antibody panels in the characterization of chronic lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol*. 2002;55:180-3.
- Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, et al.** Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008; 22:487-95.
- Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D.** Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:367-84.
- Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Shanafelt TD, Hoyer JD, Remstein ED, et al.** Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clin Proc*. 2008;83: 776-85.
- Mourad WA, Tulbah A, Shoukri M, Al Dayel F, Akhtar M, Ali MA, et al.** Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine-needle aspiration: cytomorphologic and immunophenotypic approach. *Diagn Cytopathol*. 2003;28:191-5.
- Menendez P, Vargas A, Bueno C, Barrena S, Almeida J, De Santiago M, et al.** Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia*. 2004;18:491-8.
- Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al.** Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009;114: 33-7.
- Orfao A, Almeida J, Sanchez ML, San Miguel JF.** Immunophenotypic diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leukemia. En: Faguet GB, editor. *Chronic lymphocytic leukemia: molecular genetics, biology diagnosis and management*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2004. p. 173-90.
- Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, van Dongen JJ, Orfao A,** Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A*. 2008;73A:834-46.
- Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J, et al.** A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 2008;73A:1141-50.
- Quijano S, López A, Rasillo A, Barrena S, Luz Sánchez M, Flores J, et al.** Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic

lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood*. 2008;111:5130-41.

Ravandi F, O'Brien S. Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2005;80:1660-74.

Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21:956-64.

Rossmann ED, Lundin J, Lenkei R, Mellstedt H, Osterborg A. Variability in B-cell antigen expression: implications for the treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies. *Hematol J*. 2001;2:300-6.

Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Latin American Consensus Conference. Report on the Second Latin American Consensus Conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70:39-44.

Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002;16:1460-9.

Stetler-Stevenson M. H43-A2 clinical flow cytometric analysis of neoplastic hematolymphoid cells; approved guideline. Second edition. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

Wells DA, Hall MC, Shulman HM, Loken MR. Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. *Leukemia*. 1998;12:2015-23.

Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72(Suppl.1):S14-22.

diagnóstico por imagen y la citología convencional del líquido cefalorraquídeo que se ha constituido en el método de referencia para el diagnóstico de enfermedad meníngea en estos pacientes (1).

Aunque se sabe que se trata de una técnica con gran especificidad, la citología convencional tiene una sensibilidad limitada y se estima que puede proporcionar hasta 20% a 60% de falsos negativos (2,3); además, con frecuencia, los resultados de los estudios citológicos son de difícil interpretación, al no permitir distinguir claramente entre linfocitos normales/reactivos y neoplásicos (2,4,5). Hoy se reconoce que el diagnóstico precoz de la enfermedad meníngea podría contribuir a mejorar notablemente la evolución de los pacientes con riesgo de recaída en el sistema nervioso central, ya que podrían beneficiarse de una terapia dirigida de forma específica a la enfermedad meníngea (6).

Ante esta situación, en los últimos años se ha investigado la posible utilidad de técnicas diagnósticas complementarias en la identificación de la infiltración del líquido cefalorraquídeo por células neoplásicas (2,7). Inicialmente, se había sugerido que, entre estas técnicas, los estudios genéticos y moleculares podrían ser de mayor utilidad que la citometría de flujo, dada el escaso número de células y la viabilidad de este tipo de muestras (8,9). No obstante, trabajos más recientes sugieren que los análisis inmunofenotípicos por citometría de flujo que emplean estrategias multiparamétricas, constituyen una alternativa atractiva a las técnicas antes referidas.

Así, diferentes grupos (2,3,7,10) han demostrado recientemente y de forma independiente que, en pacientes con linfoma no Hodgkin B y en otras neoplasias hematológicas, que en común presentan alto riesgo de recaída en el sistema nervioso central, la citometría de flujo presenta una mayor sensibilidad respecto a las técnicas citológicas a la hora de detectar enfermedad meníngea en el líquido cefalorraquídeo. Además, en el caso de linfomas no Hodgkin B agresivos, se ha descrito (10) que el punto de corte entre los casos en los que la citología convencional resulta positiva o sugerente de infiltración y aquéllos en los que es negativa, se situaría en una infiltración por células B neoplásicas superior a 20% del número global de células o de una o más células B neoplásicas por μl , lo cual apoya la utilización de la citometría de flujo como técnica de elección para el estudio de infiltración neoplásica en muestras con escaso número de células (2,3,7,11).

Utilidad del análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo mediante citometría de flujo multiparamétrica en pacientes con neoplasias hematopoyéticas

Sandra Quijano¹ Alberto Orfao²

¹ Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, España

El diagnóstico de enfermedad leptomeníngea en diferentes neoplasias de origen hematopoyético se ha realizado durante años teniendo en cuenta diferentes criterios, que incluyen las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad, las técnicas de

En relación con la evaluación del significado clínico de la presencia de infiltración de líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (2,10), se ha demostrado que la mayor sensibilidad para detectar enfermedad leptomenígea oculta mediante esta técnica se acompaña, además, de una mayor incidencia de recaídas en el sistema nervioso central y de síntomas neurológicos en los pacientes con citología convencional negativa y citometría de flujo positiva, respecto a los pacientes con citología convencional negativa y citometría de flujo negativa, lo que apoyaría la utilidad clínica de la demostración de infiltración menígea por citometría de flujo en pacientes aparentemente libres de enfermedad mediante citología convencional.

En relación con el manejo técnico en el laboratorio de la citometría de muestras de líquido cefalorraquídeo, distintos estudios han demostrado que las muestras habitualmente se caracterizan por presentar escasa número de células y que su viabilidad decae rápidamente a no ser que se proceda a su preservación o fijación (3,12-15).

Por este motivo, en el servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca, se estandarizó un protocolo que optimiza el almacenamiento, transporte, preparación y marcación de las muestras de líquido cefalorraquídeo mediante el empleo de una solución estabilizadora con un efecto de dilución conocido (Transfix^R), que previene la pérdida celular debida a los efectos citotóxicos *in vitro* del líquido cefalorraquídeo sobre los leucocitos, manteniéndose la eficacia de la estabilización por periodos superiores a las 24 a 48 horas de su obtención (10,16,17).

En cuanto a la preparación y marcación de las muestras de líquido cefalorraquídeo, este grupo recomienda la aplicación sistemática de protocolos estandarizados de citometría de flujo, empleando combinaciones de un elevado número de anticuerpos para incrementar de forma significativa la sensibilidad de los análisis (10,17,18).

De forma más reciente, el grupo europeo EuroFlow ha propuesto una combinación múltiple de anticuerpos en ocho fluorescencias (www.euroflow.org) que podría aplicarse no sólo a muestras de líquido cefalorraquídeo, sino también a otros líquidos corporales con escaso número de células, como el humor vítreo (*small simple screening tube* o SST). Además, resulta de gran utilidad adicionar a las muestras de líquido cefalorraquídeo esferas fluorescentes a concentración conocida, después

de realizar los protocolos de marcación, con el fin de cuantificar en términos absolutos la distribución de las distintas subpoblaciones celulares presentes en el mismo (10,6).

Referencias

1. **van Acker JT, Delanghe JR, Langlois MR, Taes YE, De Buyzere ML, Verstraete AG.** Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 2001;47:556-60.
2. **Hegde U, Filie AC, Little R, Janik J, Grant N, Steinberg SM, et al.** High incidence of occult leptomenigeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry *versus* cytology. *Blood.* 2005;105:496-502.
3. **Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernández J, Jiménez-Garofano C, Jiménez A, et al.** Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:952-8.
4. **DeAngelis LM, Cairncross JG.** A better way to find tumor in the CSF? *Neurology.* 2002;58:339-40.
5. **Windhagen A, Maniak S, Heidenreich F.** Analysis of cerebrospinal fluid cells by flow cytometry and immunocytochemistry in inflammatory central nervous system diseases: comparison of low- and high-density cell surface antigen expression. *Diagn Cytopathol.* 1999;21:313-8.
6. **Hollender A, Kvaloy S, Nome O, Skovlund E, Lote K, Holte H.** Central nervous system involvement following diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma: a risk model. *Ann Oncol.* 2002;13:1099-7.
7. **Bromberg JE, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der HB, Smitt PS, et al.** CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology.* 2007;68:1674-9.
8. **Recht L, Mrugala M.** Neurologic complications of hematologic neoplasms. *Neurol Clin.* 2003;21:87-105.
9. **Gleissner B, Siehl J, Korfel A, Reinhardt R, Thiel E.** CSF evaluation in primary CNS lymphoma patients by PCR of the CDR III IgH genes. *Neurology.* 2002;58:390-6.
10. **Quijano S, López A, Manuel SJ, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al.** Identification of leptomenigeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol.* 2009;27:1462-9.
11. **Schinstine M, Filie AC, Wilson W, Stetler-Stevenson M, Abati A.** Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. *Cancer.* 2006;108:157-62.
12. **Moriarty AT, Wiersema L, Snyder W, Kotylo PK, McCloskey DW.** Immunophenotyping of cytologic specimens by flow cytometry. *Diagn Cytopathol.* 1993;9:252-8.
13. **Matsui M, Mori KJ, Saida T, Akiguchi I, Kameyama M.** The imbalance in CSF T cell subsets in active multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1988;77:202-9.
14. **Salonen R, Ilonen J, Jagerroos H, Syrjala H, Nurmi T, Reunanen M.** Lymphocyte subsets in the cerebrospinal fluid in active multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1989;25:500-2.

15. **Dux R, Kindler-Rohrborn A, Annas M, Faustmann P, Lennartz K, Zimmermann CW.** A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci.* 1994;121:74-8.
16. **Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, et al.** Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Curr Protoc Cytom.* 2008;Chapter 6: Unit.
17. **Canonico B, Zamai L, Burattini S, Granger V, Mannello F, Gobbi P, et al.** Evaluation of leukocyte stabilization in TransFix-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. *J Immunol Methods.* 2004;295:67-78.
18. **Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH.** Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry.* 2001;46:23-7.

Medición de la actividad NADPH oxidasa en pacientes con infección por VIH-1 en diferentes estadios de la enfermedad

Jairo Muñoz, Sandra Milena Quijano, Carlos Álvarez, Susana Fiorentino

Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana y Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia
jairo.munoz@javeriana.edu.co

Introducción. La progresión de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) suele estar acompañada de infecciones oportunistas, que podrían estar relacionadas con elementos de la inmunidad innata. En el presente estudio, se evaluó la actividad de la NADPH oxidasa en neutrófilos y monocitos de sangre periférica de pacientes positivos para VIH en distintos estadios clínicos de la enfermedad, y en comparación con controles sanos.

Métodos. Se evaluó el estallido respiratorio sobre células de sangre periférica, estimuladas con PMA (1 µg/ml) y marcadas con dihidrorodamina 123. La reducción del colorante se analizó por citometría de flujo y se calcularon los valores de la intensidad media de fluorescencia de neutrófilos y monocitos, de individuos en estadio 1, 2 y 3 de la enfermedad. Los valores se compararon con los de controles sanos (n=50).

Resultados y conclusiones. Con respecto a los controles sanos, los pacientes en estadio 1 (n=36) presentaban aumento significativo de la actividad de la enzima (p=0,001); en aquéllos en estadio 2, la intensidad media de fluorescencia era normal, y los pacientes en estadio 3 mostraron reducción

de la misma (n=32; p=0,165 y n=12; p=0,002, respectivamente), relacionada con la carga viral, presencia de infecciones oportunistas y recuento de CD4. En los controles se observó que la intensidad media de fluorescencia para neutrófilos y monocitos de mujeres era superior en comparación con la de los hombres (p=0,01).

La regulación positiva o negativa de la enzima se ha relacionado con las proteínas virales Nef o Tat solubles que favorecen la alteración de su actividad y la aparición de patógenos extracelulares o de aquéllos que requieren de la respuesta de linfocitos T CD8 activados por presentación cruzada.

Avances en la investigación básica y clínica en células madre hematopoyéticas en la Pontificia Universidad Javeriana

Viviana Marcela Rodríguez

Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

La línea de investigación "Biología de las células madre" de la Pontificia Universidad Javeriana tiene una trayectoria de siete años. Inicialmente, se realizaron trabajos que buscaban determinar la frecuencia de diferentes subpoblaciones de células CD34+, con base en la coexpresión de antígenos HLA-DR y CD38, en 80 muestras recolectadas de sangre de cordón umbilical, en la Unidad de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario San Ignacio. La finalidad era conocer la proporción de las células hematopoyéticas más primitivas (CD34+, HLA-DR-, CD38-) y establecer protocolos de aislamiento y cultivo.

Debido al reducido porcentaje de la población CD34+, HLA-DR-, CD38- determinado en sangre de cordón umbilical (0,0153% a 0,0234%) (1), se iniciaron protocolos de aislamiento y cultivo con poblaciones enriquecidas de células CD34+ que, posteriormente, se optimizaron hasta lograr en la actualidad cultivos con una alta pureza (CD34+>90%).

Una vez establecido el protocolo de cultivo de progenitores hematopoyéticos aislados de sangre de cordón umbilical, se inició el establecimiento de otra población de células madre: las células mesenquimatosas. Este segundo grupo celular es determinante en la regulación de los procesos de autorrenovación, proliferación y diferenciación

de células madre hematopoyéticas en el modelo conocido como “nicho” medular.

Con el objetivo de comprender la regulación de las células madre mesenquimatosas sobre la funcionalidad de las células CD34+, establecimos el sistema de aislamiento y caracterización biológica para dichas células sugerido por la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (2), comparando poblaciones mesenquimatosas obtenidas de sangre de cordón umbilical y médula ósea normal, con una eficiencia de aislamiento de 30% y 95%, respectivamente (dato sin publicarse).

A partir de las células madre mesenquimatosas aisladas de médula ósea, se determinó el inmunofenotipo sugerido por la ISCT: CD34-, CD45-, CD73+, CD105+, CD44+, CD13+, CD90+, HLA-I+ o HLA-DR⁺, y se realizaron los ensayos funcionales de caracterización: diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica. En el año 2008, en colaboración con el Grupo de Fisiología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Colombia dirigido por Jean Paul Vernet, se inició el establecimiento de un sistema de cocultivo que permitiera instaurar un modelo de interacción entre células madre hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical y células madre mesenquimatosas de médula ósea para evaluar algunos aspectos funcionales de los progenitores hematopoyéticos, como proliferación, cambios inmunofenotípicos relacionados con diferenciación y capacidad de clonogenicidad. Esto se hizo con la finalidad de comprender el modelo normal de las células madre hematopoyéticas y explorar la posibilidad de extender estos hallazgos al modelo de células madre leucémicas, cuyo comportamiento patológico está claramente regulado por componentes del microambiente medular como las células madre mesenquimatosas (3,4).

Referencias

1. **Rodríguez VM, Cuellar A, Cuspoca LM, Contreras CL, Mercado M, Gómez A.** Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas de sangre de cordón umbilical. *Biomédica*. 2006;26:51-60.
2. **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.
3. **Kim JA, Kang YJ, Park G, Kim M, Park YO, Kim H, et al.** Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells*. 2009;27:1318-29.

4. **Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG.** The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009;114:1150-7.

Modulación de células madre hematopoyéticas por células madre mesenquimatosas

Jean Paul Vernet¹, Ana María Perdomo¹, Viviana Rodríguez²

¹ Grupo de Fisiología Molecular y Celular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

jpvernoth@unal.edu.co

Las células madre hematopoyéticas se encuentran en un microambiente especializado conocido como el “nicho” de células madre en la médula ósea. Esto incluye diferentes tipos celulares con relevancia heterogénea en las diferentes especies. En el “nicho” de células de ratones, juegan un papel fundamental los osteoblastos, mientras que, en el nicho humano, se ha sugerido que las células madre mesenquimatosas parecen conferir y modular las propiedades funcionales de las células madre hematopoyéticas. Las células madre mesenquimatosas son un soporte adecuado para la hematopoyesis, ya que sintetizan una red compleja de citocinas, moléculas de adhesión y componentes de la matriz extracelular que regulan la supervivencia, la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas.

Las células madre hematopoyéticas obtenidas de cordón umbilical son una opción muy interesante para el reemplazo de la médula ósea o para la terapia celular. Sin embargo, su uso clínico es limitado debido al número de células que se pueden obtener, que puede ser suficiente para pacientes jóvenes, pero es insuficiente para adultos. Por esta razón, la expansión *in vitro* se ha convertido en una opción para estos pacientes. Sin embargo, las células expandidas *in vitro* no guardan las características propias de las células madre, lo que limita su utilización. El entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales las células madre mesenquimatosas influyen sobre las células madre hematopoyéticas, es fundamental para poder utilizar este conocimiento en la obtención de células madre hematopoyéticas que puedan ser utilizadas en la clínica.

En este trabajo, aislamos las células madre hematopoyéticas de cordón umbilical y las mesenquimatosas de médula ósea, y establecimos un sistema de cultivo simultáneo para estudiar la interacción celular. Estudiamos los cambios fenotípicos que ocurren en las células madre hematopoyéticas en sistemas de expansión y la manera como las mesenquimatosas modulan estos cambios. Se demostró la importancia de las células madre mesenquimatosas en el mantenimiento de un fenotipo primitivo de las hematopoyéticas con capacidad de proliferar. El sistema de cultivo simultáneo a corto plazo (tres días) en presencia de SCF, TPO y Flt-3L fue más efectivo para obtener un número elevado de células que entran al ciclo celular y para mantener la expresión del marcador CD34.

Se encontró una relación entre las las células madre hematopoyéticas en el cultivo y la modulación por factores de transcripción asociados con la autorrenovación (Hox-B4/Pbx-1) y el mantenimiento de un fenotipo primitivo (Bmi-1). Lo anterior sugiere que éstos pueden hacer parte de las bases moleculares por las cuales las células madre mesenquimatosas influyen sobre las características funcionales de las hematopoyéticas.

Se demostró, igualmente, que las moléculas de adhesión (CD54, CD44 y CD49d) de las células madre hematopoyéticas tienen una regulación fina y diferencial por las mesenquimatosas.

Finalmente, se estudió la influencia de las células madre mesenquimatosas sobre la expresión de CXCR4 y la migración de las hematopoyéticas, en respuesta a un gradiente de la quimiocina SDF-1. El cultivo de las células madre hematopoyéticas, independientemente del tratamiento, disminuyó la expresión de CXCR4. Sin embargo, esta disminución fue más importante en el caso de las hematopoyéticas cultivadas simultáneamente, lo cual se correlacionó con una disminución importante de su migración. Además, se muestra la respuesta en términos de adhesión intercelular en respuesta al SDF-1 en las células madre hematopoyéticas cocultivadas con las mesenquimatosas.

En conclusión, las células madre mesenquimatosas juegan un papel fundamental en el mantenimiento de un fenotipo de las hematopoyéticas más primitivo (menos diferenciado) y esto se puede relacionar con moléculas de señalización intracelulares (factores de transcripción), que se han asociado con los programas celulares de autorrenovación

(proliferación sin diferenciación) y mantenimiento de un estado no diferenciado.

Determinación del volumen mínimo de recolección de sangre de cordón umbilical para criopreservación y trasplante hematológico

María Margarita Manrique¹, Olga Lucía Rojas²

¹ Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Sanitas; maestría en Ciencias Biomédicas, Universidad de Los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

² Unidad de Inmunología, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

olga.rojas@urosario.edu.co

Introducción. El número de bancos de sangre de cordón umbilical ha aumentado de forma importante en los últimos años; sin embargo, la experiencia de los países desarrollados de la región es limitada. Para garantizar la sostenibilidad y el éxito de un banco público de sangre de cordón umbilical en Colombia, es necesario establecer un volumen mínimo de recolección de sangre de cordón umbilical, que garantice una adecuada cosecha de células nucleadas totales ($\geq 8 \times 10^8$) y células CD34+ ($\geq 3 \times 10^6$).

Métodos. Se recolectaron 137 muestras de sangre de cordón umbilical de niños nacidos en el Hospital San Ignacio por parto vaginal o por cesárea (noviembre de 2008 a junio de 2009). Se determinó el volumen recolectado. La cuantificación absoluta de las células nucleadas totales CD34+ y la viabilidad celular se determinaron mediante citometría de flujo, empleando anti CD34, anti CD45, 7AAD y TruCOUNT. El análisis se efectuó en plataforma de ISAGHE (CellQuest). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS 16.

Resultados y conclusiones. Con 137 muestras analizadas, la curva ROC sugiere un volumen mínimo de recolección de 75 ml sangre de cordón umbilical (93% de sensibilidad y 70% de especificidad), para garantizar un número de células nucleadas totales $\geq 8 \times 10^8$. La regresión logística sugiere que el sexo masculino del recién nacido predice significativamente ($p=0,016$) la posibilidad de cumplir con el volumen medio de corte. El punto de corte sugerido para el volumen mínimo de recolección, garantiza un recuento de células nucleadas totales $\geq 8 \times 10^8$ para trasplante

hematológico, lo que optimiza los procesos y disminuye los costos de operación de un banco de sangre de cordón umbilical público en Colombia.

En el futuro, el banco de sangre de cordón umbilical en funcionamiento debe realizar estudios retrospectivos para confirmar estos hallazgos.

The EuroFlow 8-color panels for the immunophenotypic diagnosis and classification of haematological disorders

J. J. van Dongen, L. L'Hermitte, S. Bottcher, A. Almeida, V. H. J. van der Velden, J. Flores-Montero, A. Rawstron, V. Asnafi, Q. Lecrevisse, P. Lucio, E. Mejstrikova, T. Szczepanski, T. Kalina, R. de Tute, M. Brüggemann, L. Sedek, M. Cullen, A. W. Langerak, A. Mendonça, E. Macintyre, M. Martin-Ayuso, O. Hrusak, A. Orfao for the EuroFlow Consortium.

Cytometry Service, Department of Medicine and Cancer Research Centre, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Flow cytometry has now been used for many years in the diagnosis, prognostic classification and evaluation of treatment effectiveness of hematological malignancies. However, a major drawback of the technique has been its reproducibility among different laboratories. Since April 2006 the EuroFlow group has been developing and testing 8-color panels of monoclonal antibody reagents that could improve current application of immunophenotyping to the diagnosis and classification of leukemia and lymphoma and provide new tools also for increased standardization and reproducibility; in a second phase minimal residual disease (MRD) panels are being built.

After several rounds of designing-testing-redesigning of multicolor antibody panels, 8-color flow cytometry antibody panels were proposed by the EuroFlow group in June 2009 at the Annual Congress of the European Hematology Association. For the first time, such consensus panels are not based on subjective consensus opinions derived from the shared experience of multiple experts, but after they were designed, they were actually tested and modified several times for an improved performance.

Overall, the panels proposed by the EuroFlow group can be divided into two major subgroups: 1) screening and orientation single-tube panels and 2) multiple-tube disease-oriented panels. Among the former, monoclonal antibody panels were

designed for: 1) acute leukemia orientation (ALOT; one 8-color tube); 2) screening for abnormal/clonal populations of lymphocytes (lymphocyte screening tube or LST; one 8-color tube) with a variant for the screening of small/paucicellular samples (small sample tube or SST; one 8-color tube), and ; 3) screening for plasma cell neoplasms (plasma cell dyscrasias tube or PCDT; one 8-color tube).

Disease-oriented panels include multiple 8-color combinations of monoclonal antibodies for the diagnosis and classification of: 1) B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, 2) T-cell acute lymphoblastic leukemia, 3) acute myeloblastic leukemia, 4) B-cell chronic lymphoproliferative disorders, 5) T-cell chronic disorders and 6) NK-cell neoplasias. The acute myeloid leukemia panel can also be used for the immunophenotypic evaluation of hematopoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms.

In each panel of monoclonal antibody combinations, two different sets of markers are combined: 1) the so-called backbone markers aiming at the identification of the most relevant cell populations in the sample and, 2) characterization markers, whose major utility is focused on a more complete immunophenotypic characterization of said cell populations for disease diagnosis and classification.

Noteworthy, the designed antibody panels are optimally tuned to be evaluated in combination with the new and innovative EuroFlow data analysis tools implemented in the INFINICYT software (Cytognos SL). Through such combined approach easy evaluation of the overall immunophenotypic profile of a given cell population against reference data sets of multiple normal and pathological samples stained with the same (or partially overlapping) reagent panels can be easily performed whenever such reference data files are readily available. Because of this at present, the EuroFlow groups are building such reference data files so that they could be used in combination with the EuroFlow panels of reagents and software tools.

Relevant references

Van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2010 (in process).

Kalina T, Flores-Montero J, Lecrevisse Q, Cullen M, Lhermitte L, Sedek L, et al. Technical aspects and guidelines for application of EuroFlow protocols: towards 8-color flow cytometry in the diagnosis and classification of hematological malignancies. *Leukemia*. 2010 (in process).

Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, van Dongen JJ, Orfao A. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A*. 2008;73A:834-46.

Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J, et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 2008;73A:1141-50.

DNA content analysis for ploidy and cell cycle assessment

Zbigniew Darzynkiewicz

Brander Cancer Research Institute, New York Medical Center, Valhalla, N.Y. USA

z_darzynkiewicz@nymc.edu

DNA content is the most frequently measured constituent of the cell. Analysis of DNA content reveals cell ploidy, and provides information on cell distribution across the cell cycle; also, it defines the proportion of cells in $G_{0/1}$, S and G_2M phases. Cell cycle analysis allows estimating the frequency of apoptotic cells characterized by fractional DNA content.

The general principles of DNA content measurement by flow cytometry and laser scanning cytometry will be presented, and, also, a multiparameter cell cycle analysis when DNA content and other cell constituents are measured concurrently.

The following approaches of DNA content analysis will be addressed:

- (a) supravital cell staining;
- (b) DNA staining after lysis of plasma membrane;
- (c) DNA staining in fixed cells, and

(d) analysis of DNA from nuclei of paraffin-embedded tissues.

Factors that affect accuracy of DNA content measurement will be discussed, such as:

- (a) differences in chromatin structure of the analyzed cells that restrict DNA accessibility to fluorochromes,
- (b) stoichiometry of interaction between fluorochromes and DNA in chromatin, and (c) chemical mass action law defining dependency of fluorochrome binding to DNA, in relation to the fluorochrome concentration and the number potential binding sites in a sample.

Also, controls used to ensure accuracy of DNA ploidy assessment will be described as well as potential difficulties and most frequent pitfalls in analysis of DNA content.

Since cellular DNA content measurements results are generally presented as frequency histograms, approaches to discriminate cells will be discussed, in particular, cell cycle phases based on computer-assisted deconvolution of histograms. Cytometric methods to identify DNA replicating cells based on analysis of incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) or 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and their application to measure cell cycle kinetics also will be presented.

References

Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle. *Cycling through history*. *Cytometry*. 2004;58A:21-32.

Darzynkiewicz Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Curr Protoc Cytom*. 2010; Unit 7.2.14:1150-7.