

37



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“Presencia de Células NK en Médula Osea de  
Pacientes con Neoplasias Hematológicas”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**KARLA ELIZABETH MADRIGAL VILLAVICENCIO**

Asesores: DR. ERASMO MARTINEZ CORDERO  
MIBB. DIANA ELODIA AGUILAR L.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.,

2000

287230



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

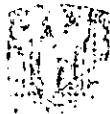


REPUBLICA NACIONAL  
ESTADO DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Presencia de células NK en médula ósea de pacientes con neoplasias  
Hematológicas"

que presenta 1a pasante: Karla Elizabeth Madrigal Villavicencio  
con número de cuenta: 9107340-0 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de agosto de 2000

PRESIDENTE

QFB Idalia Avila Miyasawa

VOCAL

Dr Marco Antonio Vega López

SECRETARIO

MIBB Diana Elodia Aguilar León

PRIMER SUPLENTE

MVZ Angel G Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE Dr Víctor Manuel Zendejas Buitrón

## DEDICATORIA

Aprendí esto, cuando menos con mi experimento:  
si uno avanza confiado en la dirección de sus sueños,  
e intenta vivir la vida que ha imaginado, se encontrará  
con un éxito inesperado en las horas ordinarias.  
En la proporción que simplifique su vida, las leyes  
del universo se le aparecerán menos complejas, y la  
soledad no le parecerá soledad, ni la pobreza pobreza,  
ni la debilidad debilidad.- Henry D. Thoreau.

Necesitamos la facultad creadora para  
imaginar lo que sabemos.- Shelley.

Esta tesis esta dedicada a Dios y a mis padres  
quienes me apoyaron siempre y a quienes  
agradezco lo mucho que lucharon para que  
lograra lo que ahora tengo y soy.

A Jorge Godínez Gómez por su apoyo y  
ayuda para lograr mis sueños ya que representa  
una persona muy especial en mi vida.

Así como a los profesores que dedican su  
vida a la formación de más profesionales.

| <b>ÍNDICE</b>                                       | <b>HOJA</b> |
|---|-------------|
| GLOSARIO DE TERMINOS.....                           | 1           |
| INTRODUCCIÓN.....                                   | 2           |
| a) CÉLULAS NK.....                                  | 2           |
| b) CÉLULAS NK Y CÁNCER.....                         | 3           |
| c) MARCADORES DE CÉLULAS NK.....                    | 7           |
| d) ONTOGENIA.....                                   | 13          |
| e) CITOTOXICIDAD POR NK.....                        | 15          |
| f) CÉLULAS NK Y CITOCINAS.....                      | 17          |
| g) NEOPLÁSIAS HEMATOLÓGICAS.....                    | 19          |
| JUSTIFICACIÓN.....                                  | 27          |
| HIPÓTESIS.....                                      | 28          |
| OBJETIVOS.....                                      | 28          |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....                             | 29          |
| RESULTADOS.....                                     | 35          |
| DISCUSIÓN.....                                      | 41          |
| CONCLUSIÓN.....                                     | 46          |
| ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....              | 47          |
| ANEXO 2. FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO..... | 48          |
| BIBLIOGRAFÍA.....                                   | 54          |

## GLOSARIO DE TERMINOS

|            |   |
|------------|---|
| CD         | Moléculas de diferenciación celular (“ Cluster designation”)    |
| Células NK | Células “Natural killer” o asesinas naturales                   |
| CMN        | Células mononucleares   |
| D.E.       | Desviación estándar   |
| E.E.       | Error estándar  |
| Fc         | Fracción cristalizabile   |
| IgG        | Inmunoglobulina G   |
| IL         | Interleucina  |
| LMA M4     | Leucemia mieloide aguda M4                                      |
| LGC        | Leucemia granulocítica crónica                                  |
| LLA        | Leucemia linfoblástica aguda                                    |
| LNH        | Linfoma No Hodgkin  |
| CMH        | Complejo principal de histocompatibilidad                       |
| M.O.       | Médula ósea   |
| PBS        | Solución amortiguadora de fosfatos                              |
| PMN        | Polimorfonucleares  |
| RT-PCR     | Reacción en cadena de la polimerasa mediante retrotranscripción |
| IFN        | Interferón  |
| SCF        | Factor de célula madre (Stem cell factor)                       |

## INTRODUCCIÓN

### a) CÉLULAS NK

El descubrimiento de las células NK se llevó a cabo en ratones que tenían una deficiencia genética, la cual era expresada como una falla en el desarrollo del pelo, así como una falla en el desarrollo de las funciones tímicas, dichos ratones son llamados "Nude"(desnudos). En los ratones Nude jóvenes, los compartimentos de células B y macrófagos son normales; sin embargo, estos ratones deficientes en células T eran sustancialmente resistentes a las infecciones virales y a las células tumorales (1). Posteriores investigaciones demostraron que esta resistencia se debía a la existencia de una clase de células llamadas NK (2). Sin embargo, a principio de los años 70's, los investigadores estudiaron la respuesta inmune mediada por células hacia tumores singénicos (propios) en humanos y en ratones, haciendo un alarmante descubrimiento. Los linfocitos de pacientes que padecían el tumor mostraron en ocasiones modestos niveles de citotoxicidad hacia sus propias células tumorales in vitro (3, 4). Como testigos los investigadores usaron linfocitos de individuos que no padecían tumores. En muchos casos los linfocitos de los testigos mostraron tanto o más actividad citotóxica hacia las células tumorales blanco que los linfocitos de los individuos que padecían el tumor (2). Rápidamente se estableció que los individuos sanos tenían una subpoblación de linfocitos, que sin ninguna sensibilización a priori, podían reconocer, atacar, y destruir un amplio rango de células tumorales. Estas células se llaman NK o asesinas naturales. Las células NK se han encontrado principalmente en la circulación periférica y en el bazo, además están presentes en bajos niveles en los nódulos linfáticos y en la médula ósea; y están virtualmente ausentes en el timo. Ellas pertenecen a una subclase de linfocitos llamados null, los cuales no muestran ninguno de los antígenos de células T o células B, y pueden desarrollarse en ausencia del timo (5, 6).

Las células NK juegan un papel importante en los mecanismos de defensa inespecíficos, especialmente contra tumores y células infectadas por virus. Normalmente comprenden de 10 a 15 % del total de linfocitos de sangre periférica. Morfológicamente las células NK son linfocitos grandes, tienen una alta relación citoplasma / núcleo y discretos gránulos azurófilos en el citoplasma. En el microscopio electrónico aparecen como células con núcleo indentado, cromatina condensada, y prominentes nucleolos (7). Estas células mononucleadas expresan diferente fenotipo dependiendo de su ubicación anatómica (8); entendiéndose como fenotipo la expresión observable de un genotipo (constitución genética) en forma de rasgos morfológicos, bioquímicos o moleculares (9). En sangre periférica se caracterizan por la expresión de los antígenos de superficie CD2/CD16/CD56 mientras que en médula ósea (M.O.) el fenotipo es de CD56+CD3- (8). A diferencia de las células T y B, no se sabe con certeza cual es el sitio donde estas células maduran y no se ha demostrado que posean memoria inmunológica (6).

El número y actividad de las células NK humanas en sangre periférica son extremadamente variables entre diferentes donadores y es probable que ocurra lo mismo en otros compartimientos. Además, su número y función pueden alterarse en varias condiciones fisio y patológicas (7).

#### **b) CÉLULAS NK Y CÁNCER**

La relevancia de las células NK en pacientes con cáncer surge a partir del estudio de la citotoxicidad específica mediada por los linfocitos humanos (6).

Un papel de las células NK contra el tumor implica una habilidad de estas células para interactuar con las células tumorales singénicas y destruirlas. Tal habilidad fue demostrada contra una línea de células singénicas transformadas. En este estudio las células NK fueron parcialmente purificadas y/o activadas con IFN (interferón), demostrando que las células tumorales autólogas y alogénicas (no propias) eran sensibles a la citotoxicidad por NK (10).



Existen evidencias de estudios en pacientes con síndrome de Chediak- Higashi con una deficiente función de células NK, pero relativamente una función normal de células T y B que han demostrado que estos pacientes son particularmente susceptibles a desórdenes linfoproliferativos malignos, probablemente como resultado de su deficiencia en células NK (11, 12).

Una actividad deficiente de NK ha sido encontrada en miembros de familias con aparente predisposición a melanomas u otros cánceres (13). Numerosos estudios retrospectivos han documentado una función anormal de células NK en pacientes con una variedad de tumores malignos (14, 15). Además se ha demostrado que en pacientes con cáncer avanzado la actividad de las células NK esta usualmente deprimida (14, 16); sin embargo esta depresión parece ser secundaria a la invasión del tumor y parece ser debida a la interacción de las células NK con las células tumorales (17).

Varios estudios apoyan la posibilidad de que las células NK jueguen un papel en la resistencia del hospedero contra el crecimiento tumoral y metástasis *in vivo* (18, 19). Haller et al (18) observaron una correlación entre el rechazo de un pequeño número de células de linfoma sensibles a NK transplantadas y el nivel de actividad de NK en el ratón receptor. En este estudio se demostró que los ratones con una baja actividad de NK tenían una alta incidencia de metástasis del tumor, mientras que la metástasis era marcadamente inhibida en ratones cuya actividad de NK estaba activada por la administración de agentes que inducen interferón (20). Kasai et al (21) reportaron que la selección positiva de células NK, pero no de otras poblaciones linfoides, inhibe el crecimiento del linfoma. Estos resultados proveen evidencias definitivas de que las células efectoras activas en la prevención de la metástasis de tumores hematógenos son las células NK (22).

Por otra parte, ante un proceso neoplásico se puede esperar que las células NK lleven a cabo su papel de células citotóxicas infiltrando o migrando al sitio de invasión tumoral, en

cuyo caso la transformación hematológica maligna puede dar lugar a una respuesta del sistema inmune favoreciendo la migración de las células NK de sangre periférica hacia la M.O.

La correlación entre células NK intratumorales infiltradas y las características clínico patológicas en pacientes con cáncer ha sido estudiada por Ishigami (23), que observó que los pacientes con alto nivel de infiltración de NK tenían baja metástasis presentando un mejor pronóstico, que los pacientes con un bajo nivel de infiltración de NK. Se ha sugerido que los linfocitos en contacto con las células tumorales juegan un papel en la defensa inmune. La respuesta inmune a células tumorales autólogas puede estar mediada principalmente por células NK (23), y su actividad a veces refleja inmunocompetencia (24). Mientras que el número de células NK que contienen las células neoplásicas constituye un pequeño porcentaje de los linfocitos infiltrados, ellas pueden ser suficientes para tener efectos antitumorales locales. La proporción de cura en los pacientes con un alto nivel de infiltración de NK fue significativamente más alto que la proporción de los pacientes con un bajo nivel de infiltración de NK (25). La invasión linfática fue baja, y la dimensiones del tumor fue pequeña en pacientes con un alto nivel de infiltración de NK, ya que éstos pueden tener efectos contra el tumor, como una eficiente vigilancia, y producir una progresión controlada de la enfermedad, particularmente al inicio de la misma. La combinación de infiltración de células NK y linfocitos incrementa el tiempo de vida significativamente (25).

Se ha propuesto que las células NK juegan un papel importante en varias actividades, una de ellas es la inmunovigilancia contra tumores, especialmente en leucemias (26, 27). En pacientes con leucemia (LMA, LLA, LMC) y en pacientes con linfoma, los cuales fueron comparados con controles se realizó un análisis de la función de células efectoras citotóxicas que median la muerte natural y la citotoxicidad celular dependiente de

anticuerpos (ADCC). En los individuos sanos se encontró un incremento lineal en la actividad lítica de las células mononucleares extraídas de sangre periférica a ciertos rangos de relación efector:blanco, mediante un ensayo de citotoxicidad con  $^{51}\text{Cr}$ . La actividad de NK en los pacientes con leucemia demostró que una proporción de pacientes tenían un reducido o nulo nivel de actividad citotóxica. En muchos de ellos esto parece ser debido a la presencia de blastos circulantes que diluyen o reemplazan a las células efectoras funcionales (28).

La regulación de la actividad de las células NK en pacientes con tumores hematopoyéticos es diferente de lo que se observa en pacientes con tumores sólidos. Los pacientes con preleucemia o síndrome mielodisplásico tienen generalmente una reducida actividad de células NK (29). El número de células NK identificable fenotípicamente es, sin embargo, normal en muchos pacientes. La alteración en el microambiente de la médula ósea en estos pacientes es probablemente responsable de la deficiente producción o diferenciación de las células NK. Una depresión en la actividad de las células NK se observa en pacientes con leucemia aguda o crónica. Pacientes con leucemia crónica mieloide y de células B a veces presentan una proporción significativa de células con el fenotipo  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD16}^+$ , en algunos donadores sanos el antígeno CD16 es expresado en baja densidad en una proporción insignificante de células T  $\text{CD3}^+$ , y se considera un fenotipo común de las células de pacientes con linfocitosis de linfocitos granulares grandes, considerándose como una expresión aberrante de antígenos por las células malignas (30).

Finalmente, se ha reportado una forma previamente no reconocida de leucemia aguda que muestra características mieloides y de células NK en las células de sangre periférica. Mediante citometría de flujo se confirmó la coexpresión de los antígenos mieloides ( $\text{CD33}$ ,  $\text{CD15}$ ), así como del marcador  $\text{CD56}$  asociado a células NK; mientras que un ensayo de RT-PCR confirmó la presencia de la molécula  $\text{CD56}$  en los blastos leucémicos. Además, no

se encontraron rearrreglos clónales del gen que codifica para el receptor de células T (TCR  $\alpha \beta / \gamma \delta$ ). Estos datos han sugerido que esta forma de leucemia aguda puede surgir de la transformación de un precursor celular común de los linajes de células mieloides y células NK (31).

### c) MARCADORES DE SUPERFICIE DE CÉLULAS NK

La identificación de las células NK, la definición de su morfología, características fenotípicas, así como la determinación de funciones específicas ha permitido distinguir a esta población como una subclase diferente de células (7).

|                                | CÉLULAS NK % | CÉLULAS T % | MONOCITOS % | NEUTROFILOS % |
|--------------------------------|--------------|-------------|-------------|---------------|
| <b>ANTÍGENOS DE SUPERFICIE</b> |              |             |             |               |
| CD2                            | 70-90        | >95         | <5          | <5            |
| CD3                            | 0            | >95         | 0           | 0             |
| CD8                            | 30-40        | 30-40       | <5          | <5            |
| CD11B                          | 80-90        | 10-15       | >90         | >90           |
| CD16                           | 80-90        | <5          | 10-15       | >95           |
| CD56                           | >95          | <5          | <5          | <5            |
| <b>ATRIBUTOS FUNCIONALES</b>   |              |             |             |               |
| ADCC                           | SI           | NO          | SI          | SI            |
| ACTIVIDAD NK                   | SI           | NO          | NO          | NO            |
| FAGOCITOSIS                    | NO           | NO          | SI          | SI            |
| MEMORIA                        | NO           | SI          | NO          | NO            |

CUADRO 1. Características antigénicas de las células NK y otros efectores citolíticos (33).

La identificación mediante anticuerpos se ha definido mediante la denominación de antígenos de diferenciación (CD), los cuales son un conjunto de glucoproteínas que aparecen paulatinamente sobre la membrana de las células a medida que avanza su maduración o cuando se activan algunas de sus funciones. El término CD ( designación de

agrupamiento; cluster designation) provino del análisis computarizado de los anticuerpos monoclonales, contra los antígenos leucocitarios humanos llevado a cabo por diferentes laboratorios de todo el mundo, donde los anticuerpos monoclonales con características de especificidades similares se agruparon conjuntamente bajo un mismo número de CD. La identificación de los CD permite clasificar todas las células que derivan del tejido hematopoyético, pero principalmente las células del sistema inmunitario, según la etapa de maduración en la que se encuentren, el linaje al que pertenecen o la condición fisiológica como reposo y/o activación que tienen en un momento dado. La gran mayoría de los antígenos CD son receptores de membrana, pero en el laboratorio clínico su presencia tiene el significado de "marcadores" que permiten identificar y clasificar las células que circulan en sangre y en M.O. (32).

### **CD16**

Uno de los marcadores de superficie identificados en las células NK desde su descripción fue el receptor para la fracción cristalizable (Fc) de la IgG (Fc $\gamma$  R III), conocido actualmente como CD16 (Leu 11). Es un polipéptido glicosilado de 50 a 70 KDa expresado por 80 a 90 % de las células NK (34, 35). Además se encuentra en todos los neutrófilos (36), algunos eosinófilos y en monocitos activados (37, 38). La función del CD16 es unirse a la región Fc de las IgG1 e IgG3 con baja afinidad, se ha reportado que no se une de manera detectable a la IgG2 o IgG4 (36). Es de interés mencionar que el CD16 presente en los granulocitos es bioquímica y serológicamente distinto al que se encuentra en las células NK. El CD16 se encuentra unido a la membrana de los neutrófilos vía glican fosfatidilinositol, mientras que el CD16 de las células NK es una proteína transmembranal (39). El gran dominio citoplásmico del CD16 en las células NK hace pensar que puede participar en la activación durante el ADCC (40). La activación de las células NK a través del CD16 resulta en la expresión y secreción de citocinas tales como IFN- $\gamma$ , FEC-

granulocitos y monocitos, y TNF- $\alpha$  (41, 42, 43). Tal activación puede involucrar la cadena  $\zeta$ , un homodímero de 32 Kd implicado en la activación a través de la asociación con el CD16 en las células NK lo cual resulta en una tirosinfosforilación de la cadena  $\zeta$ . La unión del CD16 en la superficie de las células NK induce una rápida elevación del calcio libre en el citosol, así como la producción de trifosfato de inositol, ambos importantes mensajeros bioquímicos durante la activación (44). El CD16 parece estar únicamente involucrado en las células NK con el fenómeno de ADCC, debido a que el bloqueo del CD16 con complejos inmunes elimina esta actividad citolítica (35).

Las células NK pueden funcionar como células presentadoras de antígenos, reemplazando a los monocitos como células accesorias en la inducción de la proliferación de las células T específicas para el antígeno. Dicho antígeno tiene que estar acompañado con anticuerpos específicos. Este efecto está mediado por sus Fc $\gamma$ Rs de superficie, los cuales son responsables de aumentar la proliferación de las células T cuando los antígenos se adicionan como complejos inmunes (35).

### **CD56**

El antígeno CD56 es una isoforma de la molécula de adhesión celular neural (NCAM) tiene un peso de 140 kDa. El CD56 es expresado en una subpoblación de linfocitos granulares grandes de sangre periférica y en todas las células con actividad de NK. Parece que el antígeno CD56 por sí mismo no participa directamente en la actividad citolítica de las células NK, mientras que un estudio sugiere que el CD56 puede mediar la adhesión de las células NK a las células tumorales (45).

También se ha sugerido que la expresión de CD56 es importante en la apropiada activación de las células NK, así como en la maduración de las células T citotóxicas, donde es necesario un contacto directo con las células NK, por lo cual la expresión de CD56 puede ser importante para este reconocimiento (46).

## **NKR-P1**

El antígeno NKR-P1 es una glicoproteína de membrana tipo III de la superfamilia de las lectinas tipo C que es expresada como dímeros unidos a disulfuro en la superficie de muchas células NK y subclases de células T (47, 48, 49, 50). Los anticuerpos contra el NKR-P1 estimulan el cambio de fosfoinosítidos (51) y la generación de ácido araquidónico (52), induciendo una liberación de calcio intracelular (51), e impulsando la citotoxicidad mediada por las células NK, así como la producción de citocinas (53, 54).

Se ha demostrado que la pérdida en la expresión de NKR-P1 en una línea de células NK correlaciona con una incapacidad para matar ciertas líneas de células tumorales. Al llevarse a cabo la transfección de NKR-P1 con DNAc en las células NK se restauró la citotoxicidad contra estas células tumorales, lo que sugiere un papel del NKR-P1 en el reconocimiento de la célula blanco (55).

El ligando del receptor de NKR-P1 es el CD1. El CD1 es una familia de glicoproteínas de superficie, cuyos genes no se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad. Por consiguiente son proteínas completamente distintas a los antígenos de histocompatibilidad Clase I o II, y a pesar de su falta de polimorfismo, participan en la presentación de antígenos a linfocitos T y células NK (56).

En el humano existen cuatro proteínas CD1 que han sido clasificadas en dos grupos, según su estructura y distribución en los tejidos. CD1A, CD1B y CD1C están en el primer grupo, y se expresan abundantemente en la membrana de las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas interdigitantes de Langerhans o los monocitos activados; mientras que CD1D cae en el segundo grupo y sólo se encuentra expresado en la membrana de las células epiteliales del intestino. La habilidad para presentar antígenos glicolipidos claramente distingue a las moléculas CD1 como otro grupo de moléculas presentadoras de antígenos. Estudios estructurales han demostrado que el CD1 tiene una cavidad hidrofóbica

que puede acomodar las cadenas acil de los antígenos lipídicos (57). La unión de ciertos determinantes antigénicos a CD1 se lleva a cabo en las vesículas del retículo endoplásmico, lo mismo que sucede con la unión de otros oligopéptidos a las moléculas de histocompatibilidad clase I. Sin embargo existen algunas diferencias; en primer lugar, es distinta la naturaleza química de los determinantes, ya que CD1 ha sido asociado a la presentación de antígenos que no son péptidos sino lípidos y glicolípidos. Por su parte la unión de CD1 a esos determinantes es independiente de las moléculas transportadoras de antígenos TAP-1 y TAP-2 que llevan los oligopéptidos hasta las moléculas de histocompatibilidad clase I (56). En la vía de presentación del CD1B, el receptor de manosa es responsable de captar y liberar los antígenos lipídicos y de transportarlos al endosoma (58).

#### **CD94 / NKG2**

Se ha demostrado que las células NK humanas expresan varios receptores que pueden reconocer ciertos alotipos del HLA-A, -B, -C (59). De esta manera la función de las células NK parece estar regulada por un balance entre receptores de señal positiva que activan, y receptores inhibidores que suprimen la activación celular. Las células NK humanas expresan varios receptores que pueden reconocer específicamente alotipos del CMH de clase I. Entre ellos se encuentra el receptor CD94/NKG2 expresado en células NK humanas y en una subclase de células T (60, 61, 62), son miembros de la superfamilias de las lectinas de tipo C y han sido implicadas en el reconocimiento del polimorfismo de las moléculas HLA de clase I. Los receptores CD94/NKG2 son heterodímeros unidos a disulfuro, compuestos de una subunidad común invariante, CD94, que está unida a distintas glicoproteínas codificadas por un gen de la familia de NKG2 (63). Mientras que el CD94 es un solo gen que ha sido implicado en el reconocimiento de ciertos alotipos de HLA - A,



-B, -C (64, 65), puede además traducir tanto señales positivas como negativas para la citotoxicidad de NK (66, 67, 68).

En cuanto a la familia del NKG2 comprende cuatro genes, designados NKG2A/B, NKG2C, NKG2E y NKG2D/F (69). El dominio extracelular y citoplásmico de NKG2A, NKG2C y NKG2E son estructuralmente diferentes, sugiriendo diferencias en el reconocimiento y señales de transducción. El CD94 carece de un dominio citoplásmico, de esta manera no tienen la capacidad de transducir señales. Parece que la glicoproteína NKG2 es incapaz de ser expresada en la membrana celular a menos que se una a la glicoproteína CD94 (63). De esta manera el CD94 puede funcionar primariamente como un chaperón para permitir el transporte del receptor NKG2 a la superficie celular (64). La fracción NKG2A/B posee dos inmunorreceptores ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) en su dominio citoplásmico el cual puede ser responsable de la función inhibitoria de este receptor, mientras que otras proteínas NKG2 carecen de ITIMs y pueden potencialmente transmitir señales positivas (63).

## **CD2**

El CD2 es una glicoproteína de membrana de 50 kDa de la superfamilia de las Ig expresada en células T y NK. Anticuerpos monoclonales contra epitopos particulares en CD2 activan la citotoxicidad mediada por las células NK (70). Los eventos biológicos que acompañan a la activación del CD2 son similares a los iniciados por la unión del CD16. En particular, la estimulación del CD2 en las células NK resulta en la activación de cinasas de la familia src y en la generación de trifosfato de inositol. Sin embargo, hay evidencias de que la activación mediante el CD2 involucra la fosforilación de  $\xi$  (64). El ligando del CD2 es otra glicoproteína de membrana, el CD58 (LFA-3) (71). Se ha sugerido que el CD2 puede servir como un receptor coestimulador que aumenta, pero no inicia, la primera activación de las células NK (64).

En el análisis de otros marcadores de superficie de las células NK se han empleado combinaciones de antígenos, principalmente de células T y mieloide, pero en ocasiones estos marcadores de superficie no están presentes en todas las células NK, lo que ha sugerido alguna heterogeneidad dentro de la población total. Las células NK humanas carecen de los marcadores de superficie característicos de las células B; tampoco expresan los antígenos CD5 y CD3 que están presentes en todos los linfocitos T (45).

#### **d) ONTOGENIA**

Respecto al linaje de las células NK, se ha sugerido una procedencia mieloide debido a su morfología, la presencia de varias enzimas características de polimorfonucleares (PMN) y monocitos, como son la hidrolasas, ácido fosfatasa,  $\beta$ -glucuronidasa, así como la expresión de marcadores de superficie presentes en PMN como el CD16. Por otro lado, la expresión de antígenos expresados en células T(CD2) y la habilidad de las células NK para proliferar en presencia de IL-2 e IL-12 concuerda con un linaje de células T (72).

Se sabe que los precursores de células NK residen en la M.O. sin embargo el desarrollo hacia células maduras no se conoce con exactitud (73, 74). Recientemente se ha demostrado que las células NK se desarrollan a partir de una población de células CD34+ CD33+ CD56-, lo cual indica una estrecha relación con el linaje mieloide al ser positivas en su expresión de CD33 (75). Las observaciones más recientes han propuesto que los progenitores de las células NK tienen el fenotipo CD34+ CD33+ CD7+ CD2+/- CD16- CD56-, mientras que las células NK maduras exhiben los marcadores CD34- CD33- CD7+ CD2+/- CD16+ CD56+ (76). El CD16 es expresado en la mayoría de las células de sangre periférica que han completado su proceso de maduración y si bien esta presente en neutrófilos así como en una pequeña subpoblación de células T y en algunos macrófagos activados, sigue aceptándose como un marcador importante de células NK maduras (77).

En el análisis de otros marcadores de superficie de las células NK se han empleado combinaciones de antígenos, principalmente de células T y mieloide, pero en ocasiones estos marcadores de superficie no están presentes en todas las células NK, lo que ha sugerido alguna heterogeneidad dentro de la población total. Las células NK humanas carecen de los marcadores de superficie característicos de las células B; tampoco expresan los antígenos CD5 y CD3 que están presentes en todos los linfocitos T (45).

#### **d) ONTOGENIA**

Respecto al linaje de las células NK, se ha sugerido una procedencia mieloide debido a su morfología, la presencia de varias enzimas características de polimorfonucleares (PMN) y monocitos, como son la hidrolasas, ácido fosfatasa,  $\beta$ -glucuronidasa, así como la expresión de marcadores de superficie presentes en PMN como el CD16. Por otro lado, la expresión de antígenos expresados en células T(CD2) y la habilidad de las células NK para proliferar en presencia de IL-2 e IL-12 concuerda con un linaje de células T (72).

Se sabe que los precursores de células NK residen en la M.O. sin embargo el desarrollo hacia células maduras no se conoce con exactitud (73, 74). Recientemente se ha demostrado que las células NK se desarrollan a partir de una población de células CD34+ CD33+ CD56-, lo cual indica una estrecha relación con el linaje mieloide al ser positivas en su expresión de CD33 (75). Las observaciones más recientes han propuesto que los progenitores de las células NK tienen el fenotipo CD34+ CD33+ CD7+ CD2+/- CD16- CD56-, mientras que las células NK maduras exhiben los marcadores CD34- CD33- CD7+ CD2+/- CD16+ CD56+ (76). El CD16 es expresado en la mayoría de las células de sangre periférica que han completado su proceso de maduración y si bien esta presente en neutrófilos así como en una pequeña subpoblación de células T y en algunos macrófagos activados, sigue aceptándose como un marcador importante de células NK maduras (77).

Se ha reconocido que la IL-2 es la principal citocina necesaria para la diferenciación de los progenitores de células NK *in vitro*, sugiriendo de esta manera que los progenitores de células NK tienen un receptor para IL-2, sin embargo la presencia de células NK en ratones deficientes de IL-2 también indica que otras citocinas pueden participar en su diferenciación. Recientemente la IL-15 producida por las células estromales ha demostrado su capacidad para unirse a los receptores  $\gamma$  y  $\beta$  de la IL-2, y de esta manera traducir señales en las células NK, llevando a su diferenciación a partir de las células CD34+ (77).

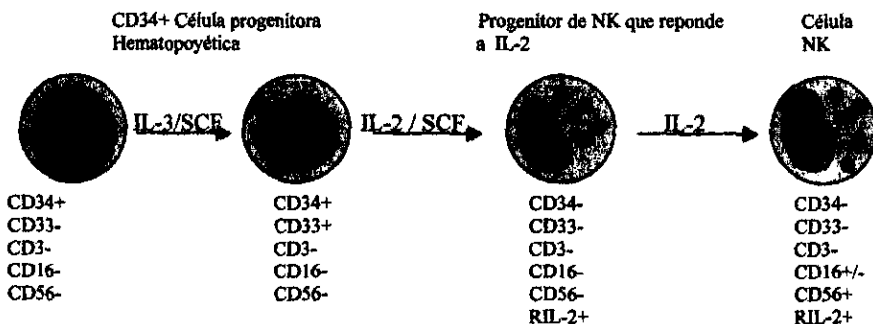


Figura 2. Esquema que muestra las primeras vías de diferenciación de las células NK a partir de células progenitoras hematopoyéticas CD34+.

Este modelo para la diferenciación de células NK se basa en que la célula progenitora hematopoyética con el fenotipo de CD34+CD33- se diferencia hacia CD34+CD33+ en presencia de IL-3. En esta primera fase es requerido el SCF ("Stem cell factor" factor de célula madre), la cual es una citocina producida por las células estromales que se une al receptor de membrana conocido como c-kit en la célula progenitora hematopoyética y que es requerido para que los progenitores de células NK se vuelvan sensibles a la IL-2. Posteriormente las células sensibles a IL-2 dejan de expresar el CD34 y CD33 para diferenciarse hacia células NK (75).

Las células NK son linfocitos granulares grandes que derivan de M.O. y poseen el fenotipo CD2+CD16+CD56+, carecen del CD3 y del TCR, característico de linfocitos T. Numerosos estudios han demostrado que las células NK CD3-CD56+ humanas pueden ser obtenidas de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ derivadas de M.O. cultivadas en presencia de IL-2. La falla para detectar la presencia de IL-2 dentro del estroma de M.O. y

la presencia de células NK en ratones deficientes de IL-2 sugiere que otras citocinas pueden participar en la diferenciación de las células NK a partir de la célula madre hematopoyética in vivo. La IL-15 es una citocina que carece de una secuencia homóloga con la IL-2 pero puede activar a las células vía receptor de IL-2. Se ha demostrado que las células estromales de M.O. expresan constitutivamente la transcripción de IL-15 y que además son capaces de secretar la proteína. Finalmente se ha encontrado una subclase de células NK de sangre periférica que parece ser la menos diferenciada de las células NK debido a que mantienen un alto potencial proliferativo y carecen del CD16 o lo expresan en baja densidad. Las más abundantes células NK de sangre periférica expresan el fenotipo CD2+CD16+CD56<sup>debil</sup> y presentan baja capacidad de proliferación. De esta manera parece que la menor subclase de células NK con el fenotipo CD2+CD16-CD56<sup>brillante</sup> esta en una fase intermedia de diferenciación entre la población derivada de M.O. con fenotipo CD56<sup>brillante</sup> y la más abundante población de NK con fenotipo CD2+CD16+CD56<sup>debil</sup>. La ausencia de la expresión del antígeno de superficie CD2 en las células NK derivadas de M.O., han sugerido que adicionales factores son requeridos para la expresión de CD2 en las células NK. La presencia de una subclase de células NK con el fenotipo CD2+ CD16-CD56+ en sangre periférica sugiere que la adquisición del CD16 puede surgir en la circulación periférica en subsecuentes pasos de la maduración de las células NK (77).

#### **e) CITOTOXICIDAD POR NK**

##### **A) APOPTOSIS**

Se sabe que las células NK, al reconocer a la célula blanco, liberan señales de muerte tanto por inserción de poliperforinas (PFN) y por impulsar una cascada de eventos suicidas a través de serinproteasas, conocidas como granzimas (78). Dentro de estas granzimas, la granzima B (GrB) ha demostrado ser crucial para una rápida inducción de apoptosis. En la membrana de la célula blanco se encuentran sitios de unión específicos para la GrB que la

la presencia de células NK en ratones deficientes de IL-2 sugiere que otras citocinas pueden participar en la diferenciación de las células NK a partir de la célula madre hematopoyética in vivo. La IL-15 es una citocina que carece de una secuencia homóloga con la IL-2 pero puede activar a las células vía receptor de IL-2. Se ha demostrado que las células estromales de M.O. expresan constitutivamente la transcripción de IL-15 y que además son capaces de secretar la proteína. Finalmente se ha encontrado una subclase de células NK de sangre periférica que parece ser la menos diferenciada de las células NK debido a que mantienen un alto potencial proliferativo y carecen del CD16 o lo expresan en baja densidad. Las más abundantes células NK de sangre periférica expresan el fenotipo CD2+CD16+CD56<sup>debil</sup> y presentan baja capacidad de proliferación. De esta manera parece que la menor subclase de células NK con el fenotipo CD2+CD16-CD56<sup>brillante</sup> esta en una fase intermedia de diferenciación entre la población derivada de M.O. con fenotipo CD56<sup>brillante</sup> y la más abundante población de NK con fenotipo CD2+CD16+CD56<sup>debil</sup>. La ausencia de la expresión del antígeno de superficie CD2 en las células NK derivadas de M.O., han sugerido que adicionales factores son requeridos para la expresión de CD2 en las células NK. La presencia de una subclase de células NK con el fenotipo CD2+ CD16-CD56+ en sangre periférica sugiere que la adquisición del CD16 puede surgir en la circulación periférica en subsecuentes pasos de la maduración de las células NK (77).

#### **e) CITOTOXICIDAD POR NK**

##### **A) APOPTOSIS**

Se sabe que las células NK, al reconocer a la célula blanco, liberan señales de muerte tanto por inserción de poliperforinas (PFN) y por impulsar una cascada de eventos suicidas a través de serínproteasas, conocidas como granzimas (78). Dentro de estas granzimas, la granzima B (GrB) ha demostrado ser crucial para una rápida inducción de apoptosis. En la membrana de la célula blanco se encuentran sitios de unión específicos para la GrB que la

llevan al interior de la célula, parece de esta manera que la PFN también es integrada a la célula blanco, lo cual es necesario para transportar las vesículas unidas a la GrB al citosol, donde las proteasa inician el programa de muerte. La función de la GrB es específicamente segmentar uniones peptídicas después de los residuos de Asp en las caspasas para formar enzimas activas (79). Las caspasas son las proteínas encargadas de ejecutar la fase de apoptosis. Después de liberarse al citosol por las PNF, es posible que la GrB preferentemente active a la caspasa 10, la cual madura la caspasa 3. La caspasa 3 actúa como un punto de convergencia para múltiples vías de inducción, después inicia el procesamiento de la caspasa 7 y otras caspasas (79).

#### B) CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC)

Las células NK han sido relacionadas con la muerte de la célula blanco a través del mecanismo de ADCC, particularmente porque las células NK tienen una gran cantidad de receptores FcγR sobre su membrana (80). Sin embargo también los macrófagos activados y los leucocitos PMN pueden utilizar el mismo mecanismo de ADCC para destruir células blanco (81). Estos receptores facilitan la fagocitosis del microorganismo que tienen anticuerpos IgG unidos a sus antígenos de superficie. La especificidad relativa del ADCC la dan los anticuerpos IgG que reconocen antígenos en la membrana de la célula blanco, mientras que la célula citotóxica solo reconoce, inespecíficamente, la porción distal Fc de la IgG que puede estar sobre la membrana de cualquier célula. Las perforinas parecen ser las principales moléculas inductoras de la muerte celular ya sea por apoptosis o por perforación en la membrana, por lo cual en este mecanismo se ven involucradas las GrB y las caspasas antes mencionadas (32).

### C) LA PROTEINA FAS Y EL FACTOR MUERTE O FASL

El Fas (CD95, Apo-1) y FasL (CD95L) son un sistema apoptótico bien establecido tanto en la regulación del desarrollo del sistema inmune, como en la respuesta inmune. En las células hematopoyéticas, el Fas es expresado en monocitos/macrófagos, granulocitos, linfocitos T y B, células NK y progenitores hematopoyéticos. El FasL, molécula efectora, es expresada por células hematopoyéticas, células T y B, granulocitos, macrófagos y células NK (82-85). Ambas moléculas son proteínas transmembranales de la familia del factor de necrosis tumoral. La ocupación del Fas por el FasL impulsa una cascada de eventos subcelulares que resultan en el programa de muerte celular llamado apoptosis.

### f) CELULAS NK Y CITOCINAS

Varios estudios en el humano han demostrado que las células blanco infectadas por virus o tumorales son preferentemente lisadas por las células NK y que factores solubles aumentan la actividad de dichas células. Durante un proceso neoplásico las células NK se unen a las células tumorales y producen IFN- $\gamma$  además responden a la IL-2 e IL-12 produciendo más INF- $\gamma$ . El IFN aumenta eficientemente la actividad citotóxica de las células NK.

Los tres tipos de IFN humano conocido son: de fibroblastos ( $\beta$ ), de leucocitos tipo I ( $\alpha$ ) y el de leucocitos tipo II o inmune ( $\gamma$ ), éste último ha demostrado ser el más efectivo. El incremento en la actividad de las células NK debido al IFN es muy rápido y requiere una síntesis de novo de proteínas pero no de proliferación celular, lo que lleva a una falta de memoria inmunológica (7).



### **C) LA PROTEINA FAS Y EL FACTOR MUERTE O FASL**

El Fas (CD95, Apo-1) y FasL (CD95L) son un sistema apoptótico bien establecido tanto en la regulación del desarrollo del sistema inmune, como en la respuesta inmune. En las células hematopoyéticas, el Fas es expresado en monocitos/macrófagos, granulocitos, linfocitos T y B, células NK y progenitores hematopoyéticos. El FasL, molécula efectora, es expresada por células hematopoyéticas, células T y B, granulocitos, macrófagos y células NK (82-85). Ambas moléculas son proteínas transmembranales de la familia del factor de necrosis tumoral. La ocupación del Fas por el FasL impulsa una cascada de eventos subcelulares que resultan en el programa de muerte celular llamado apoptosis.

### **D) CELULAS NK Y CITOCINAS**

Varios estudios en el humano han demostrado que las células blanco infectadas por virus o tumorales son preferentemente lisadas por las células NK y que factores solubles aumentan la actividad de dichas células. Durante un proceso neoplásico las células NK se unen a las células tumorales y producen IFN- $\gamma$  además responden a la IL-2 e IL-12 produciendo más INF- $\gamma$ . El IFN aumenta eficientemente la actividad citotóxica de las células NK.

Los tres tipos de IFN humano conocido son: de fibroblastos ( $\beta$ ), de leucocitos tipo I ( $\alpha$ ) y el de leucocitos tipo II o inmune ( $\gamma$ ), éste último ha demostrado ser el más efectivo. El incremento en la actividad de las células NK debido al IFN es muy rápido y requiere una síntesis de novo de proteínas pero no de proliferación celular, lo que lleva a una falta de memoria inmunológica (7).

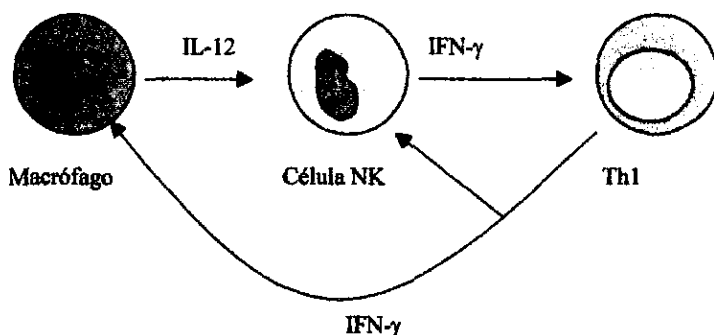


Figura 4. Esquema del circuito de inmunidad celular. El macrófago produce IL-12 al fagocitar al antígeno, la IL-12 va a funcionar como unión de los mecanismos de defensa inespecíficos con la inmunidad celular, primero actuando sobre las células NK aumentando su actividad, luego la célula NK libera IFN- $\gamma$ , el cual activa a los macrófagos y favorece que una célula Tho (linfocito T cooperador) se diferencie a Th1, el cual producirá IFN- $\gamma$  para activar al macrófago, creándose de esta manera un circuito de inmunidad celular (2).

Parece que la producción de INF- $\gamma$  tiene una función importante sobre las células NK durante la respuesta inmune temprana hacia células infectadas (2, 6). Como es sabido las células NK existen como células citotóxicas preactivadas capaces de realizar sus funciones efectoras sin la necesidad de una activación a priori o sensibilización. Estas características las hacen un componente muy importante en la inmunidad innata. Sin embargo la inmunidad innata, opera con una limitada especificidad y eficiencia y es generalmente seguida por una inmunidad adaptativa, la cual es mediada por una selección clonal y expansión de linfocitos específicos para el antígeno. De esta manera durante una respuesta celular citotóxica, la citotoxicidad mediada por las células NK es completada y reemplazada por otra forma de citotoxicidad medida por los linfocitos T. En un hospedero inmunocompetente normal, la elevada y prolongada respuesta de las células NK puede llevar al desarrollo de una reacción autoinmune, necesitando un mecanismo para limitar la actividad de NK. La existencia de un balance dinámico entre el sistema de células NK y linfocitos T CD8 es esencial. Por lo que se ha demostrado que las células NK son

requeridas para la inducción de linfocitos T citotóxicos. La IL-12 es producida primero en la respuesta al agente tumoral y esta a su vez induce la producción de INF- $\gamma$  primero por las células NK y después por los linfocitos T citotóxicos. Esta primera respuesta es importante para la activación del sistema de células fagocíticas como una primera línea de defensa, pero la IL-12 producida al inicio, es requerida para una óptima generación de células T CD4 y de linfocitos T citotóxicos. La IL-12 es además un factor coestimulador para la diferenciación de las células Th1 y es requerida para una proliferación y producción de INF- $\gamma$  óptima en respuesta al antígeno (86).

## **g) NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**

### **MÉDULA ÓSEA**

La médula ósea, es un tejido blando, que ocupa las cavidades de los huesos, encontrándose en dos formas, roja y amarilla, ocupa un 2 a 5 por ciento del peso en los adultos. La médula roja produce todas las células sanguíneas del cuerpo - glóbulos rojos, glóbulos blancos, y plaquetas a partir de un solo tipo de célula, llamada célula madre hematopoyética. Estimulada por hormonas y factores de crecimiento, esta célula madre se divide para producir células inmaduras, células sanguíneas progenitoras que rápidamente sufren una serie de divisiones celulares produciendo glóbulos rojos o glóbulos blancos. En un estado apropiado de desarrollo, las células nuevas se abren paso a través de las paredes de los capilares. Por el cual las células salen de la médula y entran al sistema circulatorio del organismo. Mientras que las células madre son relativamente escasas - cerca de 1 en 10,000 células de la médula - ellas típicamente producen los precursores de aproximadamente 2 millones de glóbulos rojos por segundo y  $2 \times 10^{12}$  plaquetas por día (87).

requeridas para la inducción de linfocitos T citotóxicos. La IL-12 es producida primero en la respuesta al agente tumoral y esta a su vez induce la producción de INF- $\gamma$  primero por las células NK y después por los linfocitos T citotóxicos. Esta primera respuesta es importante para la activación del sistema de células fagocíticas como una primera línea de defensa, pero la IL-12 producida al inicio, es requerida para una óptima generación de células T CD4 y de linfocitos T citotóxicos. La IL-12 es además un factor coestimulador para la diferenciación de las células Th1 y es requerida para una proliferación y producción de INF- $\gamma$  óptima en respuesta al antígeno (86).

### **g) NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**

#### **MÉDULA ÓSEA**

La médula ósea, es un tejido blando, que ocupa las cavidades de los huesos, encontrándose en dos formas, roja y amarilla, ocupa un 2 a 5 por ciento del peso en los adultos. La médula roja produce todas las células sanguíneas del cuerpo - glóbulos rojos, glóbulos blancos, y plaquetas a partir de un solo tipo de célula, llamada célula madre hematopoyética. Estimulada por hormonas y factores de crecimiento, esta célula madre se divide para producir células inmaduras, células sanguíneas progenitoras que rápidamente sufren una serie de divisiones celulares produciendo glóbulos rojos o glóbulos blancos. En un estado apropiado de desarrollo, las células nuevas se abren paso a través de las paredes de los capilares. Por el cual las células salen de la médula y entran al sistema circulatorio del organismo. Mientras que las células madre son relativamente escasas - cerca de 1 en 10,000 células de la médula - ellas típicamente producen los precursores de aproximadamente 2 millones de glóbulos rojos por segundo y  $2 \times 10^{12}$  plaquetas por día (87).

## ENFERMEDADES DE LA MÉDULA ÓSEA

Las enfermedades de la médula ósea pueden amenazar la vida debido a que interrumpen la producción de células sanguíneas. Una de esas enfermedades de M.O. es la leucemia. Acorde con la sociedad americana de cáncer, la leucemia es la sexta causa de muerte por cáncer entre hombres y la séptima causa de muerte entre las mujeres (87).

Cuadro 3. Incidencia de cáncer en Estados Unidos en el año de 1999.

| Sitio   | Nuevos casos |         |         | Muertes |        |         |
|---|--------------|---------|---------|---------|--------|---------|
|   | Mujer        | Hombre  | Total   | Mujer   | Hombre | Total   |
| Melanoma de piel                              | 18,400       | 26,600  | 44,200  | 2,700   | 4,600  | 7,300   |
| Pulmón, laringe y otros de vías respiratorias | 80,800       | 106,800 | 187,600 | 66,300  | 94,900 | 164,200 |
| Mama  | 175,000      | 1,300   | 176,300 | 43,300  | 400    | 43,700  |
| Colon, ano y recto                            | 68,900       | 63,600  | 132,700 | 29,100  | 28,000 | 57,100  |
| Vejiga y riñones                              | 28,100       | 58,400  | 86,500  | 8,900   | 15,600 | 24,500  |
| Leucemia                                      | 13,400       | 16,800  | 30,200  | 9,700   | 12,400 | 22,100  |
| Linfoma                                       | 27,600       | 36,400  | 64,000  | 12,900  | 14,100 | 27,000  |
| Ovario  | 26,200       | -       | 26,200  | 14,500  | -      | 14,500  |
| Útero   | 37,400       | -       | 37,400  | 6,400   | -      | 6,400   |
| Próstata                                      | -            | 179,300 | 179,300 | -       | 37,000 | 37,000  |

Las leucemias son cánceres que afectan la médula ósea [ así como otros tejidos]. Una célula tronco puede volverse cancerosa en cualquier estado durante la serie de divisiones que producen glóbulos blancos o glóbulos rojos. Si una célula progenitora se vuelve cancerosa al iniciar una serie de divisiones celulares, la leucemia es conocida como aguda. La leucemia crónica resulta cuando células en un estado tardío de división se vuelven maligna. Todo el tiempo, la médula se vuelve un conglomerado de células cancerosas, todas ellas descendientes de una primera célula anormal. Las células pueden además acumularse en los

nódulos linfáticos del paciente, bazo, y en otros sitios. En el momento del diagnóstico, cerca de un trillón de células leucémicas pueden estar presentes en el cuerpo.

La masa de células leucémicas en la médula suprime la producción de células sanguíneas sanas, surgiendo así los síntomas típicos de la leucemia, piel pálida, fatiga, falta de aliento lo que significa signos de anemia, una disminución en la cantidad de glóbulos rojos en la sangre. Hemorragias nasales, encías sangrantes, una tendencia a herirse fácilmente, y leves hemorragias en la piel en forma de puntos reflejan la disminución en la concentración de plaquetas en la sangre. Una carencia en la función de glóbulos blancos hace a los pacientes con leucemia propensos a las infecciones (87).

### **TIPOS DE LEUCEMIA**

Las leucemias se clasifican por dos características principales: el linaje de células sanguíneas que se volvió canceroso, y la velocidad a la que la enfermedad progresa. Además se dividen en mielóide si las células malignas tienen descendientes de los progenitores de glóbulos rojos, granulocitos, macrófagos, o plaquetas. Si las células leucémicas tienen descendientes de las células precursoras linfoides, la leucemia es referida como linfocítica (88).

Las leucemias mielocítica o linfocítica pueden ser agudas o crónicas, el término se refiere a la probabilidad de vida del paciente si la enfermedad continúa sin tratarse. La leucemia aguda se desarrolla rápidamente, y sin un pronto tratamiento, la supresión en la producción de células sanguíneas normales es tan severa que la muerte ocurre en semanas. En la leucemia crónica los pacientes pueden sobrevivir por varios años sin tratamiento debido a que los efectos de las células leucémicas en la estructura y función del desarrollo de la médula son más lentos y menos severos (88).

## **CAUSAS**

Una exposición a radiaciones intensas o moderada por largos períodos incrementa el riesgo de leucemia. La exposición a ciertos químicos como el benceno puede también causar leucemia. La quimioterapia empleada en el tratamiento de cáncer incrementan el riesgo de desarrollar leucemia mielocítica aguda. Los factores genéticos pueden además contribuir al desarrollo de la leucemia, algunas condiciones inherentes tales como el síndrome de Down, incrementan el riesgo en la persona para desarrollar leucemia (88).

## **DIAGNÓSTICO**

Las biopsias de médula ósea y las pruebas sanguíneas son las técnicas primarias usadas para el diagnóstico de la leucemia. La muestra de médula es examinada con un microscopio para observar la presencia de células leucémicas. Las pruebas de sangre monitorean el conteo de células sanguíneas - el número de células de diferentes tipos en la sangre - puede además revelar anomalías características de varios tipos de formas de leucemia. Algunas veces pruebas adicionales, tales como marcaje de las células con varias tinciones químicas para ayudar a examinar su apariencia, análisis de moléculas en la superficie de las células y el análisis del material genético celular, se realizan en las células leucémicas colectadas de la médula o sangre. Estas pruebas ayudan a determinar la subcategoría de la leucemia, lo cual, puede afectar el pronóstico del paciente y enfocar el tratamiento (88).

A) **MARCADORES INMUNOLÓGICOS:** la identificación de las células a través de sus características antigénicas, ha permitido en el estudio de las células hematopoyéticas: a) reconocer estirpes o células que difícilmente pueden clasificarse mediante métodos morfológicos y citoquímicos convencionales; b) establecer subgrupos inmunológicos en poblaciones celulares normales y en su contraparte leucémica, y c) definir poblaciones celulares con propiedades biológicas específicas. La selección apropiada de un grupo de anticuerpos monoclonales (AcMo) permite establecer el origen de la mayoría de las

leucemias, siendo de gran ayuda en aquellos casos en que los datos morfológicos y citoquímicos no son concluyentes (88).

**Cuadro 4. Clasificación inmunológica simplificada de las leucemias agudas.**

| Propósito           | LLA B        | LLA T      | LMA                  |
|---------------------|--------------|------------|----------------------|
| Definición de línea | CD79a / CD19 | CD3c / CD7 | CD13, CD33           |
| Maduración          | CD34         | CD34       | CD34 / CD15 / HLA DR |

LLA B = leucemia linfoblástica aguda B; LLA T = leucemia linfoblástica aguda T; LMA = leucemia mieloblástica aguda; CD = designación de grupo (cluster designation).

Muestra la manera simplificada de realizar la asignación del fenotipo de las leucemias agudas de acuerdo con la expresión de los antígenos.

**B) CITOGENÉTICA:** En muchos casos de leucemia se encuentran alteraciones cromosómicas, en la LMA ocurren en más de 50% de los enfermos. Se han encontrado algunas correlaciones entre las anomalías cromosómicas y el tipo de leucemia aguda. De las alteraciones únicas en LMA, LLA y LGC, pueden señalarse las del siguiente cuadro.

**Cuadro 5. Alteraciones cromosómicas y genes quiméricos en las leucemias.**

| Tipo de leucemia                                 | Alteración cromosómica                              | Gen quimérico    |
|--|---|------------------|
| LMA-MO (mieloblástica con mínima diferenciación) | Inv (3q26) y t(3,3)                                 | EVII             |
| LMA-M2 (mieloblástica con maduración)            | t(8;21) (q22.1; q22.3)                              | AML1 / ETO       |
| LMA-M3 (promielocítica)                          | t(15;17) (q22;q11.2)                                | PML / RAR – alfa |
| LMA-M4 (mielomonoblástica)                       | t (4:11) (q21:q23)                                  | EVII, MLL        |
| LMA-M5 (monocítica)                              | t(8;16)   | MLL, MOZ-CBP     |
| LLA, LGC   | t(9q+; 22q-) (q34.1; q11.2)<br>cromosoma Filadelfia | BCR/ABL          |

PML/RAR-alfa = leucemia promielocítica / ácido retinoico receptor alfa; AML1 / ETO = leucemia mieloide aguda / ocho veintiuno; BCR/ABL = (breakpoint cluster region / Abelson), MLL = mezcla de linajes leucémicos. Se han encontrado correlaciones entre las anomalías cromosómicas y el tipo de leucemia, las alteraciones más comúnmente encontradas son las mostradas en el cuadro.

La presencia de cualquiera de estas alteraciones genéticas en la leucemia aguda mieloide se asocia con mayor posibilidad de lograr la remisión y con supervivencia más prolongada (87, 88, 89).



Pruebas tales como rayos X y examen del fluido espinal para las células leucémicas pueden ayudar a determinar que tan lejos se ha diseminado la enfermedad (88).

## **TRATAMIENTO**

El tratamiento de la leucemia depende del tipo y de la extensión de la enfermedad y se diseña para cada paciente. En general, la quimioterapia es el apoyo principal del tratamiento tanto para las leucemias agudas como crónicas. Algunas veces la radiación se usa para disminuir la cantidad de células leucémicas que se acumulan en varias partes del cuerpo, tales como el revestimiento del cerebro y el cordón espinal en la leucemia linfocítica aguda, o dentro de los nódulos linfáticos en la leucemia linfocítica crónica. Particularmente en pacientes jóvenes, si la quimioterapia sola no tiene éxito o si el paciente recae después de la quimioterapia, la última opción sería un trasplante de células madre (88).

## **LINFOMA**

El linfoma es un grupo de cánceres que surgen en el sistema linfático. Existen varios tipos de linfoma dependiendo del tipo de célula que se vuelve cancerosa (88). Su frecuencia es elevada en la primera década de la vida, representando el 7.4% de todos los cánceres, disminuyendo progresivamente hasta llegar a ser de 3.7% en el grupo de 25 a 29 años, para posteriormente incrementar su frecuencia, alcanzando un pico máximo en el grupo de 60 a 64 años (9.9%); por otro lado, los linfomas ocupan el tercer lugar como causa de muerte.

## **CAUSAS**

El sistema linfático consiste de glóbulos blancos conocidos como linfocitos T y B, vasos linfáticos que representan tubos delgados que forman una red en el cuerpo a lo largo de los vasos sanguíneos; y cientos de nódulos linfáticos, que se encuentran en el tórax, abdomen, cuello, ingle y debajo de los brazos. El linfoma ocurre cuando por razones desconocidas un linfocito T o B se vuelve canceroso y comienza a crecer de una manera descontrolada, sus

descendientes se dispersan por todo el cuerpo invadiendo tejidos normales e interfieren con las funciones de los linfocitos sanos. Un tipo de linfoma de células B es el linfoma de Burkitt, el cual normalmente se dispersa a áreas fuera del sistema linfático, tales como M.O., sangre y sistema nervioso central. El síntoma más común del linfoma es un crecimiento ganglionar mayor a un centímetro, con una consistencia dura, que no se asocia a una infección aparente y que persiste por cuatro a seis semanas.

La gente tiene un riesgo incrementado de desarrollar linfoma si su sistema inmune está comprometido debido, por ejemplo, a una condición genética, a la infección con VIH o como resultado de tomar fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo de un órgano transplantado. Los factores industriales que potencialmente pueden asociarse con el desarrollo de linfoma no Hodgkin son : arsénico, clorofenoles, solventes orgánicos, plomo, cloruro de vinilo y asbestos (88).

## **DIAGNÓSTICO**

Para llevar a cabo el diagnóstico se realiza una biopsia, ya sea del ganglio linfático o del tejido afectado. La determinación del inmunofenotipo también es recomendable hacerla. Una vez establecido el diagnóstico, el siguiente paso es determinar la extensión de la enfermedad, para ello se incluyen estudios de laboratorio e imagen, como son citometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática y radiografías de tórax. Otro estudio que debe realizarse inicialmente , es una biopsia de hueso, ya que la infiltración a la médula ósea es muy frecuente (88).

## **TRATAMIENTO**

El tratamiento es diseñado para cada paciente ya que depende del tipo de linfoma, que tan rápido está creciendo y que tanto se ha diseminado, los linfomas que derivan de las células T son más difíciles de tratar que los linfomas de las células B, y los pacientes mayores de 60 años se curan en menor proporción que los pacientes jóvenes. El linfoma puede

fácilmente dispersarse a través del cuerpo, sin embargo en pacientes cuya enfermedad parece estar confinada a uno o pocos nódulos linfáticos, pueden tener células cancerosas en otra parte del cuerpo las cuales no son lo suficientemente evidentes para ser detectadas por las pruebas empleadas. Por esta razón, el tratamiento de elección es usualmente quimioterapia. La radioterapia es a veces dada después del curso de la quimioterapia para ayudar a prevenir la recaída (88).

## JUSTIFICACIÓN

Las leucemias y linfomas se caracterizan por la presencia de células neoplásicas, en el caso de leucemia estas se encuentran en M.O. y en linfoma se encuentran en ganglio linfático, sin embargo, la infiltración de células cancerosas a M.O. es muy frecuente, ya que en el 80% de los casos se encuentran diseminadas al momento del diagnóstico.

Se sabe que las células NK juegan un papel importante durante los procesos neoplásicos, ya que han sido definidas funcionalmente por su habilidad para lisar células tumorales mediante mecanismos de citotoxicidad.

Actualmente se carece de estudios sobre la presencia y fenotipo de las células NK en M.O. de pacientes con neoplasias hematológicas. Al detectar estas células en un proceso neoplásico que involucra M.O. haría importante identificar si estas células pertenecen a este compartimiento o si provienen de sangre periférica; lo cual es determinado mediante los antígenos CD56 y CD16; cuya expresión diferencial es indicativa del estado de madurez de estas células.

Por otra parte se han identificado alteraciones en su proceso de ontogenia presentándose un tipo de leucemia de células NK que ha demostrado tener anormalidades cromosomales. Esto daría indicios de que las células NK encontradas en un proceso neoplásico podrían también ser neoplásicas.

Por lo anterior en este trabajo se propuso determinar la presencia de células con fenotipo NK en M.O. de pacientes con neoplasias hematológicas, y mediante la identificación de su inmunofenotipo determinar su origen.

## **HIPÓTESIS**

En las neoplasias hematológicas el número de células NK en M.O. puede incrementarse debido a anomalías en los mecanismos que rigen la proliferación y/o diferenciación de los precursores de las células NK, lo que conduciría a una leucemia de células NK, o elevarse una vez que la respuesta inmune permite su migración de la circulación sistémica hacia sitios con infiltración tumoral.

## **OBJETIVOS**

Determinar la presencia de células con fenotipo NK en M.O. de pacientes con neoplasias hematológicas y testigos sanos.

Identificar otros marcadores linfoides y mieloides en M.O. de pacientes con neoplasias hematológicas y testigos, empleando anticuerpos monoclonales específicos.

Estudiar mediante citometría de flujo el fenotipo NK en M.O. que puede indicar si provienen de este mismo compartimiento o de circulación sistémica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **PACIENTES Y TESTIGOS**

Se estudiaron trece pacientes con neoplasias hematológicas captados del Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). De estos sujetos 6 fueron mujeres y 7 hombres. La edad de los pacientes osciló en el rango de 20 a 59 años teniendo una media de 40 años. En siete casos se realizó el diagnóstico de linfoma no Hodgkin (LNH), dos presentaron leucemia mieloide aguda M4 (LMA M4), uno leucemia linfoblástica aguda (LLA), y tres leucemia granulocítica crónica (LGC).

El examen de M.O. junto con el diferencial de sangre periférica confirmó el diagnóstico presuntivo.

Ninguno de los pacientes con leucemia y LNH habían recibido tratamiento al momento de la toma de muestra.

Ocho sujetos sanos del programa de trasplante de M.O. (4 mujeres y 4 hombres) fueron estudiados como testigos.

El protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética del INCAN e INER y se solicitó el consentimiento informando a todos los pacientes que participaron en la investigación (90).

### **OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

La obtención de la M.O. se realizó mediante punción de cresta iliaca, en la cual se empleó un trocar para punción. Con un movimiento circular, como taladro, se procedió a profundizar hasta alcanzar la M.O. Posteriormente se removió el mandril, y se uso una jeringa estéril previamente preparada con heparina (1 U/ml). Para aspirar la médula se extrajo el émbolo en forma rápida y vigorosa. Una vez obtenida la muestra, (8 a 10 ml), se colocó en condiciones de esterilidad en un tubo de polipropileno nuevo de 50 ml (NUNC).

## **PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA**

La muestra de M.O. fue colocada en un tubo cónico estéril y se centrifugó a 400x g por 5 minutos a 4°C para separar el sobrenadante. Este se colocó en un tubo de propileno nuevo y estéril, almacenando una alícuota para posteriores pruebas en otros protocolos que no se mencionan en esta tesis.

El botón celular se lavó con amortiguador de fosfatos salino conteniendo albúmina (PBS-albúmina, ver anexo 1), posteriormente se adicionaron 10 ml de solución hipotónica de cloruro de amonio 7.5 M para llevar a cabo la lisis de eritrocitos; agitando en el vórtex y dejando reposar 10 min. en cama de hielo.

Una vez transcurrido el tiempo la muestra se centrifugó a 400x g 5 min. a 4°C y el botón celular se lavó con PBS-albúmina. La muestra obtenida se resuspendió en el volumen inicial empleando PBS.

El conteo celular se realizó empleando una cámara de Neubauer, utilizando un colorante supravital (azul tripano al 0.02%, SIGMA) y se procedió a hacer la cuenta en los cuadrantes para glóbulos blancos; el resultado obtenido se multiplicó por el factor de la dilución para calcular el número de células por ml.

## **ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

### **MARCAJE DE LAS CÉLULAS**

Para realizar la citometría de flujo se emplearon tubos de 12 x 75 mm. En cada tubo se colocaron  $1 \times 10^6$  células, las cuales se marcaron mediante un procedimiento directo con los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados con ficoeritrina (RPE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC): CD 45- FITC, CD34- FITC, CD2- FITC, CD-14 RPE, CD33- RPE, CD16-FITC, CD5- FITC, CD3- FITC, CD56- RPE, CD-19 RPE.

Por cada  $1 \times 10^6$  células se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de anticuerpo monoclonal (DAKO). El volumen final de las células se llevó a 100  $\mu\text{l}$  con PBS-albúmina, se homogenizó en vórtex y se incubó 45 min. en hielo, protegidas de la luz.

Una vez transcurrido el tiempo se procedió a lavar las células 2 veces con PBS y se centrifugaron a 400x g 5 min. a 4°C, desechando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de PBS, se homogenizaron en el vórtex y se procedió a trabajar en el citómetro (FACSCalibur Becton Dickinson).

### **CALIBRACIÓN DEL CITÓMETRO**

Una vez que se tuvieron los cuidados necesarios en el procesamiento y marcaje de la muestra se procedió a calibrar el instrumento.

Lo anterior se realizó empleando partículas plásticas incorporadas a tinciones fluorescentes, lo que permitió la alineación del sistema óptico. Estas partículas tienen propiedades de dispersión de la luz y de fluorescencia semejantes a los especímenes biológicos, sin embargo siempre fue necesario ajustar finamente los parámetros del instrumento antes de analizar las muestras empleando un control con células de M.O. sin marca.

### **ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

Para proceder a realizar la lectura en el citómetro de flujo, se fijó en el eje "X" del citograma el tamaño (FSC) y en el eje "Y" la granularidad o complejidad interna (SSC).

El porcentaje de CD56 y de los demás marcadores se obtuvieron creando citogramas de doble fluorescencia, para lo cual se empleó el método de doble marcaje para detectar las diferentes subpoblaciones celulares en M.O. Los datos de cada una de las muestras de los pacientes fueron adquiridos a una velocidad de 12  $\mu\text{l}/\text{seg}$  (LOW) adquiriéndose 10,000 células. Los datos se archivaron para su posterior análisis.

Para proceder al análisis de los datos se examinó el histograma de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC) para determinar la adecuada separación de las poblaciones celulares.



## REPORTE DE RESULTADOS

Los datos se reportaron como el porcentaje de células positivas para cada marcador específico. Esto se realizó visualizando el gráfico de FL1 contra FL2 donde la fluorescencia verde (FITC) se encuentra en el eje de las X y la fluorescencia roja (RPE) en el eje de las Y, dicho diagrama se dividió en cuatro cuadrantes.

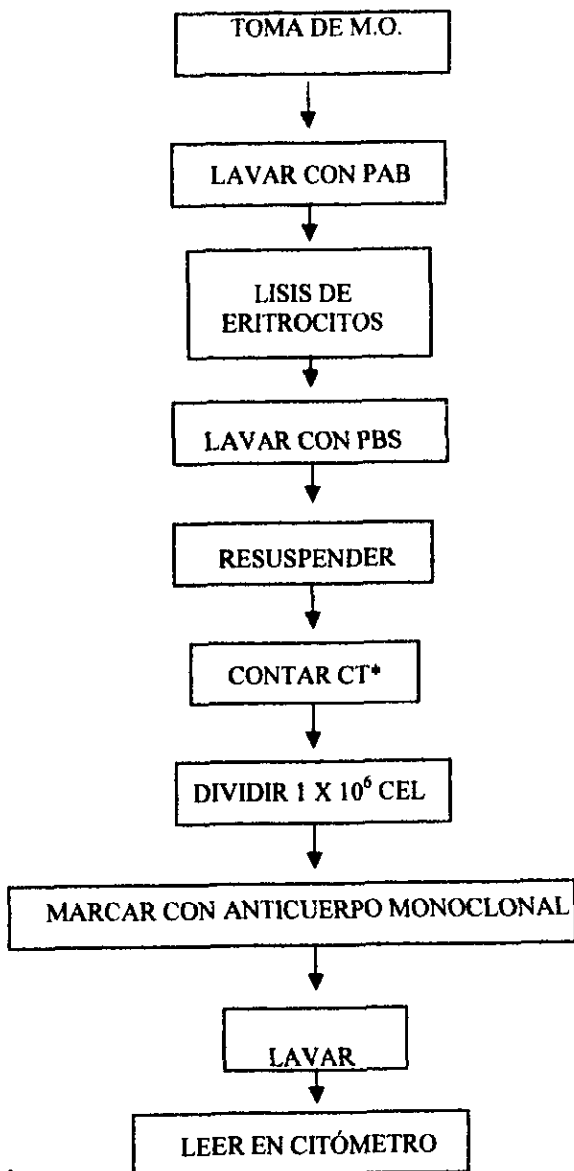
En el cuadrante izquierdo superior se analizaron las células con fluorescencia roja y en el cuadrante derecho superior las células con doble marca. En el cuadrante izquierdo inferior se estudiaron las células sin marca, y en el derecho inferior las células con marca verde. A partir de dichos cuadrante se calcularon los porcentajes y números de eventos con respecto a las células analizadas. Por otra parte, al contar con cifras confiables en cuanto a la cantidad de células totales/ $\mu\text{l}$  detectadas mediante la cámara de Neubauer, se aplicó también el análisis de las subpoblaciones siguiendo el protocolo de Milán, reportando las poblaciones en células/ $\mu\text{l}$ . Esto se efectuó multiplicando su frecuencia (número de células positivas/ número de leucocitos analizados) por el conteo de leucocitos realizado en la cámara de Neubauer (91).

Otra alternativa de reporte fue evaluar el porcentaje de células respecto a la población CD45. Para ello, se localizaron las células marcadas con CD45 FITC / CD14 PE, se abrió una ventana en el diagrama de FL1 contra FL2 para localizar a las células CD45<sup>+</sup>.

Posteriormente esta población se localizó con otra ventana en el diagrama de tamaño contra granularidad, lo cual nos permitió determinar los marcadores expresados por estas poblaciones al analizar los diagramas de FL1 contra FL2 de los diferentes marcadores estudiados. Este análisis se realizó sólo en aquellos casos en los cuales se logró definir la población CD45 en el diagrama de FL1 contra FL2.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de cada subpoblación fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar y las comparaciones entre los grupos de estudio se realizaron empleando la prueba estadística no paramétrica U-Mann Whitney (92). El nivel de significación empleado fue de  $\alpha = 0.05$ . El diagrama de flujo del trabajo en general se muestra en la figura 1.



\*CT células totales.

FIGURA 6. Diagrama de flujo de la metodología seguida para llevar a cabo esta investigación.

## RESULTADOS

La evaluación de las posibles diferencias fenotípicas entre las células de M.O. de los pacientes con neoplasias hematológicas y los testigos se realizó mediante citometría de flujo.

### *a) Diferencias fenotípicas en los pacientes con neoplasias y testigos.*

Los resultados mostraron que al analizar el grupo total de pacientes, de los cuales siete presentaron el diagnóstico de LNH y seis de leucemia, se encontró que existieron diferencias significativas en el número absoluto de los marcadores CD34/33, CD45, CD19, CD5/19, CD56, CD2/56 al compararse con los testigos (Cuadro 7). El análisis respecto al porcentaje de células no mostró diferencias estadísticamente significativas para ningún marcador. La expresión de CD34 se halló elevada en tres pacientes con LGC y en uno con LNH, dos de los pacientes con LGC presentaron a su vez una elevada expresión de CD3 y CD19.

CUADRO 7. Subpoblaciones (células/ $\mu$ L) de M.O. en pacientes con neoplasias hematológicas con valores significativos.

| MARCADORES | PACIENTES N=13<br>(media $\pm$ D.E.) | CONTROLES N=7<br>(media $\pm$ D.E.) | VALOR DE P * |
|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| CD34/33    | 2340.91 $\pm$ 2627.24                | 98.48 $\pm$ 73.43                   | 0.023        |
| CD45       | 20097.75 $\pm$ 20596.6               | 912.02 $\pm$ 777.48                 | 0.015        |
| CD19       | 6589.02 $\pm$ 13038.32               | 89.54 $\pm$ 127.65                  | 0.019        |
| CD5/19     | 1229.35 $\pm$ 1914.54                | 43.98 $\pm$ 34.68                   | 0.0038       |
| CD56       | 682.71 $\pm$ 926.56                  | 23.31 $\pm$ 16.46                   | 0.015        |
| CD2/56     | 480.95 $\pm$ 525.99                  | 41.97 $\pm$ 38.18                   | 0.029        |

\* Prueba de U- Mann Whitney

### *b) Diferencias fenotípicas en los pacientes con leucemia y testigos.*

Para analizar las poblaciones celulares de M.O. que distinguen a las diferentes neoplasias, se comparó por separado al grupo de pacientes leucémicos y de linfoma con los testigos.

Los pacientes con leucemia presentaron una elevación significativa de los porcentajes de

los siguientes marcadores: CD33, CD45 y CD19 y los números absolutos de los marcadores CD33, CD34/33, CD45, CD5/19, CD19 y CD56 también se incrementaron significativamente (Cuadros 8 y 9).

CUADRO 8. Marcadores con valores significativos de poblaciones analizadas en porcentajes en M.O. de pacientes con leucemia.

| MARCADORES | PACIENTES N=6<br>(media ± D.E.) | CONTROLES N= 7<br>(media ± D.E.) | VALOR DE P * |
|------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|
| CD33       | 29.86 ± 31.03                   | 14.19 ± 22.91                    | 0.0406       |
| CD19       | 35.11 ± 33.53                   | 2.94 ± 2.66                      | 0.0100       |
| CD45       | 68.62 ± 30.79                   | 23.82 ± 18.34                    | 0.0213       |

\*Prueba de U-Mann Whitney.

CUADRO 9. Marcadores significativos expresados en células/ $\mu$ L en pacientes con leucemia.

| MARCADORES | PACIENTES N= 6<br>(media ± D.E.) | CONTROLES N= 7<br>(media ± D.E.) | VALOR DE P * |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| CD33       | 24979.8 ± 25179.65               | 274.47 ± 360.48                  | 0.037        |
| CD34/33    | 2624.1 ± 1817.77                 | 81.55 ± 63.79                    | 0.025        |
| CD45       | 30127.43 ± 24794.22              | 913.80 ± 851.66                  | 0.017        |
| CD19       | 14025.12 ± 16885.63              | 70.06 ± 133.65                   | 0.011        |
| CD5/19     | 2583.01 ± 2130.82                | 39.60 ± 35.80                    | 0.025        |
| CD56       | 684.57 ± 1113.94                 | 30.06 ± 16.6                     | 0.025        |

\*Prueba de U-Mann Whitney.

*c) Diferencias fenotípicas en los pacientes con linfoma y testigos.*

En cuanto a los pacientes con LNH, los números absolutos de CD5/19 se vieron significativamente incrementados con respecto a los testigos ( $P = 0.04$ ), encontrándose que ningún otro marcador era significativo. En cuanto a porcentajes no se encontró ningún marcador significativamente elevado con respecto a los testigos.

d) Expresión del marcador CD56 en las diferentes poblaciones.

Al estudiarse el marcador CD56 expresado en porcentajes no se observaron diferencias significativas al realizar el análisis comparativo entre los pacientes con neoplasias y los testigos sanos, sin embargo al realizar el análisis en números absolutos se encontró una elevación significativa de CD56 en los pacientes con neoplasias, es decir incluyendo a todos los pacientes con leucemia junto con todos los pacientes con linfoma ( $P= 0.015$ ) (Figura 10).

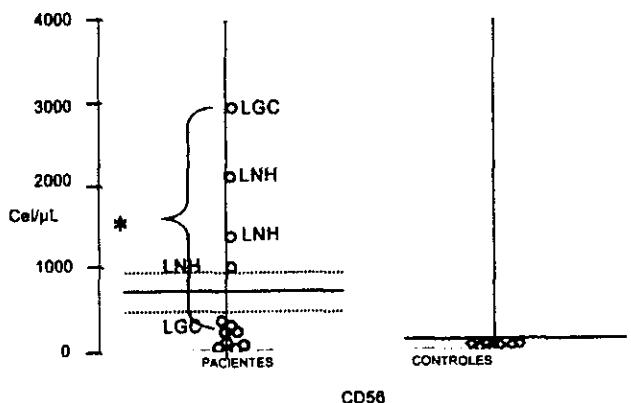


Figura 10. Expresión del marcador CD56 en números absolutos en M.O. de pacientes con neoplasias hematológicas. LGC: leucemia granulocítica crónica, LNH: linfoma No Hodgkin. Las líneas horizontales representan la media ( — )  $\pm$  E.E. ( - - - ) en cada grupo, \* representa los pacientes con valores significativos ( $P=0.015$ ).

En cuanto a la coexpresión de CD56 con los marcadores CD2, CD3 y CD16 no hubo diferencias significativas entre los pacientes y testigos en cuanto a porcentajes, sin embargo, al analizar los datos en números absolutos se encontró que el marcador CD2/56 presentó una elevación significativa entre los grupos de estudio ( $P= 0.029$ ) (Fig. 11).

El marcador CD56 expresado en números absolutos se encontró también elevado al compararse los pacientes con leucemia con los testigos, no siendo así en los pacientes con linfoma.

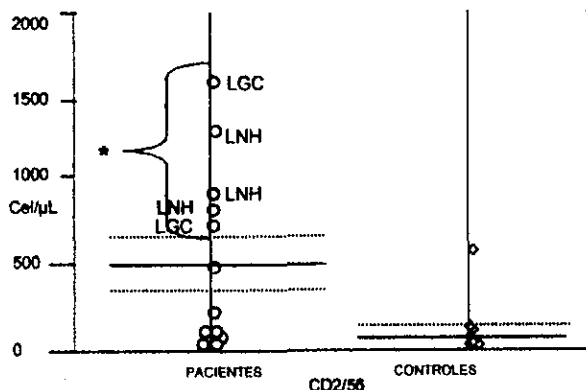


Figura 11. Determinación de la subpoblación CD2/CD56 en pacientes y testigos en células totales. LGC: leucemia granulocítica crónica, LNH: linfoma No Hodgkin las líneas horizontales representan la media (——)  $\pm$  E.E. (-----) en cada grupo, \* pacientes con valores significativos ( $P=0.029$ ).

*e) Diferencias fenotípicas en los pacientes con leucemia y linfoma.*

Al llevarse a cabo la comparación entre pacientes leucémicos y de linfoma se encontró que existieron diferencias significativas en los porcentajes de los siguientes marcadores: CD14, CD45 y CD19 (Cuadro 12).

CUADRO 12. Comparación de subpoblaciones (porcentajes) en M.O. entre pacientes con leucemia y linfoma.

| MARCADORES | LEUCEMIAS N= 6<br>(media $\pm$ D.E.) | LINFOMAS N= 7<br>(media $\pm$ D.E.) | VALOR DE P * |
|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| CD14       | 15.58 $\pm$ 12.91                    | 4.14 $\pm$ 3.91                     | 0.0296       |
| CD45       | 68.62 $\pm$ 30.79                    | 43.95 $\pm$ 25.58                   | 0.0406       |
| CD19       | 35.11 $\pm$ 33.53                    | 2.45 $\pm$ 1.47                     | 0.0100       |

\*Prueba de U-Mann Whitney

f) Estudio de la población CD56 con respecto al marcador CD45.

El análisis de las poblaciones CD56 con base al marcador CD45 se realizó en los tres casos con LGC y dos con LNH, ambos grupos con porcentajes elevados de CD56 (superiores a la media + 1E.E) y en células/μl. Al comparar las cifras de CD56 respecto a los cuatro testigos accesibles a dicho estudio se encontró que los pacientes con LGC presentaron incremento de las células CD56 expresado como células/μl respecto a los testigos sanos (P= 0.03) y también respecto a estos últimos y al grupo con LNH (P=0.02).

Otras diferencias en cuanto a la expresión de las subpoblaciones CD56 fueron el incremento del número absoluto de los marcadores CD2/56 (P= 0.03), CD3/56 (P= 0.03) y CD16/56 (P= 0.04) en los enfermos con LGC (cuadro 13). En la figura 14 se muestran los citogramas representativos que muestran la elevación de células CD56 en los pacientes respecto a los testigos sanos.

CUADRO 13. Porcentajes y cifras totales de la relación de las subpoblaciones CD56/CD45.

| CASOS   | CD56 % | CD56 Cél/μl | CD2/56 % | CD2/56 Cél/μl | CD3/56 % | CD3/56 Cél/μl | CD16/56 % | CD16/56 Cél/μl |
|---------|--------|-------------|----------|---------------|----------|---------------|-----------|----------------|
| 1 (LNH) | 2      | 234         | 0        | 0             | 0.8      | 94            | 0.6       | 78             |
| 2 (LNH) | 9.1    | 428         | 2.9      | 111           | 3.4      | 124           | 4.1       | 133            |
| 3 (LGC) | 89.8   | 58752*      | 12.6     | 8277**        | 12       | 7851***       | 68.2      | 44601****      |
| 4 (LGC) | 13.4   | 11201*      | 7.1      | 5937**        | 17.6     | 14649***      | 7.65      | 6349****       |
| 5 (LGC) | 14.1   | 5490*       | 8.5      | 3317**        | 17.5     | 6809***       | 12        | 4656****       |
| 6 (CN)  | 3.5    | 255         | 0        | 0             | 2.9      | 212           | ND        | ND             |
| 7 (CN)  | 4.3    | 69          | 1.8      | 29            | 1.4      | 23            | 6.1       | 97             |
| 8 (CN)  | 5.9    | 58          | 1.1      | 10            | 1.7      | 16.8          | 2.6       | 25             |
| 9 (CN)  | 19.8   | 515         | 14.7     | 380           | 21.6     | 561           | 17.74     | 460            |

\*P= 0.03, \*\*P= 0.03, \*\*\*P= 0.03, \*\*\*\* P= 0.04. Prueba de U de Mann Whitney. CN control normal. LNH linfoma No Hodgkin, LGC leucemia granulocítica crónica. ND no determinado.



A continuación se muestra un histograma típico de un paciente con LGC comparado con un control, el histograma de un paciente con linfoma no se incluye debido a que su comportamiento es muy parecido al de los controles. El citograma se obtuvo al hacer una ventana en las poblaciones CD45+ y después se llevo a cabo el análisis de las poblaciones CD56+.

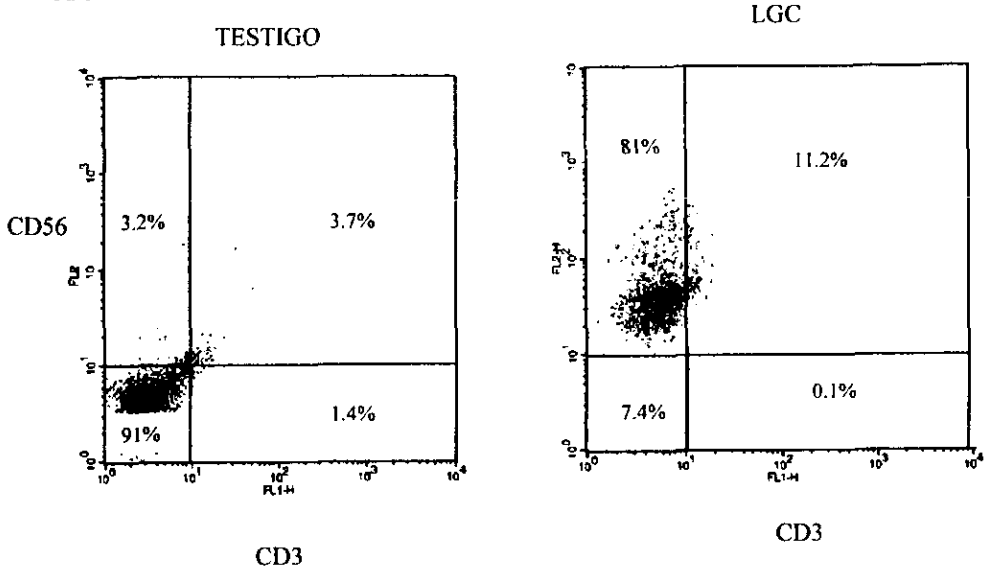


Fig. 14. Diagrama de un análisis por citometría de flujo a partir de una ventana de células CD45+ de un caso representativo de elevación de células CD56+. Se muestra la expresión de células CD56<sup>+</sup> marcadas con PE (eje FL2) en M.O. de testigos sanos (izquierda) y en un caso representativo (derecha).

En este citograma de doble fluorescencia: FL1 es el eje en el que se detecta la fluorescencia verde (CD3), FL2: el eje en el que se detecta la fluorescencia roja (CD56). Cada punto representa un evento registrado por el citometro de flujo. Las líneas horizontales y verticales delimitan los cuadrantes: fluorescencia roja (cuadrante izq/sup), dobles positivas (cuadrante der/sup), dobles negativas (cuadrante izq/inf), fluorescencia verde (cuadrante der/inf).

## DISCUSIÓN

La investigación realizada en esta tesis demuestra una elevación de células NK en M.O. de pacientes con neoplasias hematológicas sin tratamiento previo. Esto se apoya en la presencia de células con el fenotipo CD3- CD56+. Esta elevación de células NK se apreció en el grupo total de pacientes con neoplasias hematológicas; en especial en los pacientes con LGC, no siendo así en los pacientes con linfoma. Esto lo podemos atribuir a los sitios que involucra cada tipo de neoplasia, ya que la leucemia afecta a M.O. y el linfoma compromete principalmente ganglio linfático (93). Sin embargo el estudio se efectuó en M.O. ya que en este sitio se encuentra la producción de células sanguíneas y es el sitio en el que se encuentran las células neoplásicas en los pacientes con leucemia y linfoma, en estos últimos cuando hay infiltración a M.O. La elevación en especial en los pacientes con LGC pudo ser debido a que prácticamente todas las células hematopoyéticas proliferan en este proceso neoplásico, si bien predomina la serie granulocítica (88). Por lo tanto la elevación podría deberse a que sean células infiltradas y la otra que se trate de células que tienen un proceso descontrolado de proliferación.

Además se detectó una elevación significativa en las células CD2+ CD16- CD3- CD56+, la cual caracteriza a una población inmadura de células NK que podría ser propia de M.O. Esto ha sido mencionado en un artículo publicado por Lanier (94) en el cual se llevó a cabo el estudio en la expresión de los marcadores CD16 y CD56 en células NK de sangre periférica. Ellos encontraron tres distintas subclases de poblaciones: a) CD3-, CD16+, CD56+, b) CD3+, CD16-, CD56+, c) CD3-, CD16-, CD56+ <sup>brillante</sup>. Las dos primeras poblaciones mediaron la citotoxicidad y demostraron una morfología de linfocitos granulares grandes. Además encontraron que las células NK que predominan en sangre periférica poseen el fenotipo CD3- CD16+ y más del 90% de ellas coexpresan el antígeno CD56. La última población incluyó tanto a linfocitos granulares como agranulares. En base

a esto propone que las células NK CD16- CD56+ que presentan la morfología de linfocitos agranulares grandes son las más inmaduras, ya que conforma las células NK van madurando se vuelven cada vez más granulares (94). Posteriormente Lewis (95) en un estudio comparativo de células NK CD16+ y CD16-, propone que las células NK CD16+ representan la subclase más madura, ya que ellas son las más abundantes de sangre periférica, además de tener baja capacidad de proliferación en respuesta a las linfocinas; en cambio la población CD16- demuestran más capacidad de proliferación. También menciona que la mayoría de células NK encontradas en bazo y M.O. son de la subclase CD16-, consistentes con la noción de que estas son vías tempranas en la maduración de células NK. Por lo tanto, las células encontradas en esta investigación con el fenotipo CD2+ CD56+ CD16- CD3- podrían ser células NK propias de M.O (95). Sin embargo, ya ha sido reportada la presencia de células con fenotipo de NK en pacientes con leucemia. En uno de esos reportes se identifica y caracteriza una forma previamente no reconocida de leucemia aguda en muestras de sangre periférica y de M.O. que expresaban características tanto de antígenos de células NK como de antígenos mieloides (96). Esos casos tuvieron el inmunofenotipo CD34+/-, CD33+, CD56+, CD16-; confirmando la coexpresión del antígeno mielóide (CD33) y del antígeno asociado a células NK (CD56) mediante citometría de flujo. Esa investigación apoyaría que las células NK son de origen mielóide debido a la expresión del antígeno CD33. De estos casos de leucemia aguda pueden surgir de una transformación en una célula precursora común con los linajes mieloides y de células NK (96).

En este trabajo también se encontró un aumento de células NK y una elevación en la expresión de antígenos mieloides (CD34/33, CD33). Lo que sugeriría que las células CD16- CD56+ también son las que expresan el antígeno CD33; por lo que podrían provenir de un precursor de origen mielóide. Esto se apoya por las investigaciones realizadas por

Shibuya en 1995 (97), donde propone un modelo de diferenciación de células NK. El realiza un estudio en M.O. de adultos, en el cual las células NK derivaron de un linaje con fenotipo CD34+, CD33+, entre las cuales un gran número de unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos estaban presentes. Sus resultados pueden sugerir que las células NK humanas adultas están estrechamente relacionadas al linaje mielóide. Sin embargo, debido a la baja frecuencia de progenitores de NK en el linaje de células CD34+, CD33+, es posible que este compartimiento incluya por separado a los progenitores mieloides y de células NK (97).

Por otra parte, además de los cambios en las células NK, en este estudio se pudo observar que al comparar los pacientes con neoplasias hematológicas en conjunto con los testigos, se encontraron alteraciones en los números absolutos de los marcadores CD34/33, CD45, CD19 y CD5/19. El antígeno CD45 nos habla en general de una elevación de leucocitos sin especificar el linaje, ya que es común a todos los leucocitos (98). La elevación en cuanto al marcador CD34/33, quiere decir que se encontraron alteraciones en las poblaciones de células progenitoras mieloides (GFU-GEMM) que dan origen a la unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos; este anticuerpo también se emplea para detectar leucemias mieloides agudas y crónicas en fase blástica (99). La elevación en el marcador CD5/19 señala una elevación en los linfocitos B, esta combinación de anticuerpos se emplea para detectar leucemias de células B (100).

Finalmente para confirmar la elevación de células NK en pacientes con LGC; se empleó el marcador CD45 que permitió detectar dos poblaciones que no se habían podido determinar por el método anterior, estas poblaciones fueron: CD2+, CD16+, CD56+ y CD3+, CD56+. De las cuales por el fenotipo que expresaron se podría suponer que las primeras fueron células NK que al expresar el CD16 serían células maduras, las cuales se encuentran abundantemente en sangre periférica, por lo que pueden ser células infiltradas que migraron

al sitio de invasión tumoral; y que las células que expresaron CD3 eran linfocitos T. La elección del marcador CD45 tuvo como base el empleo del antígeno común de leucocitos en combinación con marcadores específicos, lo que permitió llevar a cabo una buena discriminación entre la población de blastos y células normales (101). La discriminación de las células precursoras en M.O. así como las células leucémicas se basó en que expresan valores bajos e intermedios del marcador CD45, en comparación con los monocitos y linfocitos que expresan altos niveles de CD45, lo cual fue útil en nuestro estudio. Porque los eritrocitos y plaquetas que pudieron interferir con los resultados de citometría, no expresan CD45 (102), mientras que los linfocitos T maduros (CD3+) y las células NK (CD16+) expresan el CD45 en alta intensidad (103).

Por otra parte, es conveniente aplicar el estudio a grupos específicos de leucemia, en especial a pacientes con LGC para confirmar los cambios en CD56 o en subpoblaciones mediante el empleo de la citometría de flujo. El universo de estudio que estuvo constituido por trece pacientes totales, dentro de los cuales siete presentaban el diagnóstico de linfoma no Hodgkin, y seis el diagnóstico de leucemia, trajo algunos problemas consigo. El diagnóstico no se pudo realizar de manera rápida, es decir la toma de muestra se tenía que decidir en el momento en el que el paciente llegaba y se sospechaba que padecía leucemia o linfoma no Hodgkin. La muestra se tomaba pero en ocasiones resultaba que el diagnóstico no era ninguno de estos dos, por lo tanto muchas de las muestras tomadas se tuvieron que descartar para esta investigación, y los pacientes que quedaron presentaron una heterogeneidad en cuanto a su diagnóstico, es decir uno presentaban LAM, otros LAL y otros LGC. El tiempo para recolectar las muestras fue casi de un año y aunque lo ideal habría sido tomar solo un tipo de leucemia y compararlos con los controles, se decidió realizar el trabajo con ese número limitado de casos, ya que de lo contrario se extendería demasiado el estudio. Por lo tanto, es recomendable ampliar el universo de estudio para

obtener resultados que pudieran darnos un mayor soporte en cuanto a la cuantificación de células NK y así disminuir la dispersión de los datos la cual se ve reflejada en una gran desviación estándar. Sin embargo estos pacientes fueron suficientes para detectar diferencias significativas, fundamentalmente en los marcadores que nos permitieron detectar la presencia de células NK en M.O. de pacientes con neoplasias hematológica, pero sí es necesario aumentar el universo de estudio para corroborar y hacer más fidedignos los datos obtenidos.

Un punto importante en esta investigación fue el significado de las diferencias en números absolutos, es decir, células por microlitro, y no en porcentajes. Estas diferencias se encontraron básicamente en pacientes con leucemias. Esto se debe a que el cálculo para obtener el número absoluto de los marcadores involucra el conteo de leucocitos totales llevado a cabo en el laboratorio. Esto significa que los datos en porcentaje solamente involucran las células que el citómetro adquirió, sin tomar en cuenta los cambios en el número absoluto de células que puede variar de paciente a paciente, así como el tipo de diagnóstico que el paciente presenta y en este caso en diferentes muestras de M.O. Si los pacientes con leucemia tienen un elevado conteo de leucocitos, comparado con los testigos, y se toma en cuenta este conteo, nos va a dar el número real de células que este paciente presenta circulando en el organismo. Por lo tanto los números expresados en porcentajes no involucran el estado patológico del paciente en cuanto al conteo de leucocitos totales, solo nos da una proporción en cuanto al número de células que son positivas para determinado marcador.

El considerar que un pacientes presenta altos números es porque presenta una diferencia significativa con respecto a los controles, si se habla de una proporción normal es porque entre los pacientes y controles no hay diferencias significativas, por lo tanto su distribución en cuanto al marcador cuantificado es muy similar al de los controles.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se apreció una elevación de células CD56+ en el grupo total de pacientes con neoplasias hematológicas, en especial en los pacientes con LGC, lo que significó una elevación de células NK en M.O. La presencia del fenotipo CD2+CD16-CD56+ denotó la presencia de una población inmadura que podría ser propia de M.O. Sin embargo, mediante el empleo del CD45 se detectó una población con fenotipo CD2+CD16+ CD56+ la cual se ha señalado como una población madura, por lo tanto en un proceso neoplásico en el cual se afecta M.O. se pueden apreciar tanto poblaciones en proceso de maduración así como células maduras las cuales infiltraron de sangre periférica hacia el sitio donde las células neoplásicas se encuentran para llevar a cabo sus mecanismo de citotoxicidad.

Otro aspecto importante es que durante un proceso neoplásico es posible detectar elevaciones en otros marcadores tanto de linajes mieloides como de linajes linfoides.

Además la citometría permitió aplicar diferentes métodos de análisis, de los cuales los más útiles fueron la determinación de cifras absolutas y la relación NK/CD45.

Finalmente es conveniente aplicar el estudio a grupos específicos de leucemia en especial a pacientes con LGC para confirmar los cambios en CD56 o en subpoblaciones mediante el empleo de la citometría de flujo.

# **ANEXO**



## ANEXO 1. PREPARACION DE REACTIVOS

### Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 1 X

Para preparar 1 litro:

0.2 g KCl

0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8 g NaCl

2.64 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Ajustar el pH a 7.35

### Amortiguador de fosfatos salino complementado con albúmina (PAB) 1X

Para preparar 1 litro:

0.2 g KCl

0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

8 g NaCl

2.64 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Ajustar el pH a 7.35

Añadir 5g de albúmina sérica bovina y aforar a 1 litro con agua destilada estéril.

### Solución de lisis de cloruro de amonio 7.5 M

Para preparar 100 ml:

0.828g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

0.1g  $\text{NaHCO}_3$

0.0037g EDTA TRISODICO

Ajustar a pH 7.4

Azul tripano 0.02%

Se prepara a partir del producto comercial (SIGMA) que se encuentra al 0.4% y se diluye con PBS.

## ANEXO 2. FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría permite determinar las características físicas y químicas de las células en forma individual cuando pasan a través de un haz luminoso, emitiendo una señal que es detectada por uno o más sensores ópticos. La instrumentación de la citometría de flujo permite la medición cuantitativa de diversos parámetros celulares particularmente tamaño, granulación y su fenotipo cuando se emplea un marcaje específico.

### a) Instrumentación de la citometría de flujo

La medición de las características celulares se realiza cuando estas pasan a través de un rayo láser. Al pasar la célula a través del rayo láser esta refleja y refracta la luz, lo cual da información acerca del tamaño y granularidad celular. Muchas de las mediciones se basan en las características de fluorescencia, donde las células son marcadas con uno o más marcadores específicos unidos a fluorocromos. Los fluorocromos al pasar a través del rayo láser son excitados, lo que provoca la emisión de una fluorescencia secundaria a múltiples longitudes de onda dependiendo del tipo de fluorocromo. La fluorescencia secundaria es colectada por varios detectores, lo que permite al aparato determinar si la fluorescencia emitida es más alta que la fluorescencia de la muestra sin fluorocromo.

Para realizar estas mediciones un citómetro de flujo debe estar compuesto por un sistema de transporte del fluido, una cámara de flujo, una región de medición, una fuente de excitación y sistema óptico con detectores y colectores, así como por un procesador electrónico de la señal y un sistema para mostrar, almacenar y analizar los datos (figura 15) (104, 105).

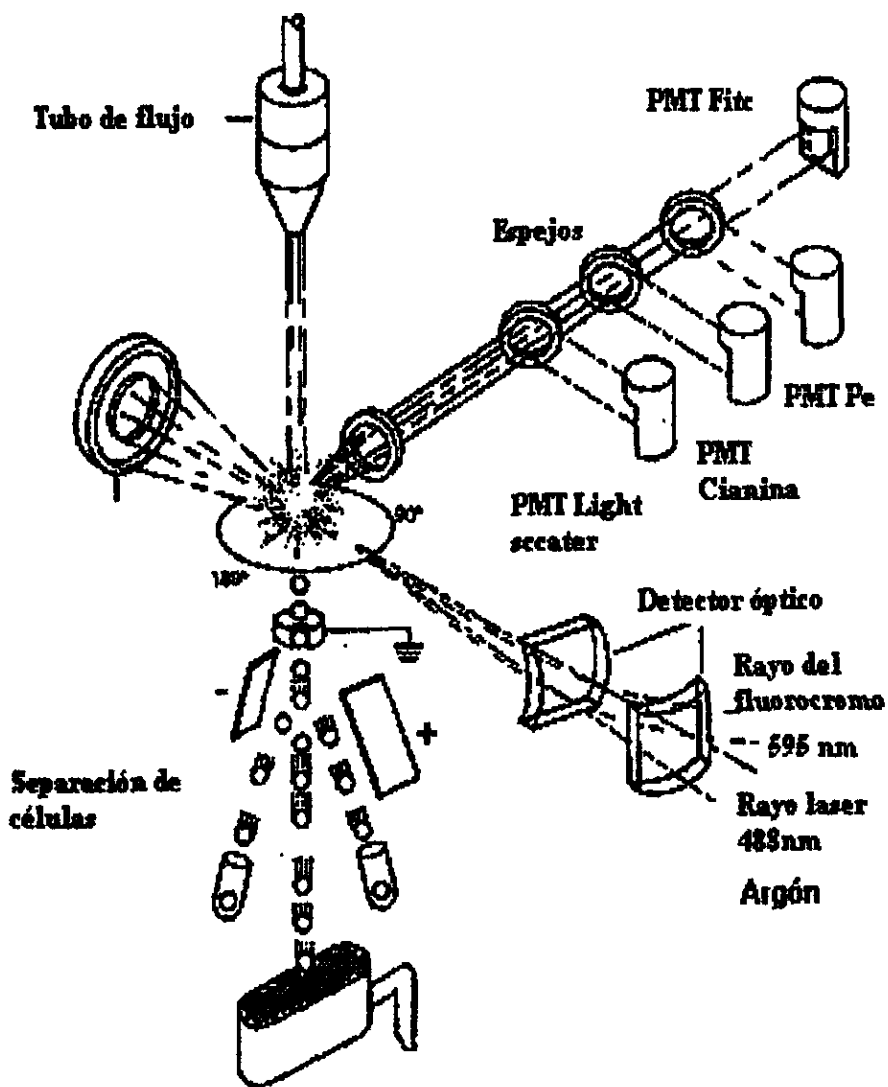


Fig 15. Esquema general de los componentes de un citometro de flujo

a) Sistema de transporte del fluido y cámara de flujo.

El sistema de transporte del fluido permite a las células en suspensión ser presurizadas para posteriormente ser liberadas hacia el compartimiento en el cual atravesará el rayo láser. Debido a que muchas muestras son heterogéneas deben llevarse a cabo una constante agitación de la muestra para asegurar la liberación de una suspensión uniforme (104, 105).

b) Región de medición

En la región de medición, la célula intercepta un haz luminoso y las mediciones dependerán tanto de la longitud de excitación y de emisión. Al pasar por esta zona los fluorocromos son excitados y la fluorescencia es colectada por un detector. Esto resulta en una señal eléctrica proporcional a la intensidad de la fluorescencia que a su vez es proporcional a los parámetros celulares de interés. Adicionalmente, la luz dispersada por la propia célula puede ser medida ya que al pasar por el rayo láser la luz dispersada es colectada por un detector, lo que nos dará información sobre sus características (104, 105).

c) Detección de multiparámetros

Muchos instrumentos son multiparamétricos. Una serie de detectores y filtros son usados para medir fluorescencia a una determinada longitud de onda, junto con la medición de la dispersión de la luz en un ángulo bajo (FSC) y la dispersión de la luz a  $90^\circ$  (SSC). Estos detectores múltiples permiten el uso de diferentes fluorocromos para la medición de varias características celulares. La detección de multiparámetros es una de las principales ventajas del citómetro de flujo (104, 105).

d) Dispersión de la luz.

Como la célula fluye a través del rayo láser esta puede absorber y dispersar la luz. Si la célula es marcada con un fluorocromo, la luz absorbida puede ser emitida como fluorescencia. En cuanto a la dispersión, los detectores que colectan la luz dispersada en un ángulo bajo (hasta  $15^\circ$ ) permiten analizar la región llamada "forward scatter" (FSC). Al ser

dispersada en un ángulo de 90° los detectores colectan una señal que nos da información sobre la granularidad y esta región es llamada "side scatter" SSC (104, 105).

e) Procesamiento de la señal.

La señal de cada detector del citómetro de flujo es convertida en un pulso eléctrico el cual representa la medición de las características de la célula cuando ésta pasa a través del rayo láser. Estos pulsos son amplificados, convertidos a un valor digital y enviados a una computadora para analizarlos, mostrarlos y guardarlos. La amplitud del pico, anchura y área de cada pulso puede ser convertida a un valor digital, como se muestra en la figura 16.

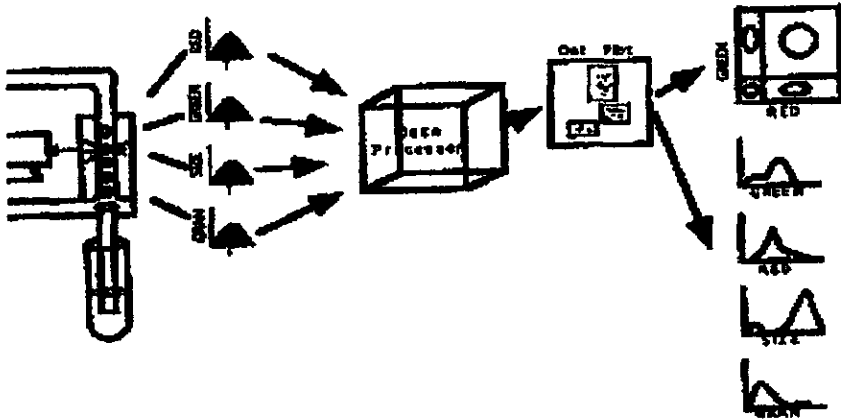


Fig 16. Esquema de un procesador de datos

f) Análisis de datos.

Los datos de citometría de flujo pueden ser mostrados y analizados en diversos formatos. La técnica seleccionada depende de la dimensionalidad de los datos y lo que se desee conocer sobre el sistema en estudio. Para un sistema en el cual la suposición de que los datos se derivan de una población normalmente distribuida, se recomienda el análisis paramétrico que permite resumir una gran cantidad de datos en una pequeña cantidad de números significativos. Las técnicas de análisis no paramétricos son usados cuando no se hacen suposiciones acerca de la población de la cual se han muestreado los datos. El

fundamento del análisis de datos es asegurar que la instrumentación y marcaje estén trabajando apropiadamente (104, 105).

g) Análisis univariante de datos.

La forma más simple y común de mostrar los datos y analizarlos es la distribución de frecuencia univariante o histograma. Los datos son graficados en dos dimensiones con la frecuencia en el eje vertical y la magnitud de la variable en el eje horizontal. En muchos casos, una simple interpretación visual o comparación con otros histogramas es suficiente para detectar alguna diferencia, así como la aparición de una nueva población, o el movimiento en la localización de la población.

Un histograma puede ser adquirido y mostrado con escala *logarítmica* o *lineal*. Al mostrar el número de células en una escala logarítmica hace más fácil la detección de poblaciones celulares que tienen baja frecuencia. Esta escala logarítmica se emplea para mostrar las variables cuando se tiene interés en subpoblaciones en las cuales el rango de valor es muy alto (104, 105).

h) Análisis bivariante de datos.

La exposición de dos parámetros es usada para mostrar la relación entre dos variables y para detectar subpoblaciones. El más simple de los gráficos es el que contiene dos parámetros y es el denominado "scatterplot". En este, cada célula es representada por un punto en dos dimensiones, mostrando coordenadas correspondientes para sus valores de medición. Este gráfico puede ser seleccionado cuando los datos empiezan a ser colectados o puede ser empleado durante el análisis de datos. La mayor limitación de este gráfico mejor conocido como "dot plot" es la falta de un rango dinámico. Como el número de células en el plano incrementa la región del gráfico puede llenarse obscureciendo completamente cualquier detalle.

La gráfica cuantitativa más empleada es el "contourn plot", donde son empleadas líneas de isocontorno para conectar los puntos. Al seleccionar el nivel del contorno cuidadosamente las subpoblaciones de los datos tienden a volverse aparentes. Además, también se pueden emplear ventanas para el análisis de datos ya que ayudan a determinar un número de células en particular o bien picos o regiones específicas.

El análisis de los datos en citometría de flujo requiere que los datos sean mostrados y analizados interactivamente (104, 105) (figura 17).

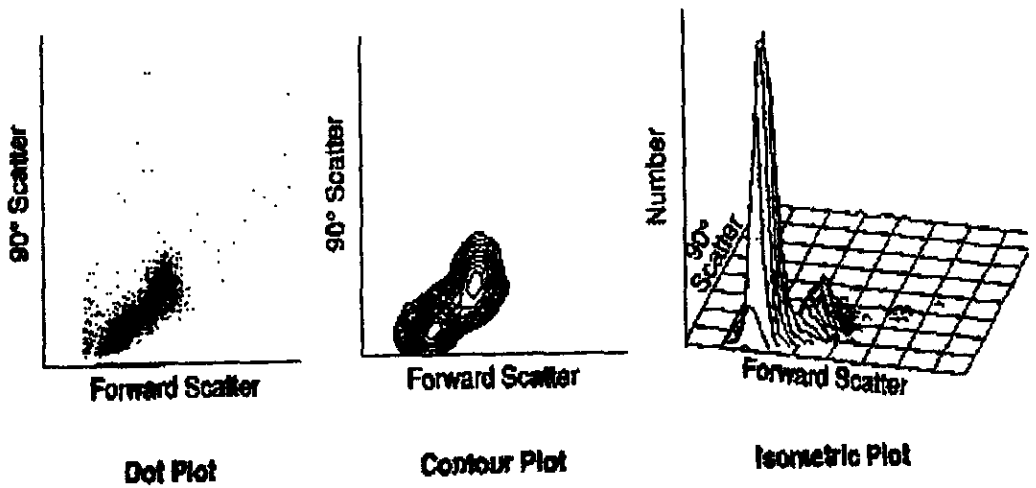


Fig 17. Histogramas con parámetros duales.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Bloom, B. (1982). Natural killers to rescue immune surveillance?. *Nature*. 300 (18): 214-215.
- 2.- William, R Clark. (1991). *The experimental foundations of modern immunology*. Cuarta edición. Edit Wiley. Cap.11, 14, 19. pag.273, 349 – 352, 455 – 463.
- 3.- Hereberman, Rb; Nunn, ME; Lavrin, DH; (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*. (16): 216-224.
- 4.- Hereberman, Rb; Nunn, ME; Lavrin, DH; (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. (16): 230-232.
- 5.- Ozer, H; Strelkauskas, AJ; Callery, RT; Schlossman. SF. (1979). The functional dissection of human peripheral blood null cells with respect to cytotoxicity and natural killing. *Eur J Immunol*. (9): 112-118.
- 6.- Herberman, RB; Ortaldo, JR. (1981). Natural killer cells: Their role in defenses against disease. *Science*.(214): 24-36.
- 7.- Trinchieri, G; Bice, P. (1984). *Biology of disease. Human natural killer cells: Biologic and pathologic aspects*. *Lab Invest*. 50,(5): 489-513.
- 8.- Mrózek, E; Anderson, P; Caliguri, M. (1996). Role of interleukin- 15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 87 (7): 2632-2640.
- 9.- Thompson, M; McInnes, R; Willard, HF. (1996). *Genética en medicina*. Cuarta edición. Edit. Masson. Cap.4. pag. 51.



- 10.- Santoli, D; Trinchieri, G; Zmijewski, CM; Koprowski, H. (1976). HLA related control of spontaneous and antibody-dependent cell mediated cytotoxic activity in humans. *J Immunol.* (117): 765-770.
- 11.- Roder, JC; Haliotis, T; Klein, M; Korec, S; Jett, JR; Ortaldo, J. (1980). A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature.* 284: 553-562.
- 12.- Sullivan, JL; Byron, KS; Brewster, FE; Purtilo, DT. (1980). Deficient natural killer cell activity in X-linked lymphoproliferative disorder syndrome. *Science.* 210: 543-549.
- 13.- Strayer, DR; Carter, WA; Mayberry, SD; Pequignot, E; Brodsky, I.(1984). Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. *Cancer Res.* 44: 370-378.
- 14.- Kadish, AS; Doyle, AT; Steinhauser, EH; Ghossein, NA. (1981). Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J Immunol.* 127: 1817- 1822.
- 15.- Gastl, G; Niederwieser, D; Marth, C; Huber, H; Egg, D. (1984). Human large granular lymphocytes and their relationship to natural killer cell activity in various disease states. *Blood.* 64: 288- 295.
- 16.-Pollack, SB; Hallenbeck, LA. (1982). In vivo reduction of NK activity with anti- NK1 serum: direct evaluation of NK cells in tumor clearance. *Int J Cancer.* 29: 203- 210.
- 17.-Uchida, A; Micksche, M. (1981). Suppressor cells for natural killer activity in carcinomatous pleural effusions of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 11: 255- 263.
- 18.- Haller, O; Hansson, M; Klessling, R. (1977). Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumor cells in vivo. *Nature.* 270: 619-622.
- 19.- Talmadge, JE; Meyers, KM; Prieur, JD. (1980). Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature.* 284: 622-634.

- 20.- Hanna, N; Fidler, J. (1980). Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J.Natl. Cancer Inst.* 65: 801-809.
- 21.- Kasai, M; Leclerc, JC; Mc Vay boudreau,L. (1979). Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen populations prevent tumor growth in vivo. *J Exp Med.* 149: 1260- 1267.
- 22.- Hanna. N; Burton, R. (1981). Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J Immunol.* 127 (5): 1754-1758.
- 23.-Pross, HF; Lotzova, E. (1993). Role of natural killer cells in cancer. *Nat Immunol.*12: 279-292.
- 24.-Koba, F; Akiyoshi, T; Tsuji, H. (1987). Natural killer cell activity in the perigastric lymph nodes from patients with gastric carcinoma or benign lesions. *J Clin Lab Immunol.* 23:191- 195.
- 25.-Ishigami, S; Natsugoe, S; Tokuda, K; Nakajo, A; Che, X. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma.*Cancer.* 88: 577-583.
- 26.-Herberman , RB; Djeu, JY, Kay, HD,(1979). Natural killer cells: Characteristics and regulation of activity. *Immunol. Rev.* 44: 43-70.
- 27.-Kiessling, R; Wigzell, H. (1979). An analysis of the murine NK cell as to structure, function, and biological relevance. *Immunol. Rev.* 44: 165-208.
- 28.-Livnat, S; Seigneuret, M; Storb, R; Prentice, R. (1980). Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after marrow transplantation. *J Immunol.* 124 (1): 481-490.
- 29.-Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 47: 187- 376.
- 30.- Mangan , K; Chikkappa, G; Farley R. (1982). T gamma cells suppress growth of erythroid colony-forming units in vitro in the pure red aplasia of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 70: 1148-1156.

- 31.- Scott, A; Head, D; Kopecky, K. (1994). HLA-DR-, CD33+,CD56+,CD16- Myeloid/natural killer cell acute leukemia: A previously unrecognized forma of acute leukemia potentially misdiagnosed as French-American-British acute myeloid leukemia-M3. *Blood*. 84 (1): 244-255.
- 32.- García, Tamayo F. (1997). *Fundamentos de inmunobiología*. Edit. UNAM. Cap.3. Las células del sistema inmunitario. Pag.85-86.
- 33.- Robertson, M; Jerome, Ritz. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 76 (12): 2421-2438.
- 34.-Perussia, B; Starr, S; Abraham, S; Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions: I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol*. (130): 2133-2141.
- 35.- Perussia, B; Trinchieri, G; Jackson, A. (1984). The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: Phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*. (133): 180-189.
- 36.- Huizinga, TWJ; Roos,D. (1990). Neutrophil Fc $\gamma$  receptor: A two-way bridge in the immune system. *Blood*. (75):1211-1218.
- 37.-Passlick, B; Flieger, D; Ziegler-Heitbrock, HWL. (1989). Identification and characterization of novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. (74): 2527-2530.
- 38.- Klaasen, RJL; Ouwehand, WH; Huizinga TWJ. ( 1990). The Fc receptor III of cultured human monocyte: Strutral similarity with FcR III of natural killer cells and role in the extracellular lysis of sensitized erythrocytes. *J Immunol*. (144): 599-610.
- 39.- Ueda, E; Kinoshita, T; Nojima, J. (1989). Different membrane anchors of Fc $\gamma$ RIII (CD16) on K/NK lymphocytes and neutrophils. *J Immunol*. (143): 1274-1277.

- 40.- Selvaraj, P; Carpen, O, Hibbs, ML; Springer, TA. (1989). Natural killer cell and granulocyte Fcγ receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction. *J Immunol.* (143): 3283-3290.
- 41.- Harris, DT; Travis, WW; Koren, HS. (1989). Induction of activation antigens on human natural killer cells mediated through the Fcγ receptor. *J Immunol.* (143): 2401-2415.
- 42.- Anegón, I; Cuturi, MC; Trinchieri, G; Perussia, B. (1988). Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med.* (167): 452-458.
- 43.- Cassatella, MA; Anegón, I; Cuturi, MC; Griskey, P; Trinchieri, G; Perussia, B. (1989). FcγR (CD16) interaction with ligands induces Ca<sup>2+</sup> mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells: Role of Ca<sup>2+</sup> in FcγR (CD16)- induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med.* (169): 549-555.
- 44.- Windebank, KP; Abraham, RT; Powis, G. (1988). Signal transduction during human natural killer cell activation: Inositol phosphate generation and regulation by cyclic AMP. *J Immunol.* (141). 3951- 3964.
- 45.- Ritz, J; Schmidt, R, Michon, J. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol.* (42): 181-211.
- 46.- Kos, F, Engleman, E. (1996). Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol Today.*(17): 174-176.
- 47.- Giorda, R; Rudert, WA; Vavassori, C. (1990). NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science.* (249): 1298-1300.
- 48.- Ryan, JC; Turck, J; Niemi, EC; Yokoyama, WM; Seaman, WE. (1992). Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J Immunol.* (149): 1631-1635.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- 49.- Yokoyama, WM; Seaman, WE. (1993). The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* (11): 613-635.
- 50.- Lanier, LL; Chang,C; Phillips,JH. (1994). Human NKR-P1A: a disulfide linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* (153): 2417-2428.
- 51.- Ryan, RC; Niemi, EC; Goldfien, RD; Hiserodt, JC; Seaman,WE.(1991). NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium. *J Immunol.* (147): 3244-3250.
- 52.- Cifone, MG; Roncaioli, P; Cironi, L; Festuccia, C; Meccia, A. (1997). NKR-P1 A stimulation of arachidonate-generating enzymes in rat NK cells is associated with granule release and cytotoxic activity. *J Immunol.* (159): 309-317.
- 53.- Karlhofer, FM; Yokoyama, WM. (1991). Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen: IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J Immunol.* (146): 3662-3673.
- 54.- Arase, H; Arase, N; Saito, T. (1996). Interferon  $\gamma$  production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med.* (183): 2391-2396.
- 55.- Ryan, JC; Niemi, EC; Nakamura, MC; Seaman, WE. (1995). NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med.* (181): 1911-1915.
- 56.- García, Tamayo F. (1997). *Fundamentos de inmunobiología. Edit. UNAM. Cap.5. La presentación de los antígenos. Pag198-199.*
- 57.- Kronenberg, M; Brossay, L; Kurepa, Z; Forman, J. (1999). Conserved lipid and peptide presentation functions of nonclassical class I molecules. *Immunol Today.* 20 (11): 514-521.

- 58.- Zeng, Z; Castaño AR; Segelke, BW; Stura, EA; Peterson, PA; Wilson IA. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science*. (277): 339-345.
- 59.- Voss, s; Daley, J; Ritz, j; Robertson, M. (1998). Participation of the CD94 receptor complex in co stimulation of human natural killer cells. *J Immunol*. (160): 1618-1626.
- 60.- Aramburu, J; Balboa, MA; Ramirez, A; Silva, A; Acevedo, A. (1990). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor - $\gamma/\delta$ + T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2 dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol*. (144): 3238-3247.
- 61.- Aramburu, J; Balboa, MA; Izquierdo, M. (1991). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor - $\gamma/\delta$ + T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol*. (144):714-721.
- 62.- Rubio, G; Aramburu, J; Ontanon, J; Lopez-Botet, M; Aparicio, P. (1993). A novel functional cell surface dimmer (Kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human  $\gamma/\delta$  T cells. *J Immunol*. (151): 1312- 1321.
- 63.- Lazetic, S; Chang, C; Houchins, JP; Lanier, LL; Phillips, JH. (1996). Human NK cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide- linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*. (157): 4741-4745.
- 64.- Moretta, A; Vitale, S; Sivori, C; Bottino, L. (1994). Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules: evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med*. (180): 545-552.
- 65.- Phillips, J; Chang, J; Mattson, J; Gumperz, P; Lanier, LL. (1996). CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity*. (5): 163-168.

- 66.- Pérez-Villar, JJ; Carretero, M; Navarro, M; Melero, I; Rodríguez, A; Bottino, C. (1996). Biochemical and serologic evidence for the existence of functionally distinct forms of the CD94 NK cell receptor. *J Immunol.* (157) 5367-5372.
- 67.- Pérez-Villar, JJ; Melero, I; Rodríguez, A; Carretero, M; Aramburu, J; Sivori, S. (1995). Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. *J Immunol.* (154) 5779-5785.
- 68.- Brumbaugh, K; Pérez-Villar, JJ; Dick, CJ. (1996). Clonotypic differences in signaling from CD94 (kp43) on NK cells lead to divergent cellular responses. *J Immunol.* (157): 2804-2810.
- 69.- Lazetic, S; Chang, C; Houchins, JP; Lanier, LL; Phillips JH. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol.* (157): 4741-4752.
- 70.- Siliciano, RF; Pratt, JC; Schmidt, RE; Ritz, J; Reinherz, EL. (1985). Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature.* (317): 428-430.
- 71.- Dustin, ML; Sanders, ME; Shaw, S; Springer, TA. (1987). Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J Exp Med.* (165): 677-692.
- 72.- Caligiuri, M; Zmuidzinas, A; Manley, T; Levine, H; Smith, K; Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. *J Exp Med.* (171): 1509-1526.
- 73.- Hallor, O; Kiessling, R; Orn, A; Wigzell, H. (1977). *Generation of natural killer cells: An autonomous function of the bone marrow.* *J Exp Med.* (145): 1411-1418.
- 74.- Claeson, MH; Olsson, L. (1980). Autorreactive natural killer-like cells from agar-cloned murine bone marrow cells. *Nature.* (283): 578-582.

- 75.- Shibuya, A; Nagayoshi, K; Nakamura, K; Nakauchi, H. (1995). Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 85 (12): 3538-3546.
- 76.- Suzuki, R; Yamamoto, K; Seto, M; Kagami, Y. (1997). CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia: A distinct hematolymphoid disease entity. *Blood*. 90 (6): 2417-2428.
- 77.- Mrózek, E; Anderson, P; Caligiuri, A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 87 (7): 2632-2640.
- 78.- Revillard, J; Adorini, L; Goldman, M; Kabelitz, D; Waldmann, H. (1998). Apoptosis potential for disease therapies. *Immunol Today*. 19 (7): 291-293.
- 79.- Froelich, CJ; Dixit, V; Yang, X. (1998). Lymphocyte granule-mediate apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today*. 19 (1): 30-36.
- 80.- Werfel, T; Uciechowski, P; Tetteroo, P; Kurrle, R; Deicher, H. (1988). Activation of clones human natural killer cells via FcγRIII. *J Immunol*. (142): 1102-1106.
- 81.- Unkeless, JC. (1977). The presence of two Fc receptor on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J Exp Med*. (145): 931-935.
- 82.- Iwai, K; Miyawaki, T; Takizawa, T; Konno, A; Ohta, K. (1994). Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas- mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood*. (84) : 1201- 1209.
- 83.- Liles, W; Kiener, J; Ledbetter, A. (1996). Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med*. (184): 429-435.
- 84.- Nagata, S; Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*. (267): 1449- 1453.



- 85.- Arase, H; Arase, N; Saito, T. (1995). Fas -mediated cytotoxicity by freshly isolates natural killer cells. *J Exp Med.* (181): 1235-1242.
- 86.- Trinchieri. G. (1995). Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. *Annu. Rev. Immunol* (13): 251-276.
- 87.- Henderson, E. (1990). Leukemia. Quinta edición. Edit. Saunders. Cap.5 . Kinetics of leukemia and control of cell division and replication. Pag: 55-100.
- 88.- Ruiz, Argüelles G. (1998). Fundamentos de hematología. Segunda edición. Edit. Panamericana. Cap.1, 12, 13, 15.pag: 17-29, 180-207 y 223-250.
- 89.- Look, T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* (278): 1059-1064.
- 90.- World medical association: Declaration of Helsinki. Recommendation guide and doctors in clinical research. (1994). *World medical Journal.* (11): 281.
- 91.- Siena, S. Milan protocolo for clinical CD34+ cell estimation in peripjeral blood for autographing in patients with cancer En: Hematopoietic stem cell, The Mulhouse manual wunder E, Sovalat H, Hénon PR, Serke S (Editors) Alpha Med Press. Dayton Ohio, 1994, pp 23-76.
- 92.- Siegel, S. 1995. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias. Edit. Trillas, Cap 5 Dos muestras independientes. pag: 157-166.
- 93.-Ruiz, Argüelles G. (1998). Fundamentos de hematología. Segunda edición. Edit. Panamericana. Cap 12, 13, 15. pag: 180, 199, 225-226.
- 94.-Lanier, LL; Civin, C; Loken, M; Phillips, J. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu- 19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 136 (12): 4480- 4486.

- 95.-Nagler, A; Lanier, L; Cwirla, S; Phillips, J. (1989). Comparative studies of human FeRHH-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 143 (10): 3183-3191.
- 96.-Scott, A; Head, D; Kopecky, k; Appelbaum, F; Theil, K; Grever, M. (1994). HLA-DR-, CD33+, CD56+, CD16- Myeloid/natural killer cellacute leukemia: A previously unrecognized form of acute leukemia potentially misdiagnosed as French- American-British acute myeloid leukemia -M3. *Blood.* 84 (1): 244-255.
- 97.-Shibuya, A; Nagayoshi, K; Nakamura, K; Nakauchi, H. (1995). Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 85 (12): 3538- 3546.
- 98.-Streuli, M; Morimoto, C; Schrieber, M; Schissman, SF; Saito, H. (1988). Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. *J Immunol.* 141: 3910-3914.
- 99.- Ruiz, Argüelles G. (1998). *Fundamentos de hematología. Segunda edición.* Edit. Panamericana. Cap 1 pag17- 30.
- 100.-Jennings D; Foon, K. (1997). Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood.* 90 (8): 2863-2892.
- 101.-Shah, V; Civin, C; Loken, M. (1988). Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol.* 140 (6): 1861-1867.
- 102.-Borowitz, M; Guenther, L; Schults, K; Stelzer, G. (1993). Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and Right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol.* 100: 534-540.

103.-Lacombe, F; Durrieu, F; Briais, A; Dumain, P; Belloc, F; Bascans, E; Reiffers, J; Boisseau, MR; Bernard, Ph. (1997). Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 11: 1878-1886.

104.- Bogh, L; Duling, T. (1993). Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. *Clin Lab Sci*. 6 (3): 167-182.

105.- Goetzman, E. (1993). Flow cytometry: Basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics. *Clin Lab Sci*. 6 (3): 177- 182.