

Estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo para el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias

Immunophenotype study by flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiencies

Consuelo Macías Abraham

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un conjunto heterogéneo de enfermedades, en su mayoría de origen hereditario o congénito, cuyo diagnóstico requiere de la caracterización inmunológica de poblaciones y subpoblaciones celulares. Esta revisión, describe la metodología más actual a nivel internacional, basada en el proyecto denominado FITMaN (del inglés, *Flow Immunophenotyping Technical Meeting at National Institute of Health*) para la caracterización celular que permite definir o avanzar en el diagnóstico correcto de estas entidades utilizando las bondades de la tecnología de la citometría de flujo. También, brinda nuevas opciones de investigación que permiten profundizar en el comportamiento del sistema inmunológico en estas enfermedades y su asociación con la expresión de marcadores moleculares y genéticos de interés.

Palabras clave: inmunodeficiencias primarias, citometría, inmunofenotipo.

ABSTRACT

Primary immunodeficiencies (PID) are a heterogenous group of diseases, mostly hereditary or congenital origin, which diagnosis requires the immunological characterization of cell populations and subpopulations. This review describes the international current methodology, based on the project called FITMAN (Flow Immunophenotyping Technical Meeting at National Institute of Health) for cell characterization that allows defines or forward to correct diagnosis of these entities using benefits of flow cytometry technology. Also, it provides new research options that allow deeper into the behavior of the immune system in these diseases and their association with the molecular expression and genetic markers of interest.

Keywords: primary immunodeficiencies, cytometry, immunophenotype.

INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un conjunto heterogéneo de enfermedades producto de mutaciones monogénicas, en su mayoría de origen hereditario, que comprometen la homeostasis del sistema inmunológico y provocan enfermedad¹⁻⁶. El estudio de las IDP se encuentra en constante actualización para lograr la mejor caracterización inmunológica, diagnóstico, tratamiento y pronóstico de estos enfermos.

El estudio del fenotipo linfocitario incluye diferentes marcadores específicos de linaje en la superficie de la membrana celular, que se basa en el patrón de migración y diferenciación de cada subpoblación en el contexto del sistema inmune en el organismo. Por lo anterior, es de gran importancia conocer la cuantificación de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias para orientar el estudio que permite profundizar en estas alteraciones y definir un diagnóstico en enfermedades que muestran un amplio polimorfismo clínico.

El protocolo FITMaN (del inglés, *Flow Immunophenotyping Technical Meeting at National Institute of Health*) forma parte del Proyecto de Inmunología Humana, en inglés, *Human Immunology Project Consortium* (HIPC), que se realizó con el objetivo de una correcta caracterización del sistema inmune humano mediante el conjunto de 4 paneles de 8 colores por citometría de flujo para el inmunofenotipaje de células de sangre periférica⁷⁻¹¹. Su estandarización se realizó para conseguir una metodología y configuración común para el procesamiento y análisis.

Para facilitar el diagnóstico, la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) ha elaborado la siguiente clasificación de los diferentes grupos, en función de la afectación¹:

1. Inmunodeficiencias combinadas
2. Síndromes de inmunodeficiencias bien definidos
3. Deficiencias predominantes de anticuerpos
4. Enfermedades de desregulación inmunológica
5. Defectos congénitos del número y función de los fagocitos
6. Defectos de la inmunidad innata
7. Desórdenes autoinflamatorios
8. Deficiencias del complemento
9. Adquiridas

Las IDP combinadas presentan anomalías en la inmunidad mediada por células (linfocitos T), en la inmunidad mediada por anticuerpos (linfocitos B) y también en la inmunidad innata con ausencia o disminución de las células *natural killer* (NK), células dendríticas (DC) y monocitos. Es por ello que es necesario el estudio de estos tipos celulares para definir o avanzar en el diagnóstico correcto de estas entidades.

A continuación, se describen las características moleculares que definen fenotipos celulares y aportan datos de interés funcional que permiten profundizar en el comportamiento del sistema inmunológico en estas enfermedades y su asociación con la expresión de marcadores moleculares y genéticos de interés.

CÉLULAS T

Los linfocitos T se identifican mediante su separación de los linfocitos totales utilizando el marcador característico CD3. De estos se separan los **linfocitos colaboradores** (CD4+) **de los citotóxicos** (CD8+). A partir de cada uno de ellos, utilizando los marcadores CD45RA y el receptor de quimiocina tipo 7(CCR7) se distinguen los **linfocitos *naïve* o vírgenes**(CCR7+CD45RA+), los **linfocitos de memoria central** (CCR7+CD45RA-), los **linfocitos de memoria efectora** (CCR7-CD45RA-)y los **linfocitos efectores** (CCR7-CD45RA+)⁷⁻¹⁰. (Fig. 1)



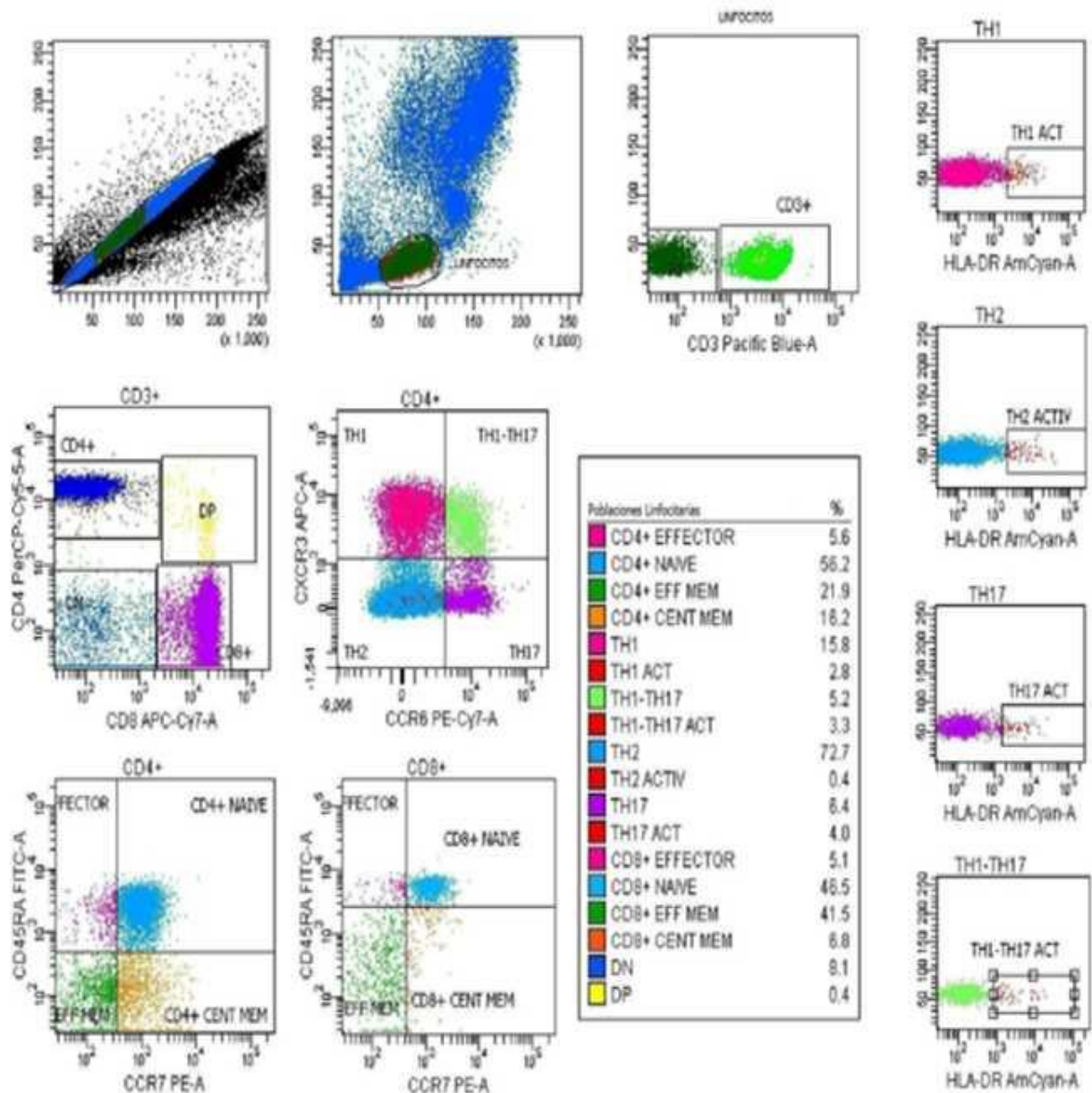


Fig. 1. Representación de la separación de células T (CD4+ y CD8+) en subtipos de memoria, vírgenes y efectoras y de células T CD4+ en subtipos Th1, Th2, Th17 y Th1+Th17 con paneles de anticuerpos monoclonales de acuerdo al protocolo FITMaN.

La separación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante CD45RA y CD45RO permite identificar las **células T de memoria** (CD45RA-/CD45RO+) y las **células T vírgenes y efectoras** (CD45RO-/CD45RA+). En cada grupo el marcador CCR7 permite diferenciar dentro de las células de memoria (CD45RA-), las de **memoria central** (CCR7+) y las de **memoria efectora** (CCR7-); y dentro de las células T que no son de memoria (CD45RO-/CD45RA+), las **células vírgenes** (CCR7+) y las **células efectoras** (CCR7-)⁷⁻¹⁰.

Células T Colaboradoras: Una vez separados mediante su marcador de linaje (CD3+) y de los linfocitos citotóxicos (CD8+), los **linfocitos colaboradores** (CD4+) se separan en subtipos mediante la expresión o no de los receptores de quimiocinas tipo 3 (CXCR3) y 6 (CCR6) como son: **Th1** (CXCR3+CCR6-), **Th2** (CXCR3-CCR6-), **Th17** (CXCR3-CCR6+) y **Th1-Th17** (CXCR3+CCR6+). Con los marcadores de activación HLA-DR y CD38 se diferencia el porcentaje de células activadas de cada subclase colaboradora y citotóxica (Fig. 1)¹¹⁻¹⁵.

Células T reguladoras: Los linfocitos T CD4+ se separan mediante marcadores característicos (CD3+CD4+). La estrategia de enfrentar CD25 vs CD127 permite identificar las **células T reguladoras** (CD25+CD127^{low}). Concretamente, serán células T reguladoras aquellas que expresen el receptor de quimiocina tipo 4 y el CD45RO (CCR4+CD45RO+)(Fig. 2)¹⁶.



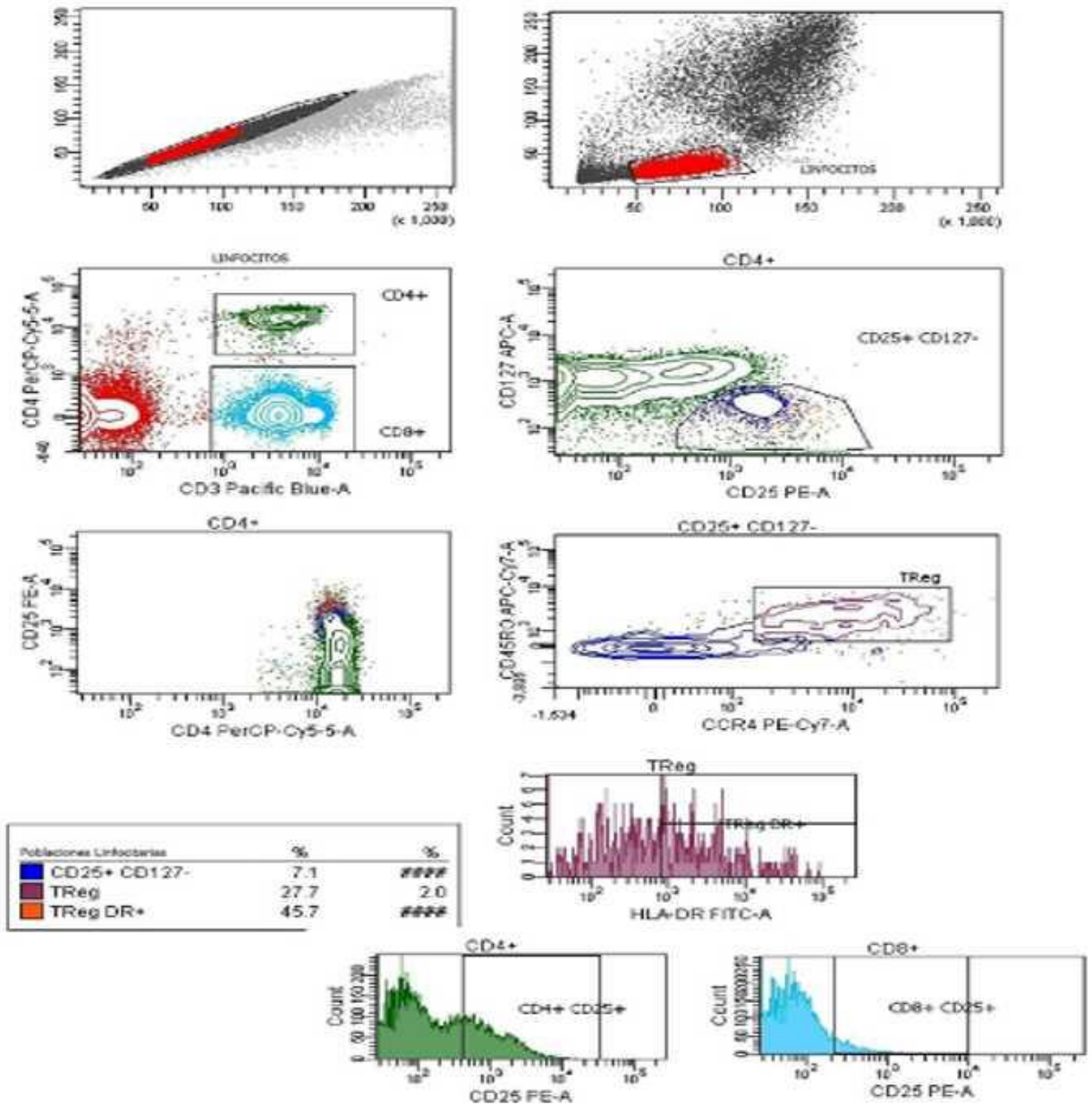


Fig. 2. Representación de la separación de células T reguladoras (CD25+CD127^{low}) (CCR4+CD45RO+) a partir de células (CD3+CD4+) y de células T reguladoras activadas DR+ con paneles de anticuerpos monoclonales de acuerdo al protocolo FITMaN.

CÉLULAS B

Los linfocitos B se identifican mediante la caracterización (CD3-CD19+). La combinación de los marcadores IgD y CD27 permite la identificación de los **linfocitos B vírgenes o naïve** (IgD+ CD27-), las **células de memoria previas al cambio de clase**, en inglés, *pre-switch memory* (IgD+

CD27+), las de **memoria con cambio de clase**, en inglés *switchmemory* (IgD-CD27+) y las **agotadas o exhausted B cells** (IgD/CD27-)¹⁷. (Fig. 3)

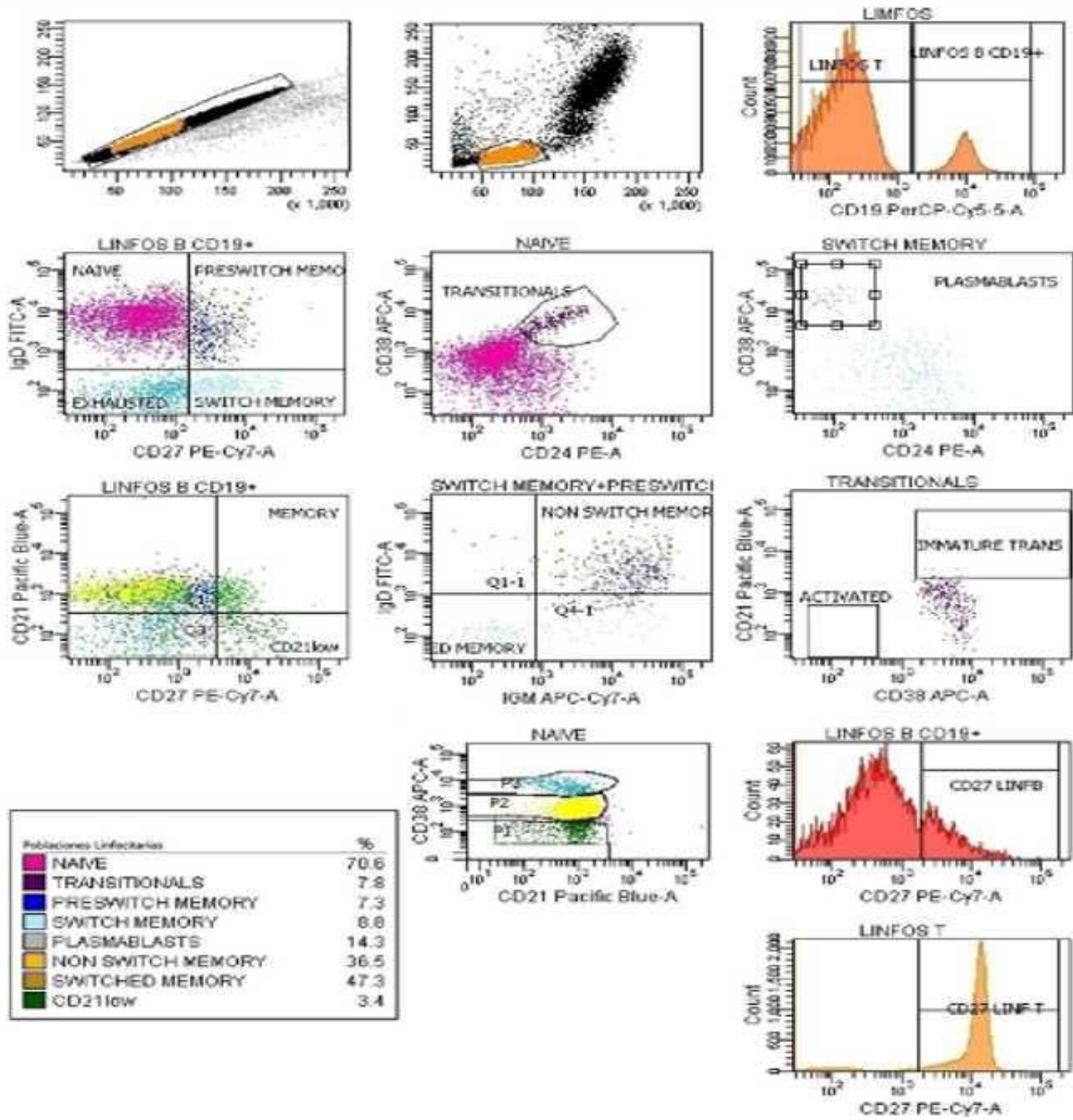


Fig. 3. Representación de la identificación de células B CD19+ en diferentes estados de maduración mediante el marcaje de **IgD/CD27** y **CD21/CD27**; a partir de los linfocitos B naive (IgD+CD27-) la identificación de células transicionales. A partir de los linfocitos CD21low y con los marcadores CD21/CD38 se identifican los activados (CD21lowCD38-) y los transicionales inmaduros (CD21lowCD38+). A partir de las *switch memory* los plasmablastos mediante CD24/CD38.

A partir de las células B vírgenes se distinguen las **células transicionales** (CD38^{high} CD24^{high}), que están en un estado más inmaduro. A partir de las *switch memory* se pueden distinguir los **plasmablastos** (CD38+CD24-), que están en un estadio de maduración previo a las células plasmáticas; y utilizando los marcadores CD38 y CD20, una población que incluye **plasmablastos y células plasmáticas** (CD38+CD20+)¹⁷.

Entre los linfocitos B, a partir de su marcador de linaje CD19, se pueden identificar: **linfocitos B vírgenes**(CD21+CD27-), **de memoria** (CD21+CD27+), **CD21^{low}** (CD21^{low}CD27+) e **inmaduros** (CD21-CD27-) mediante la combinación de CD21 vs CD27. A partir de CD21^{low} y con los marcadores CD21 vs CD38 se puede discernir entre los **activados** (CD21^{low}CD38-) y los **transicionales inmaduros**. También se pueden diferenciar los linfocitos de memoria que han cambiado de clase y los que no, mediante la combinación de marcadores IgD e IgM, así como los que han pasado a **plasmablastos** (IgM-CD38+). Con los mismos marcadores, a partir de los linfocitos B vírgenes se identifican los linfocitos B transicionales y dentro de los linfocitos B, las **células plasmáticas** (CD38+CD138+)(Fig. 4)¹⁷.

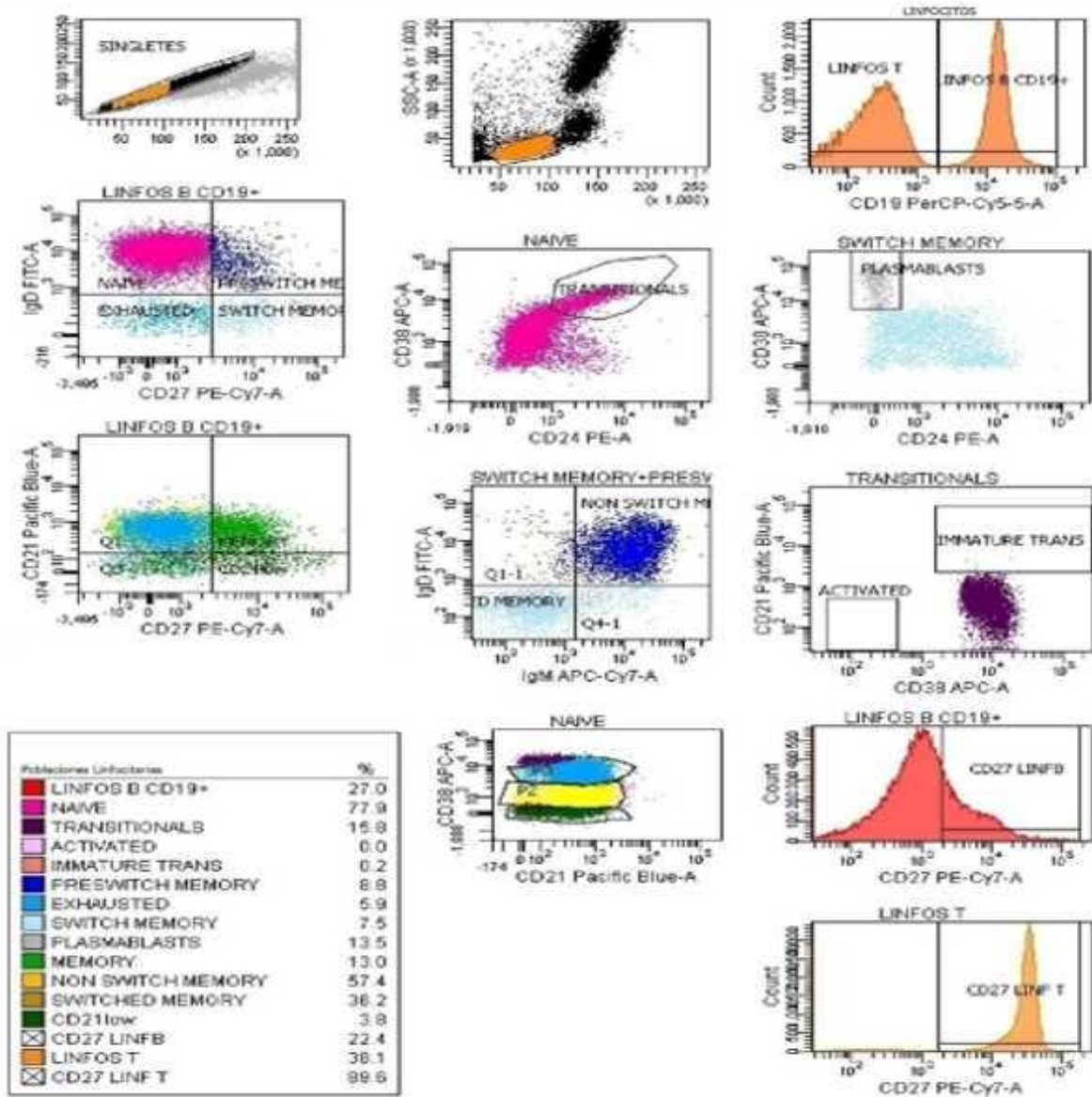


Fig. 4. Representación de la identificación de células B CD19+ en diferentes estados de maduración mediante el marcaje de **IgD/CD27**. A partir de las vírgenes y **con los marcadores CD24/CD38 se identifican los transicionales y plasmablastos**. Los linfocitos B de memoria que han cambiado de clase y los que no, mediante la combinación de marcadores **IgD/IgM**.

CÉLULAS DENDRÍTICAS/CÉLULAS NK/ MONOCITOS

Por exclusión de los linfocitos T y los linfocitos B, se hace una **selección negativa de los CD3-CD19-CD20-**; de esta, es que se seleccionan los monocitos y las células dendríticas y las células NK. Para diferenciar estos tipos celulares, en la misma ventana mediante la lectura de la combinación de marcaje con CD56 vs CD14 se distinguen los **monocitos (CD56- CD14+)** En los

monocitos se puede distinguir entre los **clásicos** (CD14+CD16-) y los **no clásicos**(CD14+CD16+). (Fig. 5)

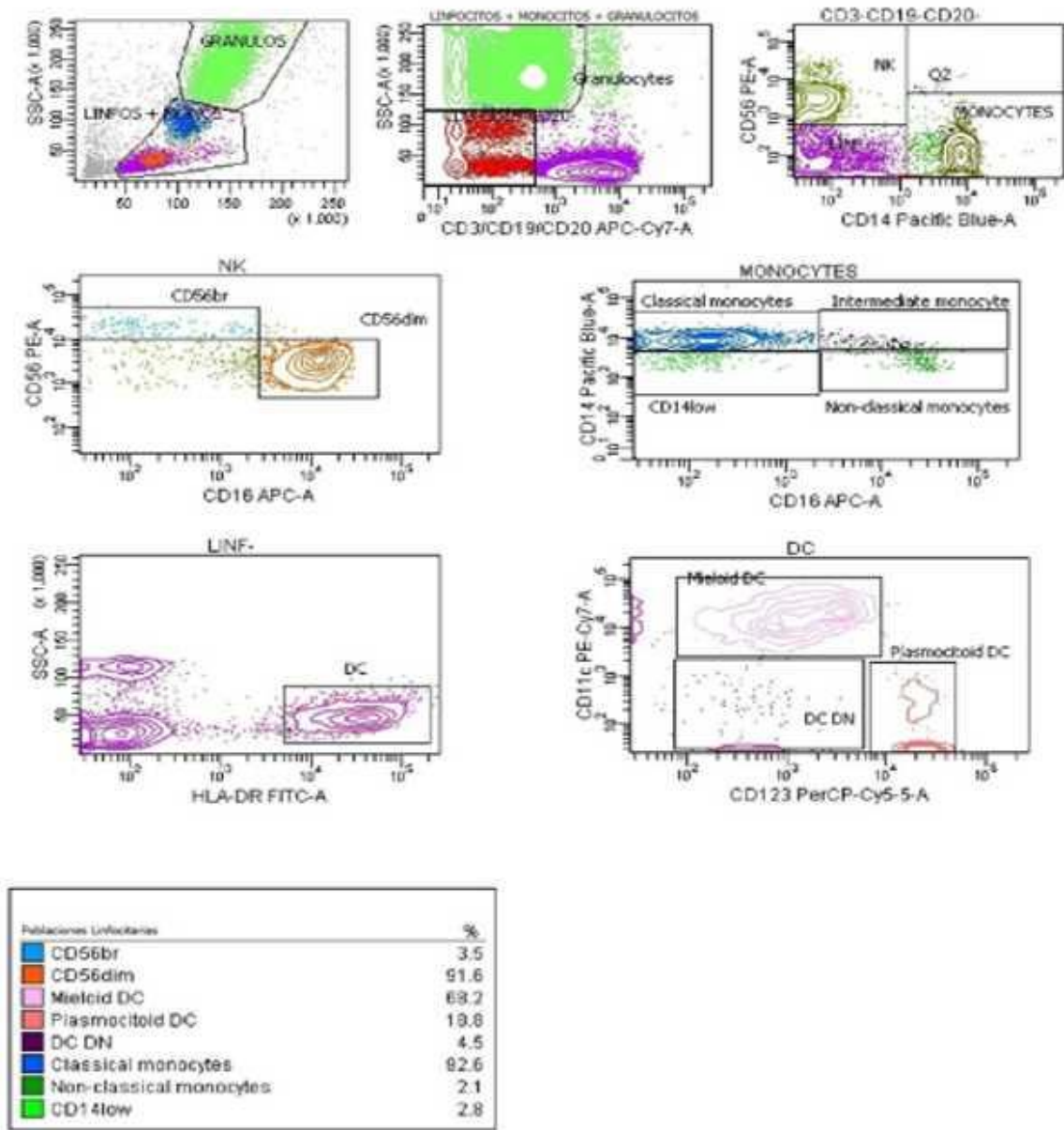


Fig. 5. Representación de la identificación de células dendríticas/monocitos/células NK por exclusión de los linfocitos T y B, mediante una selección negativa de los **CD3-CD19-CD20-**. En esta ventana **los monocitos (CD56-CD14+)** se distinguen entre **los clásicos (CD14+CD16-)** y **los no clásicos (CD14+CD16+)**. Las **células dendríticas CD56-CD14-HLA-DR+** y la **combinación del CD11c y el CD123** permiten diferenciar las **células dendríticas mieloide de las plasmocitoides**. En las células NK (CD56+CD16+) se puede distinguir entre los **NKs bright** y **los NKs dim**.

En las **células NK**(CD56+CD16+), mediante la combinación CD56 vs CD16 es posible distinguir entre los *NKsbright* y los *NKsdim*.

Las **células dendríticas** son CD56-CD14-HLA-DR+ y con la combinación del CD11c y el CD123 se pueden diferenciar las células dendríticas **mieloides** de las **plasmacitoides**¹⁸⁻²¹.

En la actualidad, Cuba cuenta con un Programa de Atención Integral al enfermo con IDP, el cual debe desarrollarse de manera más acelerada en el próximo quinquenio. La disponibilidad de tecnologías de avanzada, como son: la citometría de flujo, la hibridización “*in situ*” por fluorescencia (FISH) y la biología molecular, permitirá el diagnóstico más preciso de estas enfermedades lo que, asociado a la experiencia clínica, ubicará al Sistema Nacional de Salud en una posición favorable para la atención médica, con mejoras en el diagnóstico, la calidad de vida de los enfermos y la curación mediante el trasplante hematopoyético de las IDP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Herz W, [Bousfiha A](#), [Casanova JL](#), [Chatila T](#), [Conley ME](#), [Cunningham-Rundles Ch](#), et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2014;22(5):162.
2. Crestani E, [Choo Sh](#), [Frugoni F](#), [Nee Lee Y](#), [Richards S](#), [Joanne Smart J](#), et al. RAG1 Mosaicism in a Patient with Omenn Syndrome. *J Clin Immunol.* 2014;34(5):551-4.
3. Corneo B, [Moshous D](#), [Güngör T](#), [Wulffraat N](#), [Philippot P](#), [Le Deist FL](#), et al. Identical mutations in *RAG1* or *RAG2* genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood.* 2001;97(9):2772-6.
4. Boldt A, [Borte S](#), [Fricke S](#), [Kentouche K](#), [Emmrich F](#), [Borte M](#), et al. Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK- cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014 May;86(3):191-206. doi: 10.1002/cyto.b.21162
5. Van der Burg M & Gennery AR. Educational paper: The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 2011;170:561-71.
6. Van der Burg M. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B-SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest.* 2009; 119(1):91-8.
7. Maecker HT, [McCoy JP](#), [Nussenblatt R](#). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):191-200.
8. De Vries E. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists:2011 update. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(1):108-19.
9. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human Immuno Phenotyping Consortium. *Sci Rep.* 2016 Feb 10;6:20686. doi: 10.1038/srep20686.
10. Hasan M, Beitz B, Rouilly V, Libri V, Urrutia A, Duffy D, et al. Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clin Immunol.* 2015 Apr; 157(2): 261-76. doi: 10.1016/j.clim.2014.12.008.

11. Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, et al. Functional Analysis via Standardized Whole-Blood Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex Stimuli. *Immunity*. 2014 Mar 20;40(3):436-50. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.002.
12. Mateus J, Lasso P, González JM, Puerta CJ, Cuéllar A. Design of a multicolor panel to assess intracellular and surface molecules by flow cytometry. *Biomedica* 2013. 33(4):660-72.
13. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):24-35. doi: 10.1038/nri3567.
14. Romero P, [Zippelius A](#), [Kurth I](#), [Pittet MJ](#), [Touvrey C](#), [Iancu EM](#) et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178(7):4112-9.
15. Appay V, [van Lier RA](#), [Sallusto F](#), [Roederer M](#). Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):975-83. doi: 10.1002/cyto.a.20643.
16. Salusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2076-82. doi: 10.1002/eji.200939722.
17. Sakaguchi S. Regulatory T cells in the past and for the future. *Eur J Immunol*. 2008 Apr;38(4):901-37. doi: 10.1002/eji.200890012.
18. Bhattacharya P, Wuerffel R, Kenter AL. Switch region identity plays an important role in Ig class switch recombination. *J Immunol*. 2010;184(11):6242-8.
19. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
20. Jardine L, Barge D, Ames-Draycott A, Pagan S, Cookson Sh, Spickett G, et al. Rapid detection of dendritic cell and monocyte disorders using CD4 as a lineage marker of the human peripheral blood antigen-presenting cell compartment. *Front Immunol*. 2013;4:495.
21. Heinze A, Elze MC, Kloess S, Ciocarlie O, Konigs C, Betz S, et al. Age-matched dendritic cell subpopulations reference values in childhood. *Scand J Immunol*. 2013;77(3):213-20.

Recibido: agosto 08, 2016.

Aceptado: diciembre 27, 2016.

Prof. Dra C. Consuelo Macías Abraham. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA.

Tel (537) 643 8695, 8268

Email: rchematologia@infomed.sld.cu