

## Resúmenes

### Presentación en carteles

#### **C1. Los pacientes con lupus eritematoso sistémico tienen un aumento en el número de monocitos CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>+</sup>.**

C. Burbano-Arciniegas, G. M. Vásquez-Duque, M. Rojas  
Unidad de Citometría, Grupo de Inmunología Celular e  
Inmunogenética, Grupo de Reumatología, Universidad  
de Antioquia, Medellín, Colombia  
mrojaslop@hotmail.com

**Introducción.** En humanos se han descrito tres subpoblaciones de monocitos circulantes según la expresión de CD16 y CD14. En individuos sanos, se estima que, aproximadamente, 90% de los monocitos son CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>-</sup> (monocitos clásicos) y aproximadamente 2% de los monocitos es de baja expresión de CD14<sup>bajo</sup> y CD16<sup>+</sup>. Esta última subpoblación se ha asociado con las respuestas proinflamatorias. La subpoblación de células CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>+</sup> se asocia con la producción de IL-10. Las alteraciones de estas subpoblaciones no se han estudiado en pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Nuestro objetivo fue comparar las proporciones de células en las subpoblaciones de monocitos en pacientes con lupus eritematoso sistémico y en controles sanos, y determinar la expresión de HLA-DR en diferentes subpoblaciones de monocitos.

**Métodos.** Se obtuvieron muestras de pacientes con lupus eritematoso sistémico (n=17), diagnosticados de acuerdo con el *American College of Rheumatology*. En ambos grupos hubo una misma proporción de hombres y mujeres y no difirieron en edad. Se tiñeron 25 ml de sangre periférica con anti-CD14, anti-CD16 y anti-HLA-DR. Las muestras se hemolizaron y analizaron por citometría de flujo, usando un FACSCANTO II, Becton Dickinson.

**Resultados y conclusión.** No hubo diferencias en el número total de células CD14 entre los pacientes con lupus eritematoso sistémico y las personas sanas; sin embargo, encontramos mayores porcentajes y conteos absolutos mayores de monocitos CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,04$ ). En los pacientes con lupus eritematoso sistémico, todas las subpoblaciones tuvieron menor expresión de HLA-DR y CD16, lo que sugiere posibles alteraciones

funcionales en esta subpoblación. Se identificó una población de células CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>alto</sup> hasta la fecha no descrita, y de función desconocida, únicamente en los pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Nuestros resultados indican que hay una elevada proporción y número de CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>+</sup>, y todos los fagocitos mononucleares de los pacientes con lupus eritematoso sistémico muestran baja expresión de HLA-DR y CD14, lo que indica alteraciones funcionales en los monocitos de estos pacientes. Para aclarar el significado de este hallazgo, debe estudiarse *in vitro* e *in vivo* la función de estas células. Se propone estudiar la función de cada una de estas subpoblaciones, haciendo una separación electromagnética en el MOFLO XDP y estimulándolas *in vitro* con cuerpos apoptóticos.

#### **C2. Concordancia y reproducibilidad de la inmunofenotipificación por citometría de flujo en la detección de blastos en médula ósea en estudios de seguimiento de niños con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda**

E. A. Medina, C. Saavedra, A. Linares, R. E. Andrade  
Universidad Nacional de Colombia, Fundación Santa Fe de Bogotá y Fundación HOMI, Hospital de La Misericordia, Bogotá, D.C., Colombia  
eamediname@unal.edu.co

**Introducción.** El estudio inmunofenotípico por citometría de flujo es una herramienta útil para el diagnóstico y seguimiento de la leucemia linfoblástica aguda, dada su capacidad de detectar blastos en médula ósea. Sin embargo, depende del operador.

Recientemente, se han desarrollado diversos programas analíticos que prometen una mayor facilidad de uso y niveles superiores de discriminación celular. Se comparó la utilidad de un programa reciente con otro conocido y de amplio uso, y la variabilidad de los resultados entre diferentes operadores en la detección de blastos en aspirados de médula ósea de niños en seguimiento con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

**Métodos.** Se hizo una búsqueda en el archivo electrónico del Laboratorio de Patología de la Fundación Santa Fe de Bogotá, de casos de niños con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, seguidos durante 2008-2009 (121 registros/38 niños). Se obtuvo el registro del porcentaje de blastos en la fecha de la realización de la prueba con el programa de análisis usado en esos momentos. Posteriormente, se recuperaron los archivos (\*.fcs) de cada uno de los registros y se analizaron con el programa de lanzamiento reciente, por parte de un médico residente de patología con entrenamiento adicional en citometría de flujo.

Se analizó la correlación por el método de regresión logística. Se establecieron los niveles de detección, considerando los puntos de corte de mayor relevancia clínica ( $\geq 5\%$ , 1% a 5%,  $< 1\%$  y  $< 0,1\%$ ) y se hizo el cálculo de concordancia.

**Resultados y conclusiones.** La correlación fue de 98,81%, el coeficiente de correlación de concordancia fue de 0,987 (IC95%; 0,981-0,992) y los límites de acuerdo (Bland-Altman) fueron de -0,033 a 0,039 (diferencia promedio, 0,003). El nivel de acuerdo fue 70,73% y el índice kappa, 0,5689. Hubo buena correlación y buena concordancia entre los resultados obtenidos por el personal muy bien entrenado y en formación avanzada, utilizando programas de análisis diferentes.

### C3. Respuesta linfoproliferativa a péptidos derivados de las proteínas P30 y ROP18 en toxoplasmosis ocular

E. Torres-Morales, A. De la Torre, J. C. Sepúlveda-Arias, M. A. Patarroyo, J. E. Gómez-Marín

Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia, y Fundación Instituto de Inmunología, Bogotá, D.C., Colombia

gepamol2@uniquindio.edu.co

**Introducción.** Existen pocos estudios sobre la respuesta inmunitaria celular en toxoplasmosis ocular. Se analizó la respuesta de los linfocitos frente a péptidos derivados de dos proteínas del parásito, la proteína de superficie P30 y la proteína ROP18, un factor de virulencia en el modelo de infección en el ratón.

**Métodos.** Se estudiaron los linfocitos de dos voluntarios sin lesión ocular y sin anticuerpos para *Toxoplasma* sp, de dos voluntarios con presencia de anticuerpos específicos IgG anti-*Toxoplasma*

y sin lesión ocular, ocho muestras de pacientes con toxoplasmosis ocular en fase activa y seis de pacientes con toxoplasmosis ocular en fase inactiva. Se cultivó sangre completa en tubos estériles de polipropileno y se adicionó el estímulo por cinco días. El control negativo fueron células en medio RPMI y, el control positivo, concanavalina A (ConA) y estimulación con antígeno total soluble de *Toxoplasma* sp.

Se seleccionaron tres secuencias de péptidos de la proteína ROP18 de *Toxoplasma* sp. para cada tipo de clon: ROP I, ROP II y ROP III. Además, se usó el péptido 2017 de la proteína P30. Para la cuantificación de las poblaciones de linfocitos, se marcaron los leucocitos con el reactivo Cyto Stat triCHROME (Beckman Coulter), que incluye CD8 FITC/CD4 RD1/CD3 PC5. Los ensayos se hicieron por duplicado. Se utilizó el citómetro de flujo Beckman Coulter Cytomics FC 500.

**Resultados y conclusiones.** Se encontró un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ de los pacientes con infección (activos, inactivos con cicatriz o sin ella) frente a los estímulos de antígeno total (excepto los inactivos) y para los péptidos ROP I, ROP II y ROP III, excepto para ROP II en los que no tenían cicatriz. No hubo diferencias significativas entre los promedios de porcentajes de las poblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD8+, entre los pacientes activos o inactivos, excepto frente al antígeno total, para el cual no respondieron los pacientes con cicatriz inactiva.

### C4. Detección de células T específicas del virus de Epstein-Barr en controles sanos seropositivos mediante citometría de flujo

G. Vélez, S. Fiorentino, S. Quijano

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

squijano@javeriana.edu.co

**Introducción.** El virus de Epstein-Barr es un virus herpes con amplia distribución mundial, que se encuentra asociado a neoplasias B en las que expresa proteínas con actividad oncogénica. Estas proteínas pueden actuar como superantígenos, activando subgrupos de células T con un TCR (V $\beta$  particular) en presencia de HLA-II, o tienen por sí mismas propiedades mitogénicas.

**Objetivo.** Analizar si las células T de individuos sanos seropositivos se activan en respuesta al estímulo con virus de Epstein-Barr.

**Métodos.** Se analizaron 30 muestras de sangre periférica estimuladas *in vitro* durante seis horas en presencia o ausencia de un lisado celular de virus de Epstein-Barr (5 µg/ml). Además, se añadió un inhibidor de la liberación de FNT-α al medio extracelular (TAPI) y anticuerpos anti-CD28 (1 µg/ml) y CD49d (1 µg/ml). Posteriormente, se realizó la determinación de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, FNT-α e IFN-γ) por citometría de flujo, mediante un inmunoensayo de microesferas en suspensión; además, se analizó el fenotipo de las células T activadas por el antígeno (células FNT-α<sup>+</sup>).

**Resultados y conclusiones.** En comparación con el control sin lisado viral, se observó un incremento en la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/FNT-α<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/FNT-α<sup>+</sup> y monocitos FNT-α<sup>+</sup> (p<0,05, respectivamente) circulantes activados en respuesta a las proteínas del lisado viral, en conjunto con cantidades superiores de IFN-γ, FNT-α e IL-2 (p<0,05, respectivamente).

Estos resultados sugieren que el virus de Epstein-Barr induce una respuesta de células T de memoria que requiere evaluación si se trata de respuestas policlonales o monoclonales. Además, estos hallazgos son útiles como punto de partida para comparar la respuesta hacia virus de Epstein-Barr en pacientes con neoplasias de células B maduras.

### C5. Transportador ABCB1 como marcador de linfocitos B de memoria

A. Corrales-Bernal, M. Rojas-López, G. Vásquez-Duque  
Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética,  
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia  
andreacb83@gmail.com

**Introducción.** La identificación de linfocitos B en cada uno de sus estadios de diferenciación, es relevante para comprender su fisiología e inmunopatología. La identificación de linfocitos B de memoria ha sido un reto. La expresión de CD27 se ha utilizado por mucho tiempo. Sin embargo, la evidencia funcional de una población de linfocitos B CD27<sup>-</sup> de memoria obliga a la búsqueda de herramientas que permitan su fenotipificación. El transportador ABCB1, funcional en linfocitos B vírgenes y no en linfocitos B de memoria, podría ser útil para tal fin.

**Métodos.** Se tiñeron células mononucleares de sangre periférica obtenidas de donantes sanos, a 37°C con rodamina 123 (R123), a 2 µM por 30 minutos, como una medida de la funcionalidad del transportador ABCB1. Para la fenotipificación, se hicieron tinciones con los anticuerpos CD19 y CD27.

**Resultados.** Al clasificar los linfocitos B con base en la expresión de CD27, se obtuvieron 85,6% vírgenes (CD27<sup>-</sup>) y 12,1% de memoria (CD27<sup>+</sup>). Al clasificar los linfocitos B según la tinción con R123, se obtuvieron 40,8% vírgenes (R123<sup>-</sup>) y 56,9% de memoria (R123<sup>+</sup>). En cambio, la clasificación según la expresión de CD27 y la tinción con R123, evidenció dos subpoblaciones de memoria (CD27<sup>+</sup> y CD27<sup>-</sup>, ambas R123<sup>+</sup>) y los porcentajes se distribuyeron así: 40,8% vírgenes (R123<sup>-</sup>), 12,1% de memoria CD27<sup>+</sup> R123<sup>+</sup> y 44,8% de memoria CD27<sup>-</sup> R123<sup>+</sup>.

**Conclusión.** La tinción con R123, simultáneamente con la de CD27, permite ampliar la inmunotipificación de linfocitos B de memoria.

### C6. Evaluación de células T reguladoras circulantes e infiltrantes de piel en pacientes con linfoma cutáneo de células T de tipo micosis fungoide

V. Duque<sup>1,2</sup>, O. Valencia<sup>2</sup>, L. A. Correa<sup>2</sup>, M. Rojas<sup>1</sup>, L. F. García<sup>1</sup>, M. M. Velásquez-Lopera<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, GICIG, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Dermatológica, GRID, Sección de Dermatología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

vickyduque@gmail.com

**Introducción.** El linfoma cutáneo de células T de tipo micosis fungoide, es una neoplasia del sistema inmunitario cuyo órgano blanco primario es la piel. Representa el 1% de los linfomas no Hodgkin extraganglionares, predomina en hombres mayores de 50 años y progresa desde parches hasta tumores y eritrodermia (>80% de la piel).

**Objetivos.** Comparar la frecuencia de células T reguladoras circulantes en pacientes antes de iniciar tratamiento y en controles sanos, y evaluar las células T reguladoras en piel con enfermedad activa.

**Métodos.** Las células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> FOXP3<sup>+/h</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> FOXP3<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> fueron cuantificadas en células mononucleares de sangre periférica y en células infiltrantes de piel por citometría de flujo. Los linfocitos infiltrantes FOXP3<sup>+</sup>, T-bet<sup>+</sup> e IL-17<sup>+</sup> se evaluaron por inmunohistoquímica. Ya que la expresión de FOXP3 puede ser inducida en bajos niveles después de la activación, se analizó la expresión de FOXP3<sup>alto</sup>.

**Resultados y conclusiones.** Se estudiaron 30 pacientes, 14 mujeres y 16 hombres, con promedio de edad de 48 años (rango, 11 a 86), cinco de los cuales eran menores de 15 años (16,7%), y 30 controles, 14 mujeres y 16 hombres, con promedio de edad de 47 años (rango, 12 a 92).

La frecuencia de células T reguladoras circulantes CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> FOXP3<sup>+</sup> no difirió entre pacientes y controles, pero la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> FOXP3<sup>alto</sup> fue mayor en los pacientes (p=0,0288). En estos últimos se observó una distribución bimodal, 17 con frecuencia similar a los controles y 13 con valores elevados.

En las biopsias se observaron 0,87% linfocitos infiltrantes CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> y 0,12% linfocitos infiltrantes CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>alta</sup> (n=4). La inmunohistoquímica reveló abundantes linfocitos FOXP3<sup>+</sup> en dermis y epidermis, escasos T-bet<sup>+</sup> y ausentes IL-17<sup>+</sup> (n=8).

**Conclusiones.** Aunque la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> FOXP3<sup>+</sup> circulantes no difiere entre pacientes y controles, la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>alto</sup> FOXP3<sup>alto</sup> es significativamente mayor en los pacientes. Se identificaron células con estos mismos fenotipos en las biopsias cutáneas. Los estudios sobre regulación inmunitaria podrían contribuir al desarrollo de herramientas útiles en la clínica.

**Financiación:** Universidad de Antioquia y COLCIENCIAS (código 111540820527).

## C7. Utilidad de la citometría de flujo multiparamétrica y la citología por punción aspiración con aguja fina en enfermedades hematológicas

E. Agriello<sup>1,4</sup>, M. Brandt<sup>1,3</sup>, P. Lommi<sup>1,4</sup>, P. Pombo<sup>1,4</sup>, C. Lang<sup>4</sup>, L. Zanella<sup>4</sup>, M. Aggio<sup>3</sup>, V. Fernández<sup>1</sup>, D. Di Paolo<sup>1</sup>, H. Berardi<sup>2</sup>, Garbiero S

<sup>1</sup> Servicio de Hematología, Hospital Penna, Bahía Blanca, Argentina

<sup>2</sup> Servicio de Diagnóstico por Imágenes, HIGA Dr. Penna, Bahía Blanca, Argentina

<sup>3</sup> Instituto Lavalle, Bahía Blanca, Argentina

<sup>4</sup> Laboratorio LEB, Bahía Blanca, Argentina  
evangeagriello@hotmail.com

**Introducción.** La punción aspiración con aguja fina es una técnica usada para la obtención de muestras en forma rápida o de difícil acceso. La guía tomográfica facilita la óptima toma de la muestra. Se obtienen células para evaluación morfológica, anatomía patológica, citometría de flujo multiparamétrica y demás técnicas complementarias.

**Objetivo.** Evaluar la utilidad de la punción aspiración con aguja fina para caracterizar células neoplásicas *versus* células reactivas, por citometría de flujo multiparamétrica.

**Métodos.** Se evaluaron 25 pacientes: 20 con diagnóstico presuntivo de enfermedad tumoral y 5 recaídas de neoplasias hematológicas. Se estudiaron 7 adenopatías, 5 tumoraciones, 2 punciones de bazo y 5 muestras de líquidos biológicos. Se obtuvieron muestras sin anticoagulante para patología, y anticoaguladas para citometría de flujo multiparamétrica, citogenética, FISH y biología molecular. La inmunomarcación se realizó en dos etapas: 1) tamización de linfocitos B, T y NK, monocitos y granulocitos, y 2) identificación de la población de interés.

**Resultados y conclusiones.** En 19 muestras se detectaron células linfomatosas; las muestras restantes no fueron evaluables. Las enfermedades halladas fueron: linfoma folicular (4), linfoma del manto (2), linfoma no Hodgkin de grandes células (3), linfoma no Hodgkin marginal esplénico (1), linfoma no Hodgkin de células pequeñas (1), linfoma inmunoblástico (1), linfoma no Hodgkin B (5), linfoma no Hodgkin de precursor T (1) y linfoma no Hodgkin T maduro (1).

Se debe resaltar la importancia de un equipo de trabajo multidisciplinario formado por el grupo de imágenes, patólogos, hematólogos y bioquímicos. Sólo el resultado positivo es válido: la ausencia de células neoplásicas no excluye la existencia de una enfermedad. Esta técnica es una opción rápida para constatar de forma no agresiva la recaída onco-hematológica y arribar al diagnóstico en los casos de difícil acceso.



### **C8. Determinación de la fuente celular y frecuencia de citocinas en individuos con enfermedad crónica activa, recurrente e infección asintomática causada por *Leishmania panamensis***

N. Navas<sup>1</sup>, B. Parra<sup>2</sup>, L. Valderrama<sup>1</sup>, N. Saravia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Biomédicas, Cali, Colombia

<sup>2</sup> Universidad del Valle, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Cali, Colombia

adrianam.navas@gmail.com

**Introducción.** La leishmaniasis es un problema de salud prioritario en Colombia. La persistencia del parásito, la cronicidad y la recurrencia de las lesiones son características distintivas de la enfermedad. El desenlace clínico depende de la especie de *Leishmania* y la respuesta inmunitaria del huésped. Contrario a la respuesta polarizada en el modelo de ratón, una respuesta mixta de citocinas caracteriza la infección causada por *Leishmania panamensis* en humanos. Se desconoce la participación de diferentes poblaciones celulares en la respuesta mixta de citocinas y si varían en relación con el desenlace clínico de la infección, en la leishmaniasis cutánea por *L. panamensis*.

**Métodos.** Se identificaron células productoras de IFN $\gamma$ , FNT $\alpha$ , IL-10 y IL-13 de individuos asintomáticos, y de pacientes con lesiones crónicas y recurrentes, a partir de células mononucleares de sangre periférica expuestas a promastigotes de *L. panamensis*. Las células se cultivaron simultáneamente durante 72 horas con el parásito en presencia o ausencia de hrIL-2. Se determinaron el fenotipo celular y la producción de citocinas intracelulares por citometría de flujo. El nivel de citocinas secretado fue determinado por ELISA.

**Resultados y conclusiones.** Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron la principal fuente celular de IFN $\gamma$ , FNT- $\alpha$  e IL-13 en los individuos de los grupos clínicos evaluados. La IL-10 fue producida principalmente por linfocitos B y linfocitos T CD4<sup>+</sup> en individuos con enfermedad crónica, y por macrófagos CD14<sup>+</sup> en individuos con infección asintomática. Se observó una mayor proporción de células productoras de IFN $\gamma$ , FNT- $\alpha$  e IL-13 en los individuos con infección crónica, en comparación con los otros grupos clínicos. La producción no regulada de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias podría estar asociada con el desenlace clínico de la enfermedad.

### **C9. Análisis por citometría de flujo de pacientes con trastornos linfoproliferativos posteriores a trasplante hepático en la Fundación Santa Fe entre enero de 2002 y febrero 2010**

M. Romero, G. Quintero, S. Quijano, M. Rodríguez, R. López, M. Duarte, M. Cuéllar, A. Vera, V. Idrovo, R. Andrade, C. Saavedra

Fundación Santa Fe de Bogotá, Departamento de Patología y Laboratorio, Departamento de Oncohematología, Servicio de Trasplantes, Bogotá, D.C., Colombia

sanmalili@yahoo.com.ar

**Introducción.** La linfoproliferación posterior a trasplante es infrecuente, y morfológica e inmunofenotípicamente heterogénea. Se origina en un ambiente de inmunosupresión, inadecuada inmunovigilancia de los linfocitos T citotóxicos e infección por virus de Epstein-Barr. Comprende un espectro de lesiones hiperplásicas, polimórficas y monomórficas, cuya clasificación es esencial porque el pronóstico y la terapéutica difieren.

Hay escasas publicaciones sobre análisis de pacientes con esta alteración por citometría de flujo. Se reporta mayor incidencia de proliferaciones B monoclonales CD20-negativas y pérdida de expresión de cadenas livianas de las inmunoglobulinas.

**Métodos.** Se hizo un análisis retrospectivo de los pacientes con trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante hepático, evaluando la información epidemiológica e inmunofenotípica, determinada por citometría de flujo, de médula ósea o lesión tumoral.

**Resultados y conclusiones.** De 181 pacientes con trasplante hepático, cinco pacientes desarrollaron trastorno proliferativo posterior al trasplante (2,7%) estudiados por citometría de flujo, inmunohistoquímica o ambas; cuatro con compromiso hepático y uno con compromiso de médula ósea. Cuatro pacientes presentaron trastorno proliferativo posterior al trasplante monomórfico; uno mieloma, dos linfoma B difuso de células grandes, uno con linfoma de linaje no especificado, y uno con trastorno proliferativo posterior al trasplante polimórfico.

La edad media fue de 65 años, cuatro fueron hombres y el tiempo posterior a trasplante fue de 6 meses. Las lesiones fueron positivas para virus de Epstein-Barr, excepto el paciente con mieloma.

La citometría de flujo de médula ósea detectó predominio de linfocitos T CD8 y presencia de linfocitos B policlonales.

Epidemiológicamente, nuestros casos de trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante están en concordancia con lo descrito en la literatura. En nuestra serie de casos, aunque la mayoría fueron monomórficos positivos para el virus de Epstein-Barr, la citometría de flujo de médula ósea detectó predominio de linfocitos T CD8 y ausencia de clones de linfocitos B.

Es muy recomendable realizar un análisis integral de los pacientes con trasplante con sospecha de esta enfermedad, con paneles amplios de citometría de flujo para análisis de médula ósea y la lesión, que conlleven a un diagnóstico específico, al conocimiento de la fisiopatogenia y a la instauración de nuevas terapias.

### C10. Efecto de la infección con *Leishmania panamensis*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania donovani* sobre la apoptosis de macrófagos U937

A. Arévalo, L. Valderrama L, N. Saravia

Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM, Cali, Colombia

liliana\_valderrama@cideim.org.co

**Introducción.** Algunos organismos intracelulares inhiben la apoptosis de su célula huésped, lo que les permite sobrevivir, replicarse y protegerse del ataque directo del sistema inmunitario. Otros, en cambio, pueden inducirla para garantizar la fagocitosis por parte de otra célula huésped y perpetuar la infección. Con el fin de establecer si diferentes subgéneros de especies de *Leishmania* usan la apoptosis para promover la persistencia de la infección, se evaluó el efecto de la infección con *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. donovani* en la apoptosis de macrófagos humanos de la línea U937.

**Métodos.** Se infectaron macrófagos U937 diferenciados con *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. donovani*. Se trataron células infectadas y no infectadas con inductores de apoptosis (estaurosporina 6  $\mu$ M, camptotecina 6  $\mu$ M) y PBS, durante 8, 24, 48 y 72 horas. Mediante citometría de flujo, se evaluó la exteriorización de fosfatidilserina con anexina V-PE y 7AAD y la fragmentación del ADN. Se determinó la viabilidad de amastigotes en células apoptóticas mediante tinción con Syto16

(viabilidad) y anexina V Alexa-568 (apoptosis), por microscopía de fluorescencia.

**Resultados.** *L. panamensis* indujo apoptosis en macrófagos en presencia y en ausencia de estaurosporina. *L. mexicana* no tuvo efecto sobre la muerte del macrófago, mientras que *L. donovani* redujo la tasa de apoptosis. Se observaron amastigotes viables (positivos para Syto 16) para las tres especies evaluadas dentro de macrófagos apoptóticos.

**Conclusiones.** Se demostró que *Leishmania* spp. sobrevive a la apoptosis del macrófago y que el efecto de la infección sobre la apoptosis varía entre especies de *Leishmania*. *L. panamensis*, a diferencia de *L. donovani*, induce apoptosis en los macrófagos.

### C11. Cobalt-mimicked oxygen stress-induced expression of HLA-E and HLA-G in JEG-3 choriocarcinoma cells is mediated by HIF-1alfa

C. A. Piedrahita-Ochoa<sup>1</sup>, J. C. Bueno<sup>1</sup>, A. P. Cadavid<sup>1</sup>, J. G. Maldonado-Estrada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Grupo Reproducción, and <sup>2</sup> Grupo Centauro, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

christian.piedrahita@gmail.com

**Introduction:** The non-classical major histocompatibility complex (MHC) molecules HLA-G and HLA-E are selectively expressed by human cytotrophoblasts during human placental development, and they are presumed to be involved in functionally modulating the immune system at the fetal-maternal interface. These non classical MHC molecules are also expressed by JEG-3 choriocarcinoma cells. Because hypoxia is accepted as a condition accompanying human placenta development during the first trimester, we hypothesized that cobalt-mimicked oxygen stress could induce the expression of HLA-E and HLA-G in the choriocarcinoma JEG-3 cell line through accumulation/production of the hypoxia inducing factor 1alpha (HIF-1alpha).

**Methods:** Expression of mRNA and protein for HLA-E and HLA-G by JEG-3 cells incubated with 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> for 48h was determined by reverse transcriptase-PCR, indirect immunofluorescence and flow cytometry. HIF-1alpha accumulation was evaluated by western blot analysis at 1, 6, 12, 24, and 48h under CoCl<sub>2</sub> stimulus.

**Results:** Intracellular and cell surface expression of HLA-E and HLA-G was significantly increased ( $P<0.001$ ) after 48 hours in  $\text{CoCl}_2$ -treated versus control cells. The mRNA for HLA-E was significantly increased ( $P<0.05$ ) after 48 hours of  $\text{CoCl}_2$  treatment. A strong HIF-1 $\alpha$  protein accumulation was detected by western blot in  $\text{CoCl}_2$ -treated JEG-3 cells.

**Conclusions:** These results demonstrated an increased HLA-G and HLA-E expression induced in JEG-3 cells when using  $\text{CoCl}_2$  as oxygen stress-inducing agent and provide evidence of the role of HIF-1 $\alpha$  as a link between Cobalt-mimicked oxygen stress and HLA-E expression. A new landscape concerning to HLA-E and HLA-G modulation in response of JEG-3 choriocarcinoma cells to oxygen stress is presented.

**Financial support:** Colciencias grants 111534319151

## C12. Molecular characterization of inflammatory response in patients with influenza A (H1N1) 2009 infection

L. Arriaga-Pizano<sup>1</sup>, I. Mancilla-Herrera<sup>1</sup>, E. Domínguez-Cerezo<sup>1</sup>, M. Pérez-Toledo<sup>1</sup>, N. Valero-Pacheco<sup>1</sup>, A. Núñez-Valencia<sup>1</sup>, G. Rodríguez-Ábrego<sup>2</sup>, E. Ferat Osorio<sup>1</sup>, A. Isibasi<sup>1</sup>, C. López-Macías<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D. F., México

<sup>2</sup> Servicio de Epidemiología Hospitalaria, Hospital General Regional 1 "Dr. Carlos McGregor Sánchez Navarro", IMSS, México, D. F., México

landapi@hotmail.com

**Introduction:** In human influenza common virus is known that different components are recognized by immune system activating the recruitment of cells to the site of infection and promoting the synthesis of cytokines. This could be complicated when the action of cytokines becomes systemic causing systemic inflammatory response syndrome (SIRS). During human influenza AH1N1 2009 virus infection it has not been characterized the inflammatory response, so the aim of this study was to make a molecular characterization of this response.

**Material and methods:** Peripheral whole blood was obtained from patients with suspect infection by pandemic influenza AH1N1 2009 virus (the groups were selected by presence of SIRS criteria) and healthy subjects. By flow cytometry staining we

characterized the lymphocytes CD3, CD4 and CD8 cells population, and we characterized the serum cytokines concentrations by CBA system.

**Results and conclusions:** We included 8 H1N1+SIRS+, 16 H1N1+SIRS-, 8 H1N1-SIRS+, 12 H1N1-SIRS- and 11 healthy subjects. TCD4+ and TCD8+ lymphopenia is present in SIRS positive patients infected with pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. In other hand INF- $\gamma$  serum concentration show a overwhelming decrease on group H1N1+SIRS+ vs healthy subjects ( $11.98\pm 1.563$  vs.  $19.24\pm 17.05$  pg/mL) and vs H1N1+SIRS- ( $11.98\pm 1.563$  vs  $53.48\pm 1.794$  pg/ml).

There is a lymphopenia associated to inflammatory response but is selective of T lymphocytes The CD4+ and CD8+ T cells populations as well as INF- $\gamma$  serum concentration are diminished in patients infected with influenza A (H1N1) 2009 virus.

## C13. Comparative immunophenotypic profile of adherent stromal/stem cells from adipose tissue and bone marrow

O. Pachón Peña<sup>1</sup>, G. Yu<sup>2</sup>, A. Tucker<sup>3</sup>, X. Wu<sup>2</sup>, J. J. Vendrell<sup>1</sup>, B. A. Bunnell<sup>4</sup>, J. Gimble<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Metabolism, Endocrinology and Diabetes, CIBERDEM, Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain

<sup>2</sup> Stem Cell Biology, Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, LA

<sup>3</sup> Flow Cytometry and Cell Sorting Core, Tulane University School of Medicine, New Orleans, LA

<sup>4</sup> Nonhuman Primate Stem Cell Production Core, Center for Gene Therapy, Tulane University School of Medicine, New Orleans, LA

ogpachon@ir.vhebron.net

**Introduction:** Adipose tissue, like bone marrow, is derived from the mesenchyme and contains a supportive stroma that is easily isolated. Based on this, adipose tissue may represent a source of stem cells that could have far-reaching effects on several fields. These cells can be isolated from adipose tissue in significant numbers and exhibit stable growth and proliferation kinetics in culture (Aust *et al.*, 2004). Isolation of a population of stem cells with similar biologic potential from human adipose tissue has been described earlier (Zuk *et al.*, 2002; Aust *et al.*, 2004; Estes *et al.*, 2004; Dubois *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2005). Adipose tissue stem cells (ASCs), like bone marrow stem cells (BMSCs), differentiate *in vitro*

toward the osteogenic, adipogenic, neurogenic, myogenic, and chondrogenic lineage when treated with established lineage specific factors (Zuk *et al.*, 2001, 2002; Mizuno *et al.*, 2002). The multipotentiality of BMSCs and ASCs makes them promising candidates for mesodermal defect repair and disease management.

**Materials and methods:** Human ASCs were isolated from adipose tissue (n=12 female donors; median age, 30 years; range, 27 to 35) and BMSCs were isolated from bone marrow (n=12 unmatched female donors; median age, 29 years; range, 27 to 34).

The samples were obtained from tissues that were harvested with informed patient consent under protocols reviewed and approved by the Institutional Review Boards (IRB) of the Pennington Biomedical Research Foundation (for adipose) and Tulane University School of Medicine (for bone marrow). The IRBs function in accordance with the basic principles of the Declaration of Helsinki and Belmont Report for the Protection of Human Subjects as required by the NIH.

We performed a comprehensive flow cytometric analysis of undifferentiated cultured ASCs and BMSCs on a Beckman-Coulter Cytomics FC 500. Approximately 2-4 million cells were required to complete an analysis with the following antibody panel: 1) CD36FITC, CD34PE, CD19ECD, CD11b PeCy5, CD45PeCy7, 2) PCLP1FITC, CD166PE, CD90PeCy5, 3) CD49bFITC, CD105PE, CD184APC, CD3PeCy7, 4) CD147FITC, CD49cPE, CD29PeCy5, 5) CD59FITC, CD146PE, CD79aPeCy5, 6) HLA-class I FITC, CD271PE, CD49fPeCy5, CD117 PeCy7, 7) HLA-Class II FITC, CD73a PE, CD106 PeCy5, 8) HGF(c-Met) FITC, CD49d PE, CD14 ECD, CD44 APC and 9) isotype control.

**Results and conclusions:** The data revealed that the ASC and BMSC populations displayed a common expression profile for many surface antigens including the activated lymphocyte common adhesion molecule CD166. Nevertheless, significant differences were noted. While the ASCs were strongly positive for CD34, CD36, and CD49d and dimly positive for CD146 and PODXL, they were negative for the expression of CD49f and CD106. In contrast, the BMSC population was strongly positive for PODXL, CD146, CD49d and CD49f and dimly positive for CD106 while negative for CD34 and CD36. Like BMSCs, the ASCs were capable of differentiation along both the adipocyte and osteoblast lineage pathways

based on histochemical analyses. These studies indicate that adipose tissue presents an accessible, abundant, and alternative source of adult stem cells for potential regenerative applications.

#### **C14. Captación de liposomas que simulan la composición de la mielina por astrocitos humanos**

J. A. Alejo<sup>1</sup>, H. J. Ocampo<sup>1</sup>, N. I. Bolaños<sup>2</sup>, C. Leidy<sup>1</sup>, J. M. González<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

johgonza@uniandes.edu.co

**Introducción.** La capa de mielina está compuesta por alrededor de 80% de lípidos, incluyendo colesterol, fosfolípidos, esfingomielina y cerebrosidos. Durante algunos procesos patológicos en el sistema nervioso central, el daño a este aislante de axones puede exponer a las células de la glía circundantes a agregados lipídicos resultantes de las lesiones desmielinizantes. En efecto, la microglía, que se considera son los macrófagos locales, puede fagocitar mielina y residuos celulares. Los astrocitos humanos son otras células que podrían interiorizar restos de mielina. Estas células son reguladores esenciales de varios mecanismos neuronales de protección pero, también, están involucradas en la patogénesis de ciertas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias del sistema nervioso central. En este trabajo se estudió la dinámica de captación de liposomas por parte de astrocitos humanos.

**Métodos.** Se utilizó una línea tumoral de astrocitos humanos en condiciones normales, o estimulados con IFN- $\gamma$ , y se comparó la captación de liposomas con la línea de monocitos U937. Las células fueron incubadas con vesículas unilamelares pequeñas de 60 nm marcadas con la sonda fluorescente NBD/fosfatidil-etanolamina. Los liposomas usados representan diferentes lípidos de la mielina y se hizo seguimiento de su dinámica de interiorización por las células mediante espectrofluorimetría de fotones, citometría de flujo y microscopía fluorescente.

**Resultados y conclusiones.** Por espectrofluorimetría de fotones, los astrocitos muestran captación de liposomas a los 30 minutos, y alcanzaron



niveles de saturación alrededor de las dos horas. Estos resultados fueron corroborados por citometría de flujo, mediante la cual se observó la estabilización de la fluorescencia a las dos horas, aproximadamente, tras la adición de las vesículas. Además, se observó un porcentaje pequeño de células que mostraban captación pronunciada de liposomas. La interiorización de los liposomas fue específica según el lípido, ya que los astrocitos no interiorizaron esferas de poliestireno en comparación con los monocitos que sí las captaron.

Finalmente, por microscopía se determinó que los liposomas se dispersaban en el citoplasma celular tras cuatro horas de incubación y se concentraban alrededor del núcleo tras 12 horas de incubación, lo que sugiere un mecanismo de transporte específico que debe determinarse.

### C15. Evaluación de factores inflamatorios circulantes en pacientes con cardiopatía crónica por enfermedad de Chagas

N. Bolaños<sup>1</sup>, N. A. Giraldo<sup>1</sup>, A. Cuéllar<sup>2</sup>, F. Rosas<sup>3</sup>, V. Velasco<sup>3</sup>, N. Roa<sup>4</sup>, C. Puerta<sup>5</sup>, J. M. González<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

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

<sup>3</sup> Fundación Clínica Abood Shaio, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>4</sup> Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>5</sup> Laboratorio de Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

johgonza@uniandes.edu.co

**Introducción.** *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, puede producir una lesión cardíaca en la fase crónica. Se ha postulado la persistencia del parásito y la respuesta inmunitaria como factores importantes en la patogénesis del daño tisular.

El objetivo de este estudio fue comparar algunos factores solubles como posibles biomarcadores de inflamación y daño tisular en pacientes con y sin infección por *T. cruzi*.

**Materiales y métodos.** Se analizaron los plasmas de pacientes con enfermedad de Chagas en estadio crónico clasificados con los criterios de Kuschner en: asintomáticos (G0, n=7) y sintomáticos (G1, G2 y G3, n=11), controles sanos (n=8) e individuos con cardiopatía no por enfermedad de Chagas (n=7). Se utilizó un inmunoensayo de perlas múltiple fluorescente (Bender Medsystems) para determinar factores solubles, como CD40L (CD154), P-selectina (CD62L) y VCAM-1 (CD106), citocinas y quimiocinas, como MCP-1 (CCL2), IL-6 e IL-8, y el factor activador del plasminógeno tisular. Se usó un FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizaron los datos con el programa *FlowCytomixPro* (Bender Medsystems).

**Resultados.** La evaluación de los factores solubles permitió detectar menores niveles de CD40L en pacientes crónicos (intensidad media de fluorescencia (IMF), 485,0±619) al comparar con individuos con cardiopatía no por enfermedad de Chagas (IMF, 1044,9 ± 916,7; p=0,047).

El factor activador del plasminógeno tisular soluble en pacientes crónicos con sintomatología grave (G3) fue menor (IMF, 277,3±53,8) comparado con los controles sanos (IMF, 824,8±396,6; p=0,044) y pacientes con cardiopatía no por enfermedad de Chagas (IMF, 551,2±179,2; p=0,049).

De igual forma, se encontraron menores niveles de P-selectina soluble en pacientes crónicos en estadio G3 (IMF, 2094,5±56,4), al comparar con controles sanos (IMF, 3205,4±374,6; p=0,043) y pacientes con cardiopatía no por enfermedad de Chagas (IMF; 3131,8±808,6; p=0,048). No se encontraron diferencias significativas al comparar los valores para IL-6, IL-8 y MCP-1 en los tres grupos analizados.

**Conclusión.** La disminución en los niveles sistémicos de biomarcadores solubles, como CD40L, factor activador del plasminógeno tisular y CD62L, pueden reflejar un aumento en el consumo de estas moléculas en el proceso inflamatorio local, causado por la presencia del parásito, ya que se encuentra el mismo patrón al comparar con cardiopatía cuyo origen no era la enfermedad de Chagas y controles sanos.

