

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA EVALUACIÓN
DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO DE CELULAS FAGOCÍTICAS MEDIANTE
CITOMETRIA DE FLUJO**

NIYIRETH PEÑALOZA CASTAÑEDA

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito para obtener el título de

Bacterióloga



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C - 2010**

**ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA PARA LA EVALUACIÓN
DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO DE CELULAS FAGOCITICAS MEDIANTE
CITOMETRIA DE FLUJO**

NIYIRETH PEÑALOZA CASTAÑEDA

APROBADO

Ingrid Schuler, Ph.D
Decana Académica

Luz Amparo Maldonado, MSc.
Directora carrera Bacteriología



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C - 2010**

**ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA PARA LA EVALUACIÓN
DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO DE CELULAS FAGOCITICAS MEDIANTE
CITOMETRIA DE FLUJO**

NIYIRETH PEÑALOZA CASTAÑEDA

APROBADO

Susana Fiorentino Gómez, Ph.D.
Directora

Sandra Quijano Gómez, Ph.D.
Codirectora

Antonia Infante, Bct. Esp.
Jurado



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C - 2010

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946

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

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
3. Justificación - Problema.....	8
4. Marco teórico.....	8
5. Objetivos.....	10
6. Materiales y Métodos	
Población y muestra.....	10
Reactivos.....	10
Diseño experimental.....	12
7. Resultados	
Condiciones óptimas Buffer de lisis de amonio.....	12
Concentración óptima de uso de la DHR 123 en SP normal.....	14
Concentración óptima de uso del PMA en combinación con DHR123.....	17
Influencia del tipo de anticoagulante en el estallido respiratorio.....	21
8. Discusión.....	23
9. Conclusiones.....	26
10. Recomendaciones.....	26
11. Bibliografía	27

1. RESUMEN

La Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por un incremento en la susceptibilidad a infecciones fúngicas y bacterianas a repetición, causado por mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la enzima adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa). Esta enzima es un complejo multimérico presente en la membrana de células fagocíticas, encargada de catalizar la formación de radical súper-óxido, especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido hipocloroso, importantes para la defensa del huésped contra microorganismos patógenos.

Existen diferentes técnicas diagnósticas para esta enfermedad dentro de las que se encuentra la Citometría de flujo, técnica altamente sensible, rápida, sencilla, y confiable comparada con otras técnicas como la reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT) que es poco sensible y altamente susceptible a errores debido a su alta dependencia de la experticia del observador.

Es por esto que en el este estudio tiene como fin estandarizar la técnica de la Dihidrorodamina 123, por Citometría de flujo, para la determinación de la fagocitosis y el estallido respiratorio en poblaciones de monocitos y polimorfonucleares de individuos sanos, para posteriormente poder utilizarla como una técnica de rutina para el estudio y diagnóstico de la EGC. Para esto se evaluaron diferentes aspectos que podían llegar a influir en el adecuado análisis de los resultados del estallido respiratorio de los fagocitos como son: la efectividad de la lisis de glóbulos rojos para un análisis apropiado, la óptima concentración del activador Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), la concentración del fluorocromo Dihidrorodamina 123, y el tipo de anticoagulante a utilizar.

Se evaluaron muestras de sangre periférica (SP) de nueve personas voluntarias, sin antecedentes de EGC, con valores normales de neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Se utilizó como lisante de los glóbulos rojos el Buffer de lisis de amonio, el cual solo se pudo utilizar en forma adecuada cuando cada uno de sus componentes fue preparado en concentración 10X y conservado estéril a 2°C; como activador celular se utilizaron tres concentraciones diferentes de PMA (1, 5 y 10µg/mL); y se ensayaron tres distintas concentraciones del fluorocromo DHR123 (1, 3 y 5µg/mL). Para determinar cual concentración tanto del activador como del fluorocromo era la adecuada para el análisis del estallido respiratorio en las células fagocíticas, se tuvieron en cuenta tres criterios: el porcentaje de celularidad total, el canal medio de fluorescencia (CMF) en las poblaciones leucocitarias y la adecuada discriminación de estas poblaciones teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Forward Scatter* –FSC-) versus granularidad (*Side Scatter* –SSC-). Además se utilizaron como anticoagulantes el ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y la heparina de litio, y se evaluó si el uso del anticoagulante influye en la actividad oxidativa de las células fagocíticas. Las muestras se procesaron y adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur, y fueron analizadas en un tiempo no superior a 4 horas pasada la toma de la muestra.

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software estadístico SPSS versión 17, en donde se calcularon las medias, desviación estándar y rangos, y se compararon las medias aplicando el test de Mann Whitney. Se consideraron como diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

A partir de estos análisis, se concluyó que la concentración de PMA afecta el porcentaje de celularidad total de la SP comparando la sangre lisada con los diferentes tratamientos (1, 5 y 10µg/mL) siendo más tóxica la concentración más alta ($p: 0,043$). Pero respecto al CMF, la PMA no mostro cambios significativos entre cada tratamiento ($p > 0,05$). Para el caso de la DHR 123, se observó que las diferentes concentraciones de este fluorocromo no afectan la celularidad ($p > 0,05$), pero el tratamiento con 1µg/mL es el que presenta el mayor porcentaje de celularidad (91,6%). Sin embargo, para el caso de el CMF, se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en las cuatro poblaciones celulares al compararlas con sangre lisada.

Con todo lo anterior se llegó a la conclusión que la óptima concentración para el activador PMA es la de 1µg/mL, y así mismo la concentración adecuada para la DHR123 es de 1µg/mL, ya que con estas concentraciones es en donde se puede hacer una mejor discriminación de las poblaciones celulares, y en donde la celularidad se ve menos afectada por el tratamiento con dichos reactivos.

El análisis de la influencia de los anticoagulantes en la actividad oxidativa, muestra que el uso de EDTA y Heparina de litio no altera el estallido respiratorio de las células fagocíticas, al comparar los CMF en las poblaciones leucocitarias ($p>0,05$), y además que el uso de éstos no altera la celularidad de las muestras.

2. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria que se caracteriza por infecciones bacterianas y micóticas a repetición, debido a la incapacidad de las células fagocíticas para generar especies reactivas de oxígeno que intervienen en la muerte de los microorganismos fagocitados. Esta incapacidad es producida por mutaciones en los genes que codifican las subunidades que conforman el sistema NOX (NADPH oxidasa): gp91phox, p22phox, p47phox o p67phox.

Dentro de las inmunodeficiencias primarias, en Latinoamérica la EGC presenta una frecuencia de 8,6% ocupando el cuarto lugar dentro de este grupo. A nivel mundial, esta inmunodeficiencia tiene una incidencia que oscila entre 1 por cada 200 a 250 mil nacimientos (López J. 2008). Estudios realizados en Argentina, Chile, Costa Rica y Uruguay, estiman que la incidencia de la EGC oscila entre 0,72 y 1,26 casos por cada 100 mil nacimientos, mientras que en Colombia, para el año 2004 la incidencia era de 0,09 casos por cada 100 mil nacidos (Leiva et al., 2007). Sin embargo, la información epidemiológica de esta inmunodeficiencia en los países en vía de desarrollo se ve obstaculizada por limitaciones en la utilización e interpretación de técnicas adecuadas para diagnosticar estos trastornos.

El diagnóstico de la EGC se hace mediante la demostración de una disminución o la ausencia total de la actividad de la NADPH oxidasa en neutrófilos estimulados. Para esto existen diferentes técnicas ya sean de quimioluminiscencia como es la de Luminol, colorimétricas como el NBT, y fluorimétricas (Citometría de Flujo) como la Dihidrorodamina 123 (Freitas et al., 2009). Esta última, DHR 123, es la empleada en el presente estudio debido a que de acuerdo a la literatura, es altamente sensible, rápida y sencilla comparada con otras pruebas poco sensibles y susceptibles a errores técnicos y que llevan a que los resultados finales dependan de la destreza y experiencia del observador.

La presente investigación, se realizó para estandarizar la técnica para determinar el estallido respiratorio mediante Citometría de flujo, evaluando aspectos como: la lisis efectiva en muestras de sangre periférica, la influencia del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y DHR en muestras de sangre periférica de voluntarios sanos y la influencia del uso de anticoagulante; todo esto para acoger este procedimiento como una técnica de rutina para el diagnóstico de EGC, y así utilizarla a mediano plazo en el estudio de pacientes con infecciones bacterianas y fúngicas a repetición.

3. JUSTIFICACIÓN - PROBLEMA

La fagocitosis efectiva realizada por los monocitos y principalmente los polimorfonucleares, implica la activación del complejo multimérico NADPH oxidasa, generando anión superóxido, intermediarios reactivos del oxígeno, y H_2O_2 entre otros. Este estallido respiratorio es fundamental en la destrucción del patógeno fagocitado y las alteraciones en este proceso son la causa de la aparición de la Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) en la que el paciente presenta infecciones bacterianas y fúngicas a repetición. La EGC más frecuente (60%) es la ligada al cromosoma X producida por la mutación del gen que codifica para la gp91 phox. Sin embargo, existen otras formas autosómicas menos severas (Winkelstein et al., 2000) que implican la mutación de otros genes del complejo NADPH oxidasa.

Para la determinación del estallido respiratorio tradicionalmente se ha utilizado la técnica de la reducción de Nitroazul de tetrazolium (NBT), la cual se fundamenta en la determinación de la producción del anión súper-óxido en células fagocíticas el cual induce una reducción del Nitroazul de Tetrazolium generando cristales de formazan que se precipitan en el citoplasma celular. La observación microscópica permite posteriormente hacer un cálculo del porcentaje de células que presentan estos depósitos de azul de formazan. Esta metodología es semi-cuantitativa, poco sensible y susceptible de errores técnicos y conlleva a que los resultados finales dependan de la destreza del observador. Dada la subjetividad en la lectura e interpretación de la misma, se ha propuesto recientemente la utilización de métodos más sensibles y precisos que permitan diagnosticar no solo la EGC ligada a X, sino también las formas más leves autosómicas recesivas, dentro de los cuales se ha sugerido la Citometría de flujo multiparamétrica y la biología molecular.

La Citometría de flujo (CF), la cual ha venido siendo utilizada desde hace algunos años en el estudio de diversas patologías que implican o no la respuesta inmune, constituye actualmente una alternativa diagnóstica para este tipo de patologías. Jirapongsananuruk en el 2003, describe el ensayo de la Dihidrorodamina 123 en el diagnóstico de EGC, como alternativa sencilla, rápida y altamente sensible, que permite la evaluación de las diferentes formas genéticas de la enfermedad.

Los planteamientos anteriores, nos permiten proponer que la medición de DHR 123 por CF, puede servir como técnica de rutina para el diagnóstico de EGC. En el presente trabajo vamos a estandarizar el procedimiento con el fin de poderlo utilizar a mediano plazo en el estudio de pacientes con infecciones bacterianas y fúngicas a repetición.

4. REFERENTES CONCEPTUALES - MARCO TEÓRICO

Las células fagocíticas como neutrófilos y monocitos juegan un papel esencial en la defensa del hospedero contra patógenos microbianos. El estallido respiratorio de los fagocitos es producido por un complejo enzimático encargado de catalizar la formación de radical súper-óxido, especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido hipocloroso en el organismo, esta es la enzima adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH-oxidasa) (Jay et al., 2002). Este sistema comprende un complejo flavocitocromo b558 unido a membrana el cual esta constituido por una molécula de gp91 phox y dos moléculas de p22 phox, además de los factores citosólicos p47 phox, p67 phox, p40 phox y la pequeña GTPasa Rac2, que se traslocan a la membrana plasmática donde experimentan un proceso de ensamblaje que conforma el sistema enzimático activo. (Casales M., 2006)

Durante la activación de la NADPH oxidasa, los componentes ubicados en el citosol tienen que migrar a la membrana plasmática, que es donde ocurre el ensamblaje del complejo funcional para la conformación del sistema enzimático activo; este proceso implica fosforilaciones, traslocaciones y cambios conformacionales (Casales M., 2006; Groemping y Rittinger, 2005; Nauseef W., 2004) que tienen como consecuencia una serie de reacciones químicas para la formación de ion súper-

óxido, peróxido de hidrógeno, ion hidroxilo, e hipohaluros como el ácido hipocloroso que son los que van a actuar como agentes microbicidas (Robinson J, 2008).

La importancia en la actividad de la enzima NADPH oxidasa en la defensa del hospedero, se ve reflejada en una inmunodeficiencia primaria que afecta los fagocitos, un trastorno genético denominado Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC), causada por mutaciones en los genes que codifican para las sub-unidades antes mencionadas que conforman la NADPH oxidasa, y que se caracteriza por una elevada susceptibilidad a infecciones bacterianas y micóticas severas y recurrentes en pacientes de corta edad. Las mutaciones más comunes son los defectos en gp91 phox ligado a X (60% de los casos), mientras que los defectos Autosómicos Recesivos se presentan en el 40% de los casos, de los cuales el 30% de éstos se localiza en la sub-unidad p47 phox y las alteraciones en p67 phox, y p22 phox se presentan en el 5% de los casos (Jirapongsananuruk et al., 2003; Cos et al., 2004).

El diagnóstico de la Enfermedad Granulomatosa Crónica se hace mediante la demostración de la ausencia o disminución de la actividad de la NADPH oxidasa en neutrófilos estimulados. La técnica tradicional semi-cuantitativa es la reducción de Nitroazul de Tetrazolium (NBT), compuesto permeable a la membrana, soluble al agua, y de color amarillo, que al incubarse con dichas células y frente a un estímulo produce anión súper-óxido induciendo una reducción del Nitroazul de Tetrazolium y generando cristales de formazan de color azul insolubles que se van a precipitar en el citoplasma celular. Sin embargo esta técnica presenta limitaciones en cuanto a sensibilidad e interpretación visual por ejemplo cuando la cantidad producida de anión súper-óxido es poca, la cantidad de cristales de formazan también lo será, dificultando así la evaluación microscópica, haciendo con esto que esta técnica dependa directamente de la experticia y destreza del observador.

En la actualidad esta técnica sigue siendo utilizada por algunos laboratorios en la rutina clínica, no obstante, dada la subjetividad en la lectura e interpretación de la misma ha venido influyendo en que ésta sea reemplazada por la utilización de métodos más precisos y rápidos como la CF. Esta técnica se fundamenta en que las células polimorfo nucleares (PMN) se estimulan de forma artificial, y se incuban con un compuesto no fluorescente el cual ingresa al interior de la célula fagocítica y es oxidado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la NADPH oxidasa, y transformado en un compuesto fluorescente que va a ser detectado por el citómetro de flujo.

Richardson en 1998, realizó un estudio comparativo entre la utilización de la CF con Dihidrorodamina (DHR) y la cuantificación por el test NBT para la medición del estallido respiratorio, concluyendo con esto que la determinación del estallido respiratorio se ha venido dificultando con las técnicas convencionales de quimioluminiscencia por reducción de Citocromo C en el laboratorio, y que los ensayos realizados por CMF con DHR muestran una buena correlación con los de NBT, siendo la CF un método rápido y sencillo en donde los resultados son arrojados en menor tiempo, además que con la DHR, se puede hacer una clara diferenciación entre las poblaciones celulares estimuladas y no estimuladas.

Richardson en 1998 y Wu et al., en 2005 coinciden en la importancia que tiene la cantidad de la muestra utilizada para evaluar el estallido respiratorio, ya que con los métodos tradicionales, la cantidad de la muestra es alta respecto a la utilizada mediante la CF (0.1 mL); y más teniendo en cuenta que los pacientes son principalmente niños recién nacidos o de corta edad.

Existen diferentes fluorocromos utilizados para la evaluación de la producción de ROS como son 2',7'-diclorofluoresceín diacetato (DCFH), hidroetidina (HE) y dihidrorodamina 123 (DHR); sin embargo Walrand en 2003 (10) describe que la DHR 123 al ser oxidada a Rodamina 123, es el fluorocromo más efectivo para determinar el estallido respiratorio en granulocitos mediante CF. Además porque como lo describe Jirapongsananuruk en el 2003, con este fluorocromo se pueden

diferenciar las dos variables de EGC, ligada a X y autosómica recesiva, a diferencia de la NBT que solo identifica la forma ligada a X.

Un estudio realizado por Campos et al., en el 2007 evalúa diferentes concentraciones de 123-dihidrorodamina para la determinación del estallido respiratorio en once voluntarios sin antecedentes de EGC, analizados por CF. En sus resultados, obtuvieron que la mejor concentración de DHR 123, entre las tres diferentes que evaluaron, era la de 3.0 µg/ml, ya que con esta se logró discriminar claramente el ensayo estimulado del no estimulado, todo esto medido mediante CF.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar la técnica de la 123-dihidrorodamina, por Citometría de flujo, para la determinación de la fagocitosis y el estallido respiratorio en poblaciones de monocitos y polimorfonucleares de individuos sanos.

Objetivos Específicos

1. Evaluar las condiciones óptimas necesarias para lisar los glóbulos rojos presentes en la preparación sin alterar la actividad oxidativa de las células fagocíticas.
2. Determinar la concentración mínima necesaria de Dihidrorodamina que permita detectar variaciones de la actividad de la enzima en diferentes condiciones de activación.
3. Determinar las condiciones óptimas de activación de la NADPH oxidasa intracelular utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en células fagocíticas de individuos normales.
4. Evaluar la influencia del tipo de anticoagulante utilizado, en la medición de la actividad oxidativa.

6. MATERIALES Y METODOS:

La evaluación del estallido respiratorio mediante Citometría de flujo, se fundamenta en que los fagocitos especialmente los polimorfo nucleares (PMN) se estimulan de forma artificial mediante el forbol 12-miristato 13-acetato que actúa como análogo del diacilglicerol, y que mediante la Dihidrorodamina 123, compuesto no fluorescente que ingresa libremente al interior de la célula fagocítica, es oxidado por las especies reactivas de oxígenos (ROS) producidas por la NADPH oxidasa, y es transformado en un compuesto fluorescente, Rodamina 123, que va a ser detectado por el citómetro de flujo.

Población y muestra

Se utilizaron muestras de sangre periférica de 9 personas voluntarias (3 hombres y 6 mujeres), sanas, saludables, sin antecedentes de Enfermedad Granulomatosa Crónica, que oscilaban entre los 20 y 30 años de edad. A estas muestras se les realizó un cuadro hemático previo al montaje, para determinar que los valores, principalmente de PMNs y monocitos estuvieran dentro de los rangos normales, y fueron analizadas antes de 4 horas pasada la toma de la muestra.

Reactivos

- i. Buffer de Lisis: El agente lisante de glóbulos rojos es el Buffer de amonio, que esta compuesto por NH_4Cl , KHCO_3 , EDTA y agua estéril. Para la preparación del stock de 1 litro a concentración 10x, se pesaron: NH_4Cl : 89,9gr, KHCO_3 : 10gr, EDTA: 370mg, se completó

con agua estéril hasta llegar a 1 litro y se almacenó a una temperatura entre los 2° - 8° C; a partir de este se preparó la solución de trabajo de concentración 1x.

Para la preparación de los stocks de 10x de cada uno de los componentes del buffer de amonio por separado, se tomaron 3 frascos previamente esterilizados, y en cámara de flujo laminar se prepararon 250 mL de cada uno de los 3 stocks (correspondientes a NH₄Cl, KHCO₃, EDTA); para esto se pesaron: NH₄Cl: 22,5gr, KHCO₃: 2,5gr, EDTA: 92,5mg, y cada stock se completó con agua estéril hasta llegar a 250mL; se almacenaron en oscuridad a una temperatura entre los 2° - 8° C. A partir de cada stock se preparó la solución de trabajo 1x de igual manera en cámara de flujo laminar.

La solución de trabajo 1x para los dos casos (stock de un litro, y stocks por separado de cada componente del buffer) era descartada diariamente luego de ser utilizada.

- ii. Fluorocromo: La Dihidrorodamina 123 es un fluorocromo utilizado para medir la producción de ROS intracelular, entra libremente a través de la membrana celular y es directamente oxidada a Rodamina123 que emite la señal de fluorescencia verde que es monitoreada por el citómetro de flujo usando la longitud de onda de excitación y emisión de 500 y 536nm respectivamente y medido por el canal de fluorescencia FL1. Para este trabajo se empleó dihidrorodamina123 (DHR123) (frasco 1mg, GYG Sucesores) reconstituido con 1mL de PBS, quedando un stock de concentración final 1mg/mL, la cual fue alicuotada en 50 viales de 20µL cada uno y conservarlos en oscuridad y a una temperatura entre los 2° - 8° C. Para cada experimento se utilizó un vial diferente, el cual era descongelado en oscuridad y en frío, y a partir de éste se prepararon las tres diferentes concentraciones a evaluar 1, 3, y 5µg/mL. Una vez utilizado el vial este era descartado, y para el próximo experimento se utilizaba uno nuevo.
- iii. Activador: Como activador celular artificial se utilizó forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (vial 1mL, ARC Análisis) que actúa como un análogo del diacilglicerol. Este se reconstituyó en 1mL de PBS bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo, quedando un stock de concentración final de 1mg/mL. A partir de este se alicuotó en 50 viales de 20µL cada uno y se conservaron en oscuridad y a una temperatura entre los 2° - 8° C. Para cada experimento se utilizó un vial diferente, el cual era descongelado en oscuridad y en frío, y a partir de éste se prepararon las tres diferentes concentraciones a evaluar 1, 5 y 10µg/mL. Una vez utilizado el vial este era descartado, y para el próximo experimento se utilizaba uno nuevo.

Citómetro de Flujo

El citómetro se calibró con perlas fluorescentes que permitieron la normalización de los resultados de fluorescencia aumentando el grado de confiabilidad y certitud de la técnica, y permitiendo comparar resultados de diversos individuos analizados en días diferentes, dado que sirvió como patrón interno de la técnica. Las muestras solo fueron comparadas si las perlas fluorescentes presentaban la misma Intensidad media de fluorescencia y coeficientes de variación cada vez que se hizo la lectura.

Las muestras se procesaron y fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur, usando el programa de adquisición CellQuest y el programa de análisis PAINT-A-GATE, con una adquisición mínima de 10.000 eventos celulares para el análisis de viabilidad celular y 100.000 eventos celulares para el análisis del estallido respiratorio. Estas adquisiciones se efectuaron en función de los parámetros de tamaño (*Forward Scatter* –FSC-) versus granularidad (*Side Scatter* –SSC-). Para el análisis se utilizó el programa CellQuest y Paint-A-Gate, seleccionando las poblaciones celulares de neutrófilos, eosinófilos, y monocitos; analizándolas de forma separada. Cada uno de los resultados se expresa en términos de canales medios de fluorescencia.

Los resultados fueron reportados como intensidad de fluorescencia e Índice de fluorescencia, calculado como la relación entre la intensidad del canal medio de fluorescencia geométrica de la muestra estimulada con PMA y la intensidad del canal medio de fluorescencia geométrica de las

células sin estimular. Los resultados se reportaron para cada población en forma separada (monocitos, PMN y linfocitos) seleccionada en el citómetro por sus características de talla (FSC) y granulometría (SS).

Diseño experimental

A partir de los objetivos planteados, se evaluaron tres variables principalmente:

- a) Concentración de DHR: Se evaluaron tres diferentes concentraciones de DHR123 (1, 3, y 5µg/mL) para determinar cual era la concentración mínima que permita detectar la actividad de la enzima. Para esto se tuvieron en cuenta los criterios de porcentaje de celularidad total, canales medios de fluorescencia (CMF) y la capacidad de discriminación de las distintas poblaciones leucocitarias en SP (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos) teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Forward Scatter –FSC-*) versus granularidad (*Side Scatter –SSC-*).
- b) Concentración de PMA: Se evaluaron las condiciones óptimas para el activador forbol 12-miristato 13-acetato, comparando tres diferentes concentraciones de éste (1, 5 y 10µg/mL) a una concentración constante de DHR, y se determinó si la concentración de este activador influía principalmente en tres aspectos: el porcentaje de celularidad total, canales medios de fluorescencia (CMF) y además la adecuada discriminación de las poblaciones celulares, teniendo en cuenta tanto los parámetros de tamaño (*Forward Scatter –FSC-*) versus granularidad (*Side Scatter –SSC-*) como su ubicación en los histogramas.
- c) Uso de anticoagulante: Se evaluó si el tipo de anticoagulante afectaba de alguna manera el estallido respiratorio. Para esto se compararon dos anticoagulantes, el ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) y la heparina de litio, teniendo en cuenta que el primero actúa mediante un efecto quelante sobre el ión calcio (Ca^{2+}), y el segundo impidiendo que la protrombina se transforme en trombina.
Para esto, a las personas voluntarias se les tomaron dos tubos de sangre, uno con el anticoagulante EDTA y el otro con heparina, para realizar montajes simultáneos con los dos anticoagulantes, a concentraciones constantes tanto de PMA (1µg/mL) como de DHR123 ((1µg/mL)), y se evaluó si el uso del anticoagulante influía en el estallido respiratorio de los fagocitos, mediante la medición de la actividad oxidativa por Citometría de flujo por el CMF.

7. RESULTADOS

Análisis de las condiciones óptimas para lisar eritrocitos de sangre periférica (SP) normal con Buffer de amonio

El buffer de lisis se preparó como se describe en materiales y métodos y se conservó como un stock de 10x que fue llevado a concentración final de 1x el día del análisis. Como se observa en la figura 1, encontramos que la estabilidad del buffer se disminuía, lo que se reflejaba en una pérdida de forma progresiva en la capacidad de lisar los glóbulos rojos. En la Figura 1, se observa como el día 1 de la preparación del reactivo la celularidad de la muestra es del 88% pero luego de 6 días, es del 55%. Dada la pérdida de la función lisante del buffer, se optó por preparar por separado stocks de cada uno de los componentes del reactivo de lisis a 10x, en condiciones de esterilidad, para luego preparar la solución de trabajo 1x también estéril, justo antes de su uso. Los stocks de cada componente del buffer de amonio, se almacenaron en oscuridad a una temperatura de 2 a 8 C°. La figura 2 muestra que el buffer de lisis se mantiene estable cuando los componentes están separados y que la solución de uso es activa preparada diariamente, aún después de 6 días de

preparada la solución stock. Con estas condiciones se logra optimizar la función de lisis, con un alto porcentaje de celularidad.

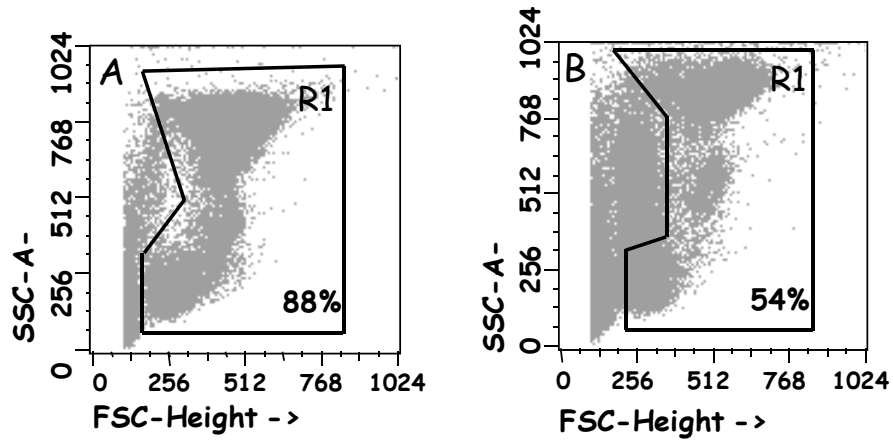


Figura 1. Pérdida de la capacidad lisante del Buffer de amonio preparado en un solo stock de 1 litro (10x): Análisis de la celularidad de muestras de SP lisadas con Buffer de Amonio en un solo stock de 1 litro (10x). El análisis del porcentaje de celularidad se inicia realizando una selección de los leucocitos según los parámetros de tamaño (*forward scatter* –FSC-) y la complejidad (*side scatter* –SSC) (región R1), eliminando del análisis los restos celulares y células muertas (eventos de color gris fuera de la región R1). En el panel A se representa una muestra de SP lisada con el Buffer de lisis recién preparado (celularidad aproximada del 88%) y en el panel B una muestra de SP lisada con el Buffer a los 7 de preparación (celularidad aproximada del 54%).

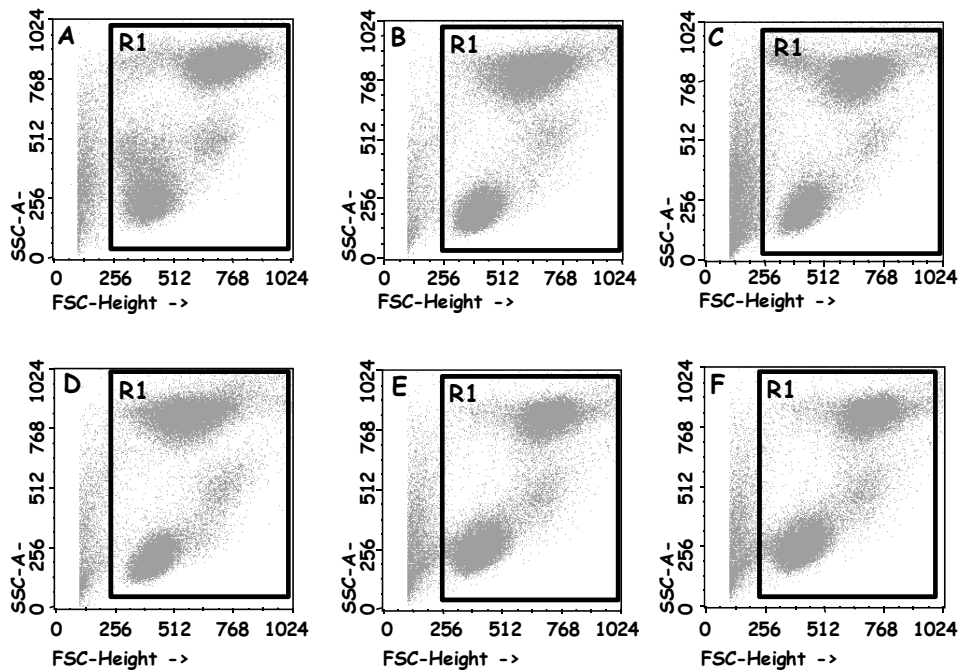


Figura 2. Estabilidad de la actividad lisante del buffer de amonio preparando sus componentes en stocks de 10x por separado: Análisis de la celularidad de muestras de SP

lisadas con Buffer de Amonio en diferentes stocks (10x). El análisis del porcentaje de celularidad se realiza mediante selección de los leucocitos según los parámetros de tamaño (*forward scatter* – FSC-) y la complejidad (*side scatter* –SSC) (región R1), eliminando los restos celulares y células muertas (eventos de color gris fuera de la región R1). En los paneles A-F se representa una muestra de SP lisada en diferentes tiempos post-preparación del Buffer (desde el día de preparación hasta el día 6). En todos los periodos de tiempo analizados se obtuvo una celularidad de la muestra superior al 90%.

Determinación de la concentración óptima de uso de la DHR 123 en SP normal

Con el fin de identificar la concentración adecuada del fluorocromo DHR123 en muestras de SP normal para su posterior uso en combinación con la PMA, se ensayaron tres concentraciones diferentes del reactivo: 1, 3, y 5µg/mL. En este análisis se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de celularidad total, canales medios de fluorescencia (CMF) de DHR123 y la capacidad de discriminación de las distintas poblaciones leucocitarias en SP (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos), en condiciones de no estimulación (tratamiento de la SP sólo con DHR123).

Respecto a los valores en los porcentajes de celularidad total obtenidos con las distintas concentraciones de DHR123 respecto a la SP lisada sin ningún tratamiento (sin DHR123), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$), observando que la celularidad total de las muestras es alta (figura 3). De esta manera se hace evidente que el tratamiento de las muestras de SP con DHR no tiene un efecto tóxico importante que pueda alterar la celularidad total. Sin embargo se observa que la concentración de DHR con valores de celularidad similares a los obtenidos con la sangre lisada sin tratamiento corresponde a la de 1µg/mL por lo que se decide emplear esta concentración para la estandarización del reactivo DHR123 (media: $91,6\% \pm 3,3\%$, rango: 86%-94% versus media: $93,3\% \pm 2,6\%$, rango: 90%-97%; $p=0,278$).

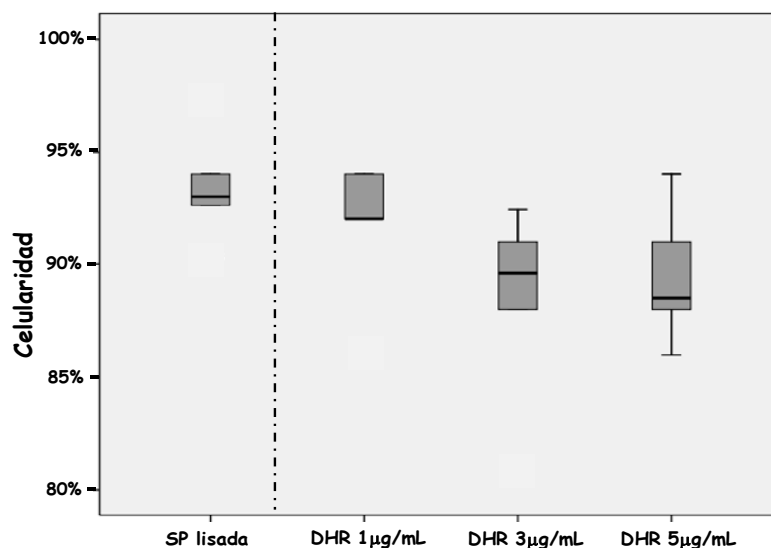


Figura 3. El porcentaje de celularidad de las muestras de SP no se ve afectada por el tratamiento con distintas concentraciones de DHR: Análisis del porcentaje de celularidad de muestras de SP tratadas con diferentes concentraciones de DHR123 respecto a la SP lisada (no tratada con DHR123). No se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de celularidad en las distintas concentraciones de DHR123 respecto al control (SP lisada) ($p>0,05$; respectivamente.)

Por otra parte, el análisis de la discriminación adecuada de las diferentes poblaciones leucocitarias de SP en relación a las distintas concentraciones de DHR123 utilizadas, se realizó teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Forward Scatter* –FSC-) versus granularidad (*Side Scatter* –SSC-), encontrando que estas poblaciones se discriminan adecuadamente (figura 4).

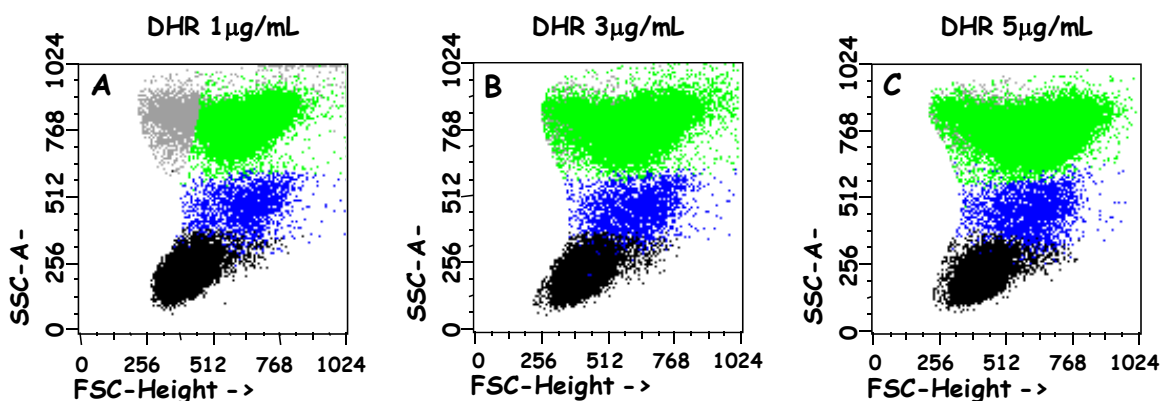


Figura 4. La distribución de las poblaciones celulares de SP no se ve afectada por el tratamiento con diferentes concentraciones de DHR123: Discriminación de poblaciones leucocitarias de SP tratadas con diferentes concentraciones de DHR123 (Panel A: 1µg/mL; Panel B: 3µg/mL y Panel C: 5µg/mL). En los paneles A-C se representan los parámetros de tamaño (*forward scatter* –FSC-) y la complejidad (*side scatter* –SSC-) identificando eosinófilos (eventos de color gris): FSC/SSC alto; neutrófilos (eventos de color verde): FSC/SSC alto; monocitos (eventos de color azul): FSC/SSC intermedio y linfocitos (eventos de color negro): FSC/SSC bajo.

Al comparar los CMF obtenidos en las cuatro poblaciones leucocitarias sin tratamiento (sólo lisis con buffer de amonio) respecto a las tratadas con diferentes concentraciones de DHR123, se observan valores estadísticamente significativos en las muestras tratadas ($p < 0,05$), siendo el tratamiento con DHR123 a 5 µg/mL el que mostró los valores más altos de CMF en todas las poblaciones celulares respecto a las concentraciones de 1 y 3 µg/mL (tabla 1, figura 5). La Figura 6 nos permite observar no solo la influencia que tiene el tratamiento de DHR123 en el CMF de las cuatro poblaciones celulares sin estímulo, sino también la adecuada discriminación de estas poblaciones en los histogramas. La ubicación de los leucocitos en el histograma (eje X), indica el grado de actividad basal de la NADPH oxidasa en las células. Los linfocitos, debido al bajo grado de actividad de la enzima NADPH oxidasa, se ubican en el histograma entre los logaritmos de $10^0 - 10^1$; siendo este un criterio importante para la determinación del uso de la concentración de 1µg/mL para la DHR123.

Tabla 1. Análisis de los CMF de las diferentes poblaciones leucocitarias de SP lisada y SP tratada con DHR123 (sin estimular) en distintas concentraciones.

	CANAL MEDIO FLUORESCENCIA NEUTRÓFILOS	CANAL MEDIO FLUORESCENCIA EOSINOFILOS	CANAL MEDIO FLUORESCENCIA MONOCITOS	CANAL MEDIO FLUORESCENCIA LINFOCITOS	p
Sangre Lisada	4,7 ± 0,3	13,9 ± 1,1	4,9 ± 0,5	2,2 ± 0,16	0,043*
DHR 1µg/mL	8,6 ± 1,7	17,6 ± 1,9	15,9 ± 5,9	3 ± 0,56	
DHR 3µg/mL	20,5 ± 5,8	27,6 ± 4,1	41,4 ± 14,6	5,5 ± 1,02	
DHR 5µg/mL	35,6 ± 9,7	35,3 ± 4,2	52,3 ± 14,9	8,9 ± 1,43	

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

*p<0,05 respecto a la sangre lisada.

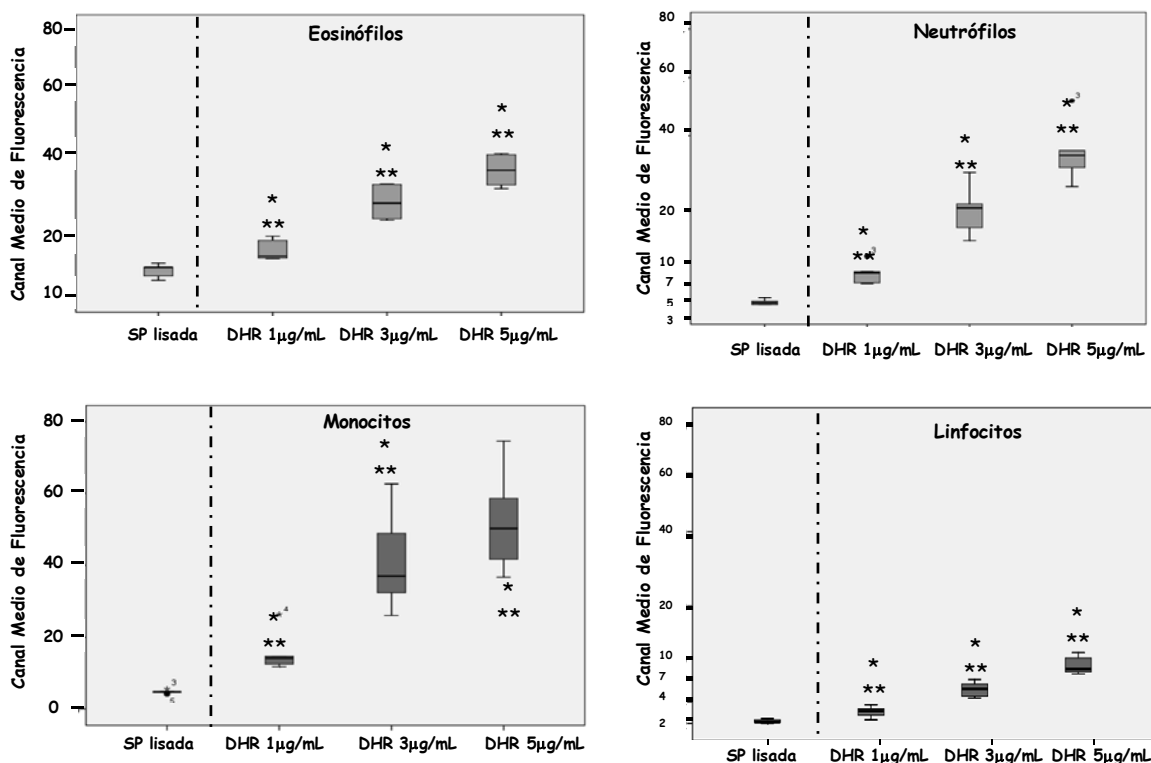


Figura 5. El tratamiento con DHR123 a diferentes concentraciones permite una discriminación de fluorescencia midiendo el CMF de las cuatro poblaciones leucocitarias: Análisis de los CMF de las diferentes poblaciones leucocitarias de SP tratadas con distintas concentraciones de DHR123 respecto a la SP sin tratamiento (SP lisada).

*p<0,05 al comparar DHR 1, 3 y 5 µg/mL vs SP lisada; **p<0,05 al comparar las distintas concentraciones de DHR123 entre sí.

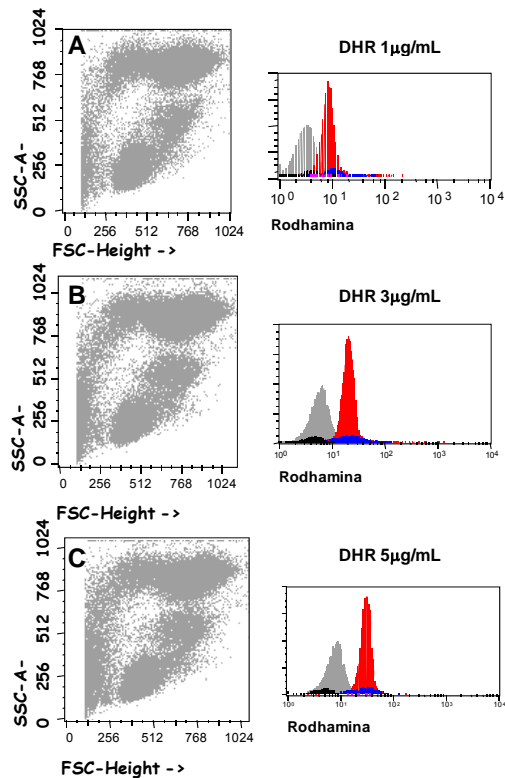


Figura 6. El tratamiento con DHR123 a diferentes concentraciones permite detectar cambios en el CMF de las cuatro poblaciones leucocitarias: Análisis de los histogramas del comportamiento de las poblaciones leucocitarias tratadas con DHR123 (Panel A: 1µg/mL; Panel B: 3µg/mL; Panel C: 5µg/mL) En los histogramas se observa las poblaciones leucocitarias (Gris: Linfocitos; Azul: Monocitos; Rojo: Neutrófilos; Negro: Eosinófilos); indicando en el eje “X” el grado de estímulo de las poblaciones celulares (desplazamiento hacia la derecha); y el eje “Y” representa el número de eventos ocurridos.

Dado que el uso de la concentración más baja de DHR123 (1µg/mL) permite observar diferencias a nivel basal, se escogió preliminarmente como la concentración de trabajo a utilizar a futuro.

Determinación de la concentración óptima de uso del PMA en combinación con DHR123 en muestras de SP normal

Para determinar las condiciones óptimas de activación de la NADPH oxidasa con el estímulo PMA, se tuvieron en cuenta los mismos criterios de elección descritos anteriormente en el análisis de DHR123: porcentaje de celularidad total, canales medios de fluorescencia y adecuada discriminación de poblaciones celulares.

En la figura 7 se muestra el análisis de la celularidad en relación a los diferentes tratamientos con PMA y DHR123, respecto a la sangre tratada únicamente con buffer de amonio. Los resultados obtenidos, muestran que hay diferencias significativas entre la sangre lisada y los diferentes tratamientos con PMA ($p < 0,05$), concluyendo que la PMA a diferentes concentraciones si afecta la celularidad de la muestra. Sin embargo la concentración que menos altera la celularidad, y presenta mayor similitud con la celularidad de la sangre lisada es la de concentración de 1µg/mL.

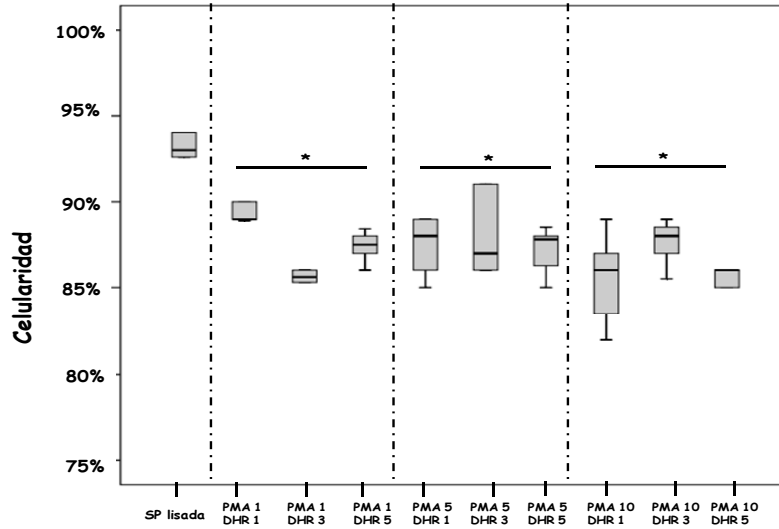


Figura 7. El tratamiento con PMA a diferentes concentraciones junto con DHR si afecta la celularidad: Análisis del porcentaje de celularidad de muestras de SP tratadas con diferentes concentraciones de DHR123 y de PMA respecto a la SP lisada. Se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de celularidad en las distintas concentraciones de DHR123 y PMA respecto al control (SP lisada) ($p < 0,05$; respectivamente.)

Por otra parte, al comparar los CMF obtenidos en las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con diferentes concentraciones de PMA pero a una concentración constante de DHR123 (Tabla 4), se observa que no existen diferencias significativas al comparar las distintas concentraciones de PMA entre sí ($p > 0,05$), demostrando que la concentración de PMA no influye en el CMF (la cantidad PMA no es directamente proporcional al grado de estímulo de las poblaciones celulares).

La Figura 8 muestra el comportamiento de las poblaciones leucocitarias tratadas con diferentes concentraciones de PMA en combinación con DHR123. El desplazamiento de las poblaciones celulares hacia la derecha, indica el grado de estímulo de las células luego del tratamiento con PMA. La ubicación de las poblaciones leucocitarias en el histograma (eje X), depende de la cantidad y de la presencia o no de la enzima NADPH oxidasa. Para el caso de los linfocitos, debido al bajo grado de actividad de la enzima NADPH oxidasa, tienen una ubicación en el histograma entre los logaritmos de $10^0 - 10^1$; los monocitos entre 10^1 y 10^2 ; neutrófilos 10^3 , mientras que los eosinófilos debido a que presentan mayor cantidad de la enzima NADPH oxidasa que los neutrófilos (Someya et al., 1997) se ubican entre $10^3 - 10^4$.

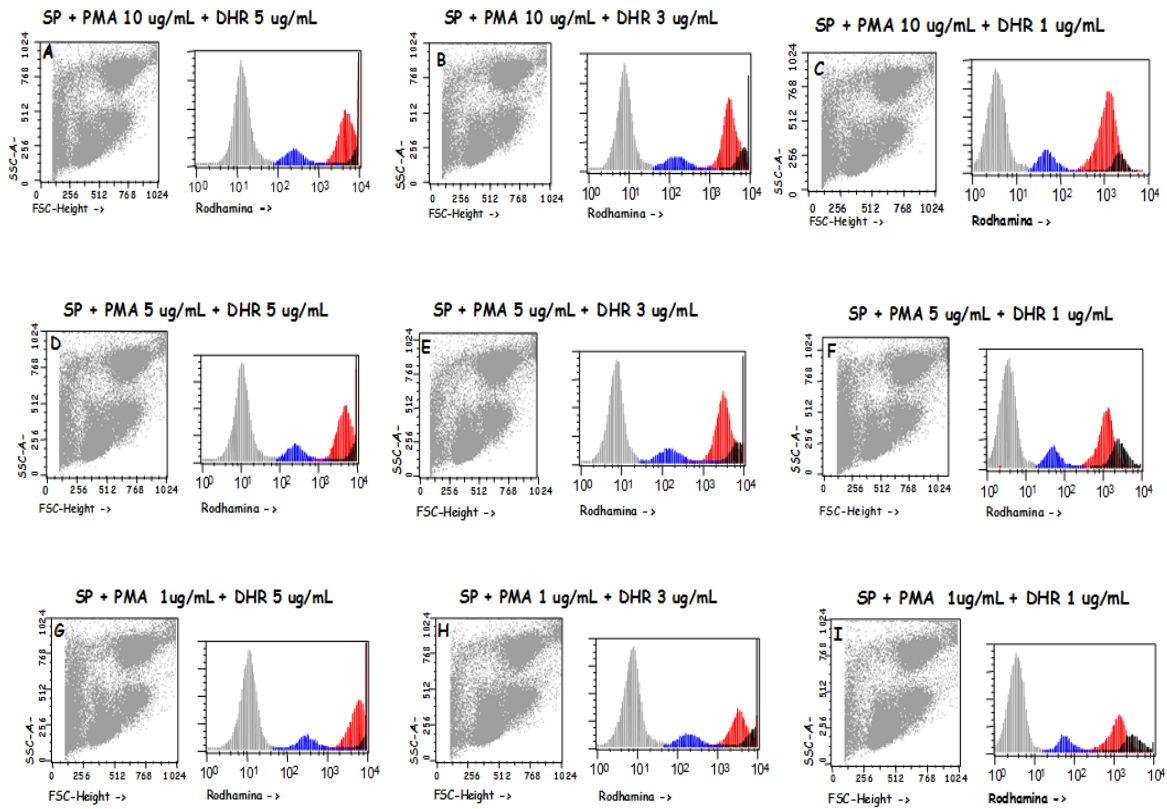


Figura 8. Análisis de histogramas del comportamiento de las poblaciones leucocitarias tratadas con PMA (1, 3 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y DHR (1, 3 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En los histogramas se observan las poblaciones leucocitarias (Gris: Linfocitos; Azul: Monocitos; Rojo: Neutrófilos; Negro: Eosinófilos); indicando en el eje "X" el grado de estímulo de las poblaciones celulares (desplazamiento hacia la derecha); mientras que el eje "Y" representa el número de eventos ocurridos.

En la Tabla 2 se resume la media tanto de los porcentajes de celularidad como de los canales medios de fluorescencia de los cinco experimentos realizados con diferentes concentraciones de fluorocromo DHR123 (1, 3, y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como del activador PMA (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En este cuadro es donde se ve más claramente que la concentración adecuada en razón de celularidad, y de CMF para la DHR123 es de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así mismo para el PMA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 2. Análisis de los porcentajes de celularidad total y CMF de las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con las diferentes concentraciones tanto del activador celular PMA (1, 5 y 10µg/mL) como del fluorocromo DHR 123 (1, 3 y 5µg/mL)

		DHR 5µg/mL	DHR 3µg/mL	DHR 1µg/mL
PMA 10µg/mL	% Celularidad	84,5 ± 3,7	87,1 ± 1,4	87,4 ± 0,9
	CMF Neutrófilos	6865,5 ± 868,8	4708,7 ± 976,7	1652,9 ± 564,7
	CMF Eosinófilos	1521,1 ± 323,6	994,2 ± 189,2	291,4 ± 103,1
	CMF Monocitos	403,7 ± 91,2	207,5 ± 40,9	66,3 ± 18,4
	CMF Linfocitos	14,1 ± 1,5	8,4 ± 1,05	3,6 ± 0,38
PMA 5µg/mL	% Celularidad	87,6 ± 1,4	88,2 ± 2,6	84,6 ± 3,8
	CMF Neutrófilos	6626,4 ± 1168,4	4448,9 ± 972,8	1731,6 ± 554,1
	CMF Eosinófilos	1480,9 ± 474,7	884,4 ± 225,6	289,7 ± 102,6
	CMF Monocitos	382,3 ± 68,4	219,1 ± 51,3	73,5 ± 25,3
	CMF Linfocitos	13,3 ± 1,7	9,2 ± 3,6	3,6 ± 0,65
PMA 1µg/mL	% Celularidad	85,5 ± 2,8	87,4 ± 1,8	90,1 ± 2
	CMF Neutrófilos	6375,7 ± 704,5	4062,1 ± 827,8	1392,4 ± 299,3
	CMF Eosinófilos	1161,8 ± 550,7	649,1 ± 225,1	223,3 ± 23,9
	CMF Monocitos	372,1 ± 126,9	222,2 ± 53,7	74,1 ± 26,9
	CMF Linfocitos	11,7 ± 2,3	7,7 ± 0,82	3,6 ± 0,46
SANGRE PERIFÉRICA	% Celularidad	89,6 ± 3,1	88,3 ± 4,7	91,6 ± 3,3
	CMF Neutrófilos	35,6 ± 9,7	20,4 ± 5,8	8,6 ± 1,7
	CMF Eosinófilos	35,6 ± 4,2	27,6 ± 4,1	17,6 ± 1,9
	CMF Monocitos	52,3 ± 14,9	41,4 ± 14,6	15,8 ± 5,9
	CMF Linfocitos	8,9 ± 1,4	5,5 ± 1,02	3,02 ± 0,54

Tabla 2. Resumen de las concentraciones ensayadas tanto de PMA (1, 5 y 10µg/mL) como de DHR (1, 3 y 5µg/mL) identificando el porcentaje de celularidad y el canal medio de fluorescencia (CMF) en las poblaciones celulares de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos.

Evaluación de la influencia del tipo de anticoagulante en el estallido respiratorio

Para determinar si el tipo de anticoagulante utilizado (EDTA y Heparina) en muestras de SP influye en la medición de la actividad oxidativa del estallido respiratorio, se evaluaron dos variables: el porcentaje de celularidad total y el CMF en las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con DHR123 (1 μ g/mL) y PMA (1 μ g/mL).

El análisis de porcentaje de celularidad en SP lisada, SP tratada con DHR (1 μ g/mL) y SP tratada con PMA (1 μ g/mL) y DHR (1 μ g/mL) entre los anticoagulantes EDTA y Heparina, muestra que no hay diferencias significativas en los porcentajes de celularidad total entre los dos anticoagulantes ($p > 0,05$). (Figura 9)

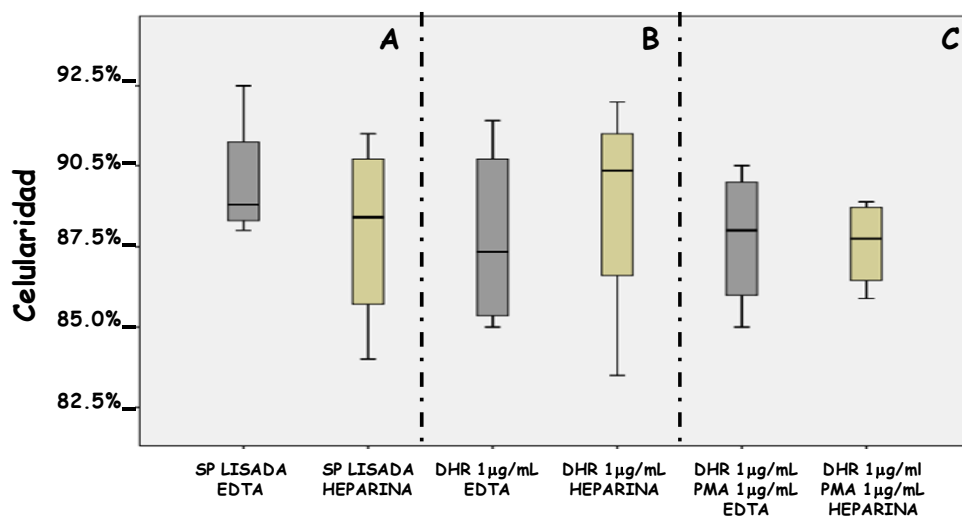


Figura 9. Los anticoagulantes EDTA y Heparina, no alteran el porcentaje de celularidad total: Análisis del porcentaje de celularidad total en muestras de SP anticoaguladas con EDTA y Heparina. Panel A: SP lisada; Panel B: SP tratada con DHR123 (1 μ g/mL); Panel C: SP tratada con PMA (1 μ g/mL) y DHR123 (1 μ g/mL). No se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de celularidad entre los dos anticoagulantes utilizados ($p > 0,05$)

En las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con DHR 123 (1 μ g/mL) y PMA (1 μ g/mL), el análisis comparativo del CMF entre los anticoagulantes EDTA y Heparina, muestra que no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos ($p > 0,05$). De esta manera se concluye que, contrario a lo que se esperaba, el tipo de anticoagulante no altera o interviene en la actividad oxidativa del estallido respiratorio de células fagocíticas (Tabla 3, Figura 9).

Tabla 3. Análisis de los CMF de las diferentes poblaciones leucocitarias de SP lisada, SP tratada con DHR 1 µg/mL, y SP tratada con PMA 1µg/mL y DHR 1µg/mL; entre los anticoagulantes EDTA y Heparina.

	EDTA				HEPARINA			
	Canal medio fluorescencia Neutrófilos	Canal medio fluorescencia Eosinófilos	Canal medio fluorescencia Monocitos	Canal medio fluorescencia Linfocitos	Canal medio fluorescencia Neutrófilos	Canal medio fluorescencia Eosinófilos	Canal medio fluorescencia Monocitos	Canal medio fluorescencia Linfocitos
SP Lisada	4,7 ± 0,5	14,8 ± 1,04	4,5 ± 0,9	2,1 ± 0,4	5,1 ± 0,5	16,2 ± 2,8	4,4 ± 0,5	2 ± 0,3
DHR 1µg/mL	6,6 ± 1,6	17,4 ± 0,3	13,6 ± 3,1	2,7 ± 0,6	8,5 ± 0,87	18,4 ± 2,1	16,8 ± 3,5	2,8 ± 0,45
DHR 1µg/mL + PMA1µg/mL	2310 ± 638,6	365,3 ± 60,4	58,1 ± 10,7	3,6 ± 0,67	1720,5 ± 450,2	315,1 ± 68,7	53,4 ± 9,3	3,7 ± 0,98

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

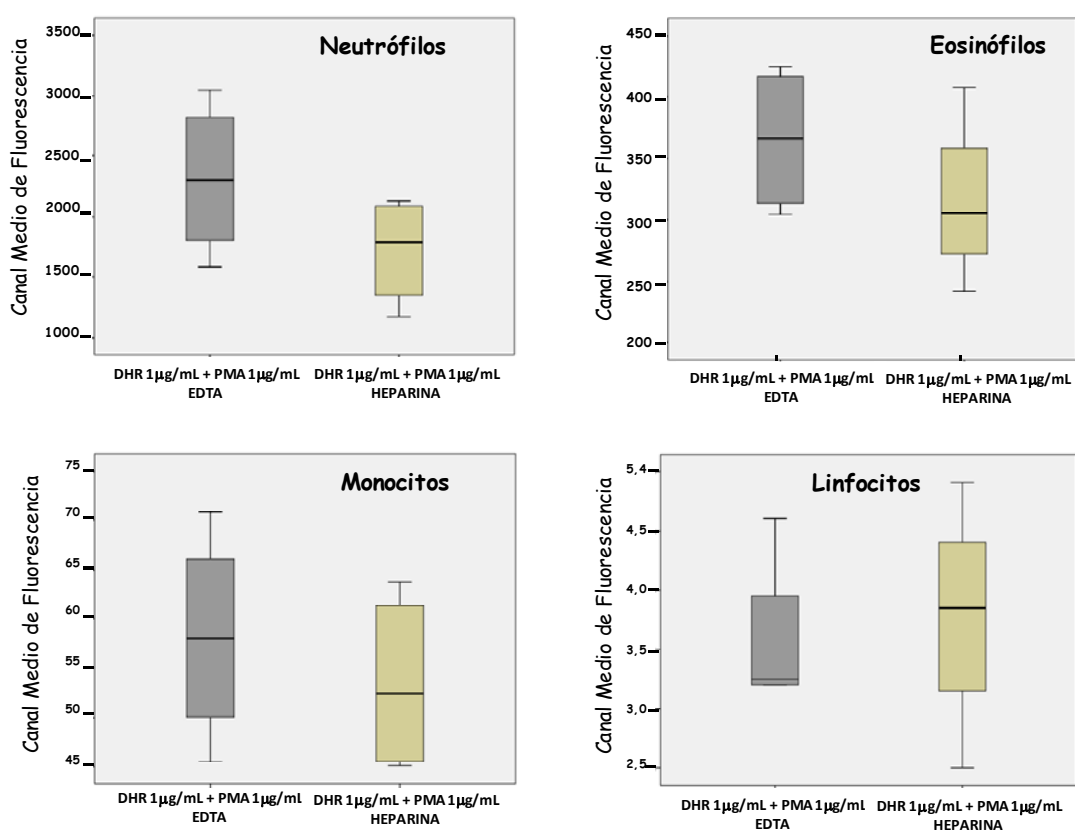


Figura 10. Los anticoagulantes EDTA y heparina, no influyen en la actividad oxidativa del estallido respiratorio: Análisis de los CMF de las diferentes poblaciones leucocitarias de SP tratadas con DHR (1µg/mL) y PMA (1µg/mL), entre muestras anticoaguladas con EDTA y Heparina. No hay diferencias significativas en el CMF entre los dos anticoagulantes ($p < 0,05$)

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el uso de los diferentes reactivos utilizados para el análisis del estallido respiratorio mediante la técnica de Citometría de Flujo, tales como el buffer de lisis, el fluorocromo utilizado, el activador celular y el tipo de anticoagulante, influyen directamente en la adecuada interpretación de los resultados de la actividad oxidativa de la NADPH oxidasa.

Uno de los parámetros importantes en el adecuado análisis del estallido respiratorio en células fagocíticas, es una lisis de glóbulos rojos apropiada, en donde se obtenga principalmente un porcentaje de celularidad total alta. En nuestro caso se utilizó el Buffer de lisis de amonio, el cual preparado en un stock 10x de un litro, al cabo de 7 días de preparado iba perdiendo la actividad lisante, razón por la cual se determinó preparar stocks por separado de cada compuesto del buffer de amonio (10x) en condiciones de esterilidad, y preparar a partir de éstas el buffer de trabajo diario 1x bajo las mismas condiciones. Con esto se logró optimizar y estabilizar su función, dando como resultado un alto porcentaje de celularidad en las muestras lisadas (>90% celularidad total) luego de 6 días.

Por otro lado, otro factor importante es el fluorocromo, el cual juega un papel importante para la medición del estallido respiratorio mediante la técnica de Citometría de flujo. Para esta técnica se han empleado diversos fluorocromos que permiten medir la actividad oxidativa de las células fagocíticas tales como 2',7'-dichlorofluoresceína diacetato (DCFH), Diaminofluoresceína (DAF), N-Acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, 7-Hidroxi-6-metoxi-coumarina (Escopoletina), hidroetidina (HE), entre otros (Freitas et al., 2009). Pero desde que la DHR123 fue utilizada por primera vez como un indicador del estallido respiratorio en 1988 por Rothe et al., se ha convertido en el fluorocromo de elección para dicho análisis, debido a que se ha demostrado que es el más efectivo para determinar el estallido respiratorio en granulocitos mediante Citometría de flujo (Vowells et al., 1995; Walrand et al., 2003).

En este estudio se determinó la concentración óptima de uso de la DHR123 teniendo en cuenta los criterios de porcentaje de celularidad, canal medio de fluorescencia (CMF) y capacidad de discriminación celular en las poblaciones leucocitarias de sangre periférica (SP). A partir de los resultados de porcentaje de celularidad post-tratamiento con las diferentes concentraciones de DHR123 (1, 3 y 5 µg/mL) se hace evidente que el tratamiento de las muestras de SP con DHR123 no tiene un efecto de citotoxicidad importante que pueda alterar la celularidad total ($p > 0,05$), pero la concentración en la que había una menor muerte celular y por ende un porcentaje de celularidad total más alto, similar al de SP lisada (sin ningún tratamiento) era la de 1 µg/mL.

Además, al comparar los CMF obtenidos en las cuatro poblaciones leucocitarias sin tratamiento (SP lisada con buffer de amonio) respecto a las tratadas con diferentes concentraciones de DHR123, se observan que hay diferencias estadísticamente significativas en las muestras tratadas ($p < 0,05$), siendo el tratamiento con DHR123 a 5 µg/mL el que mostró los valores más altos de CMF en todas las poblaciones celulares respecto a las concentraciones de 1 y 3 µg/mL. Esto muestra claramente entonces que la concentración de DHR123 afecta directamente el CMF.

La apropiada discriminación de las poblaciones leucocitarias en los histogramas dependiendo de la actividad basal de la NADPH oxidasa en las poblaciones leucocitarias, también es importante para determinar la concentración del fluorocromo. Para este criterio, la población leucocitaria de interés debido a la baja actividad oxidativa de la NADPH oxidasa, son los linfocitos. Células en donde solo una sub población de ellas (linfocitos B o linfocitos trasfectados con el virus del Epstein Barr) presentan una actividad oxidativa menor al 5% respecto a la actividad presentada por los neutrófilos (Chetty et al., 1995; Batot et al., 1998); razón por la cual su ubicación en el histograma corresponde entre los logaritmos $10^0 - 10^1$. Todos los resultados anteriores mostraron que la óptima concentración a utilizar del fluorocromo DHR123 es la de 1 µg/mL.

Por otro lado, para determinar la concentración óptima de activación de la NADPH oxidasa utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), se tuvieron en cuenta los mismos criterios: porcentaje de celularidad total, CMF, y discriminación celular en las poblaciones leucocitarias de SP. Los resultados obtenidos de la celularidad en relación a los diferentes tratamientos con PMA (1, 5, y 10 μ g/mL) y DHR123, respecto a la sangre lisada, muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). Concluyendo que la PMA a diferentes concentraciones produce cierto grado de toxicidad, haciendo que el porcentaje de celularidad disminuya. Esta citotoxicidad de la PMA en leucocitos se ha mostrado en sangre periférica de porcinos, en donde al tratar los leucocitos con 100ng/mL de PMA (0,1 μ g/mL) y 10 μ M de 1,2-Dioctanoil-sn-glicerol DOG (activador celular artificial análogo de diacil glicerol), se observaba que después de incubar 5 horas las células con PMA se observaba no solo un cambio morfológico en las células, sino que además ocurría una fragmentación del DNA que inducía una muerte celular, alteraciones que no ocurrían con DOG. Suzuki y Namiki en 1998 concluyen en su estudio que la PMA a concentraciones por encima de 1ng/mL (0,001 μ g/mL) produce la muerte de polimorfonucleares acompañada de una alteración morfológica celular. Para nuestro estudio, la concentración de PMA que menos alteraba el porcentaje de celularidad total y tenía mayor similitud con la celularidad de la sangre lisada, era la de 1 μ g/mL.

Respecto a la influencia que tiene la PMA en el CMF, ocurrió todo lo contrario a lo esperado. Los resultados obtenidos en las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con diferentes concentraciones de PMA pero a una concentración constante de DHR123, muestran que no hay diferencias significativas al comparar las distintas concentraciones de PMA entre sí ($p > 0,05$), representando con esto que la relación entre la concentración de PMA y el grado de estímulo de las poblaciones celulares no es directamente proporcional como se pensaba. Sin embargo, el desplazamiento de las poblaciones celulares hacia la derecha en los histogramas, indica el grado de estímulo de las células luego del tratamiento con PMA, y su ubicación en éste, depende de la cantidad y de la presencia o no de la enzima NADPH oxidasa. Así pues, el comportamiento y ubicación de las poblaciones celulares respecto a la cantidad enzimática se da de la siguiente manera: los linfocitos, debido al bajo grado de actividad de la enzima NADPH oxidasa, tienen una ubicación en el histograma entre los logaritmos de 10^0 - 10^1 ; los monocitos entre 10^1 y 10^2 ; neutrófilos 10^3 , mientras que los eosinófilos debido a que presentan mayor cantidad en las subunidades de la enzima NADPH oxidasa que los neutrófilos (Someya et al., 1997) se ubican entre 10^3 - 10^4 . La concentración que representa una adecuada discriminación celular en los histogramas es las de 1 μ g/mL.

Uno de los aspectos menos estudiados pero igual de importante a los mencionados anteriormente, es el uso del anticoagulante para el análisis del estallido respiratorio de las células fagocíticas. En nuestro trabajo se evaluó la influencia del uso de dos anticoagulantes ácido etilén diamino tetra acético (EDTA) y Heparina, en la actividad de la NADPH oxidasa. Para esto se analizaron dos criterios: el porcentaje de celularidad total y el CMF en las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con DHR123 (1 μ g/mL) y PMA (1 μ g/mL).

Nuestros resultados obtenidos en los porcentajes de celularidad con los dos anticoagulantes tanto en sangre lisada, SP tratada con DHR123 a una concentración de 1 μ g/mL, y SP tratada con DHR(1 μ g/mL) y PMA (1 μ g/mL), no mostraron diferencias significativas entre EDTA y Heparina; resultados similares arrojó el estudio de Freitas et al, en el 2008, donde compararon la celularidad de SP en tres anticoagulantes diferentes: EDTA, Heparina y Citrato, llegando a la conclusión que el porcentaje de celularidad es independiente del anticoagulante utilizado.

Teniendo en cuenta que la NADPH oxidasa se activa tras una serie de cambios conformacionales y traslocaciones citoplasmáticas de las subunidades p47phox, p67phox y p40phox a la membrana, causadas por fosforilaciones producidas por la protein quinasa C (PKC), y que en los neutrófilos se han identificado cinco isoformas: PKC α , β I, β II (requieren de Ca²⁺ DAG y fosfolípidos para la

activación), PKC δ (requiere fosfatidil serina y DAG, pero es independiente de Ca $^{2+}$) y PKC ζ (independiente de Ca $^{2+}$ y DAG, pero requiere de fosfatidil serina para su activación) (Liu and Heckman, 1998); se debe resaltar la importancia que tiene el Ca $^{2+}$ para la activación de la NADPH oxidasa y por ende del estallido respiratorio (Nunes y Demaurex, 2009). Es ahí en donde el uso de anticoagulante se debe analizar para no alterar dicha actividad.

Ahora bien, respecto a la influencia del tipo de anticoagulante en el estallido respiratorio con el CMF en las cuatro poblaciones celulares, nuestros resultados fueron contrarios a los esperados y a los publicados por Freitas et al., en su estudio publicado en el 2008, en donde al comparar tres anticoagulantes (EDTA, Citrato y Heparina) concluye que la activación de neutrófilos es dependiente del tipo de anticoagulante usado, mostrando que las muestras anticoaguladas con EDTA revelan niveles mas bajos que las anticoaguladas con Citrato y Heparina (esta a ultima presenta los niveles mas altos de activación, y la concentración mas alta de Ca $^{2+}$ intracelular).

Además, un estudio realizado por Prince y Lapé-Nixon en 1995, muestra la influencia del anticoagulante y la edad de la muestra en la Citometría de flujo para la evaluación de la generación del estallido respiratorio. Ellos compararon tres anticoagulantes: Acido citrato dextrosa (ACD), EDTA, y heparina, durante un periodo de tiempo de 4, 24, 48, 72, y 98 horas después de la recolección, y analizaron el porcentaje de células que seguían mostrando positividad en la fluorescencia. Los resultados mostraron que el anticoagulante que mayor número de células mostraba una adecuada estimulación, después de 96 horas, era Heparina.

Nuestros resultados muestran que en las cuatro poblaciones leucocitarias tratadas con DHR 123 (1 μ g/mL) y PMA (1 μ g/mL), al hacer una comparación del CMF entre los anticoagulantes EDTA y Heparina, no existen diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Sin embargo, según lo publicado en la literatura, se opta por utilizar Heparina de litio como anticoagulante, ya que la utilización de EDTA como anticoagulante muestra una disminución tanto en la cantidad de Ca $^{2+}$ intracelular, como en la actividad oxidativa de células fagocíticas.

Concluyendo, el presente estudio estandariza la técnica para la evaluación del estallido respiratorio mediante la DHR123 por Citometría de Flujo, dejando como concentraciones optimas de uso: la del fluorocromo DHR123 1 μ g/mL; y la del activador celular PMA 1 μ g/mL. Aunque existen estudios, como el realizado por Campos et al., en donde estandarizan la concentración de DHR123, ellos reportan que comparando cuatro concentraciones (0.125, 0.725, 3 y 5 μ g/mL) y además con una concentración de PMA de 10 μ g/mL, ellos concluyen que la mejor concentración del fluorocromo bajo los criterios de CMF, amplitud de fluorescencia y discriminación de población granulocítica no estimulada y estimulada, es la de 3 μ g/mL. Nosotros diferimos con estos resultados teniendo en cuenta los criterios que tuvimos (porcentaje de celularidad, CMF y discriminación de las poblaciones leucocitarias), obteniendo que las concentraciones en donde había una menor pérdida de porcentaje celular, en donde había una adecuada estimulación observada en el CMF además una apropiada ubicación de las poblaciones en el histograma, y una óptima discriminación celular teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Forward Scatter* –FSC-) versus granularidad (*Side Scatter* –SSC-), fueron las mencionadas anteriormente (DHR123 1 μ g/mL y PMA 1 μ g/mL).

Nuestros resultados no mostraron diferencia significativa en la influencia del anticoagulante respecto a la celularidad y a la actividad oxidativa (CMF), sin embargo, se opta por utilizar Heparina de litio como anticoagulante, ya que estudios publicados, muestran que la utilización de EDTA como anticoagulante muestra una disminución tanto en la cantidad de Ca $^{2+}$ intracelular, como en la actividad oxidativa de células fagocíticas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el uso de los diferentes reactivos utilizados para la evaluación del estallido respiratorio mediante la técnica de Citometría de Flujo, tales como el buffer de lisis, el fluorocromo utilizado, el activador celular y el tipo de anticoagulante, influyen directamente en el análisis de los resultados de la actividad oxidativa de la NADPH oxidasa.

9. CONCLUSIONES

- La lisis de los glóbulos rojos es un factor determinante. Se logró estandarizar una preparación de Buffer de lisis estable y de bajo costo.
- El tratamiento de las muestras de SP con las diferentes concentraciones de DHR123 no tiene un efecto significativo de citotoxicidad que pueda alterar la celularidad total, sin embargo la concentración que mayor porcentaje de celularidad presenta es la de 1 µg/mL.
- La discriminación adecuada de las diferentes poblaciones leucocitarias de SP en relación a las distintas concentraciones de DHR123 utilizadas, teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Forward Scatter* –FSC-) versus granularidad (*Side Scatter* –SSC-), no se ven alteradas.
- El tratamiento con DHR123 a diferentes concentraciones influye en el CMF de las cuatro poblaciones leucocitarias, a mayor concentración de DHR123 mayor CMF. La concentración mínima que presenta una óptima discriminación celular con una adecuada distribución de las poblaciones es 1 µg/mL.
- El tratamiento de SP con PMA a diferentes concentraciones junto con DHR123 afecta el porcentaje de celularidad total de las muestras. La concentración de PMA que mostro el porcentaje de celularidad más alto es la de 1 µg/mL.
- La preparación de la PMA tiene que seguir un estricto protocolo y conservación de temperatura estandarizado en el presente trabajo para que no pierda su actividad.
- La concentración de PMA no influye en el CMF. (La cantidad PMA no es directamente proporcional al grado de estímulo de las poblaciones celulares).
- El uso de anticoagulante no influye en el porcentaje de celularidad total.
- Nuestro estudio muestra que el uso de anticoagulante no influye en el CMF, y por ende en la activación de la NADPH oxidasa; sin embargo la técnica queda estandarizada con Heparina por la importancia del Ca²⁺ en el estallido respiratorio.

Como conclusión del estudio, queda estandarizada la técnica de Dihidrorodamina123, por Citometría de flujo, para la determinación del estallido respiratorio, quedando como concentraciones óptimas de uso: la del fluorocromo DHR123 1 µg/mL y la del activador celular artificial forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 1 µg/mL. Respecto al anticoagulante de uso, se determinó la utilización de Heparina, porque aunque los resultados que esperábamos para éste criterio no se dieron y mostraron que el uso entre EDTA y Heparina no altera la actividad enzimática, se optó por evitar alteraciones en la activación de la NADPH oxidasa por posibles quelaciones del Ca²⁺, indispensable para la actividad óptima de este complejo enzimático.

Respecto al Buffer de lisis, queda entonces estandarizada la preparación en stocks por separado de cada uno de los componentes a una concentración de 10x, en absolutas condiciones de esterilidad, y almacenado en oscuridad y a una temperatura entre 2° - 8° C; y la preparación del buffer de trabajo diario 1x, en iguales condiciones.

10. RECOMENDACIONES

Para el caso de pacientes que presenten infecciones bacterianas y fúngicas a repetición, con sospecha de EGC, y al realizar el análisis mediante DHR 123 por Citometría de flujo a las concentraciones estandarizadas en el presente estudio, y no se vea un estímulo significativo con dichas concentraciones (DHR123 1 µg/mL y PMA 1 µg/mL), se deja abierta la opción y el criterio de realizar el montaje con concentraciones mayores a estas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Assari T., Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD, *Medical Immunology* (2006), 5:4, 1-8
2. Batot G., Paclet M. H. , Doussiere J. , Vergnaud S., Martel C., Vignais P., More F.; Biochemical and immunochemical properties of B lymphocyte cytochrome *b558*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1406_1998.188–202
3. Campos P., Opazo N., Castillo J.L., 123- dihidrorodamina en la evaluación del estallido respiratorio en granulocitos mediante citometría de flujo, *Revista Latinoamericana de Actualidades Biomédicas* (2007) vol:1, 17-21
4. Casales. M., Estallido Respiratorio de los fagocitos, *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2006, vol 42, 365-386
5. Chetty M., Thrasher A., Abo A., Casimir C.; Low NADPH oxidase activity in Epstein-Barr-virus-immortalized B-lymphocytes is due to a post-transcriptional block in expression of cytochrome *b558*; *Biochem. J.* (1995) 306,141-145
6. Cos Y., Marsán V., Sánchez M., Macías C.; Enfermedad granulomatosa crónica. Aspectos actuales, *Revista Cubana Hematología* (2004); 20(3):1-7
7. Freitas M., Porto G., Lima J., Fernandes E., Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection, *Clinical Biochemistry* 41 (2008) 570–575
8. Freitas M., Lima J., Fernandes E., Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review, *Analytica Chimica Acta* 649 (2009) 8–23
9. Groemping Y., Rittinger K., Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective, *Biochem. J.* (2005) 386, 401–416
10. Jay H., Torres M., Reactive Oxygen Species and Cell Signaling Respiratory Burst in Macrophage Signaling, *American journal of respiratory and critical care medicine* (2002) VOL 166.
11. Jirapongsananuruk O., Malech H., Kuhns D., Niemela J., Brown M., Cohen M., Fleisher T.; Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *Journal Allergy Clin Immunol* (2003) Feb: 111(2):374-9.
12. Leiva L., Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: The Second Report of the LAGID Registry, *Journal of Clinical Immunology* (2007) January Vol. 27, No. 1, 101-108.
13. Liu W. S., Heckman C. A., The Sevenfold Way of PKC Regulation, *Cell. Signal.*(1998) Vol. 10, No. 8, pp. 529–542.
14. Memorias I Congreso Latinoamericano de Genética Humana; IX Congreso Colombiano de Genética Cartagena de indias, Colombia, 8 al 10 de octubre (2008) pag 29
15. Nauseef W., Assembly of the phagocyte NADPH oxidase, *Histochem Cell Biol* (2004) 122:277–291

16. Nunes P., Demaurex N., The role of calcium signaling in phagocytosis, *Journal of Leukocyte Biology* (2010) July Volume 88, 1-12.
17. Prince H., Lapé-Nixon M., Influence of specimen age and anticoagulant on flow cytometric evaluation of granulocyte oxidative burst generation, *Journal of Immunological Methods* (1995) 188: 129- 138
18. Richardson M.P, A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test, *Journal of Immunological Methods* (1998) vol: 219: 187–193.
19. Robinson J., Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes, *Histochem Cell Biol* (2008) 130:281–297
20. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* (1988) 75:354–5.
21. Segal B.H., Romani L., Puccetti P, Chronic granulomatous disease, *Cell. Mol. Life Sci.* (2009) 66: 553 – 558.
22. Someya A., Nishijima K., Nunoi H., Irie S., Nagaoka I., Study on the Superoxide-Producing Enzyme of Eosinophils and Neutrophils—Comparison of the NADPH Oxidase Components, *Archives of Biochemistry And Biophysics* Vol. 345, No. 2, September 15 1997, p. 207–213.
23. Stasia M. J., Jun Li X., Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease, *Semin Immunopathol* (2008) 30:209–235
24. Suzuki K. and Namiki H.; Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Induce Cell Death of Porcine Peripheral Blood Polymorphonuclear leucocytes, *Cell Structure and Function* (1998) 23: 367-372
25. Vowells S.J., Sekhsaria S., Malech H.L., Shalit M., Fleisher T.A., Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes, *Journal of Immunological Methods* 178 (1995) 89-97
26. Walrand, S., Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes, *Clinica Chimica* (2003) Acta 331,103– 110
27. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, *et al.*: Chronic granulomatous disease. Report on a National Registry of 368 patients. *Medicine* (Baltimore) (2000) 79(3):155– 169.
28. Wu Y., Huang Y., Lin Ch., Shieh Ch., Detection of defective granulocyte function with flow cytometry in newborn infants, *J Microbiol Immunol Infect* (2005) 38:17-24