



Análisis de marcadores de superficie celular de utilidad en el diagnóstico de la sepsis neonatal. Reporte preliminar

S Vázquez-Rodríguez,* MA González-Jiménez,* B Hidalgo-Aparicio,* Y Paredes-Vivas,*
A Cérbulo-Vázquez†

* Departamento de Biología Celular.

† Dirección de Investigación.

Instituto Nacional de Perinatología.

RESUMEN

La cuantificación de poblaciones leucocitarias en sangre periférica puede realizarse con ayuda del análisis por citometría de flujo. Los valores de poblaciones leucocitarias en neonatos son frecuentemente contrastados con sangre periférica de adultos. El presente reporte preliminar muestra el análisis de tres muestras de sangre de cordón umbilical de pacientes sanos y tres muestras de sangre periférica de neonatos con diagnóstico de sepsis tardía. Los resultados obtenidos muestran que CD69, CD71 y CD45RO pueden ser de utilidad para diferenciar estados de sepsis en neonatos. En un estudio futuro, la propuesta es realizar un análisis multiparamétrico por citometría de flujo que permita un análisis integral de la sepsis neonatal.

Palabras clave: Citometría de flujo, sepsis neonatal, marcadores de superficie celular.

ABSTRACT

Quantification of leukocyte populations in peripheral blood can be performed using flow cytometry. The leukocyte populations are often contrasted between neonate and adult peripheral blood. This preliminary report shows the analysis of three samples of umbilical cord blood of healthy subjects and three peripheral blood samples of newborns diagnosed with late sepsis. Our results show that CD69, CD71 and CD45RO could be useful to differentiate states of sepsis in neonates. We propose a subsequent study to generate a multiparametric flow cytometry analysis that will allow a comprehensive analysis of neonatal sepsis.

Key words: Flow cytometry, neonatal sepsis, cellular surface markers.

INTRODUCCIÓN

El estudio del sistema inmunológico en muestras de sangre periférica de recién nacidos humanos se basa en la determinación de las diferentes fracciones de células usando citometría de flujo.¹⁻³ Las proporciones celulares identificadas en neonatos son frecuentemente contrastadas con sangre periférica de adultos, aunque no es bien conocido si la sangre de estas dos poblaciones es comparable.⁴⁻⁷ La sangre del cordón umbilical puede ser obtenida con facilidad y su extracción no representa riesgo alguno para el binomio

madre-recién nacido; es por ello que la determinación de poblaciones leucocitarias en muestras de sangre periférica de recién nacidos sanos no es frecuente.⁸⁻¹⁰ La colección de sangre periférica de neonatos sanos conlleva un riesgo mínimo para el recién nacido, por lo cual la toma de este tipo de sangre no es fácil de justificar. Debido a esta dificultad, es muy importante conocer si la proporción normal de leucocitos presentes en muestras de cordón umbilical es comparable con muestras de sangre periférica de recién nacidos sanos. Establecer valores de referencia podría ser de utilidad para distinguir estados patológicos (por ejemplo, la sepsis neonatal) del estado de normalidad.

La sepsis puede ser temprana o tardía; en ambas condiciones, el diagnóstico suele basarse en signos y síntomas clínicos inespecíficos, por lo que su diagnóstico temprano es difícil de establecer. Con el objetivo de identificar casos de sepsis neonatal determinando la proporción de leucocitos, realizamos la identificación de marcadores de activación presentes en la superficie de linfocitos T, B y NKs.

CD45 es una glicoproteína densamente expresada por células de origen hematopoyético; la isoforma CD45RA se expresa en superficie de células T en reposo, mientras que CD45RO se expresa en células T activadas o de memoria.¹¹ Los linfocitos B expresan la isoforma CD45RA pero no CD45RO, mientras que las células NK expresan ambas isoformas.¹² CD45RO ha sido considerado un buen candidato para identificar la sepsis neonatal.¹³ Otros candidatos para identificar la activación linfocitaria son: CD71, que actúa como receptor para transferrina y se expresa en células proliferantes,¹⁴ y CD69, reconocido como un marcador de activación celular temprana.¹⁵

El presente es un reporte preliminar que muestra el análisis de seis pacientes: tres muestras de sangre de cordón umbilical de pacientes sanos y tres muestras de sangre periférica de neonatos con diagnóstico de sepsis tardía. El objetivo final del estudio es desarrollar un algoritmo de análisis multiparamétrico utilizando citometría de flujo para un diagnóstico temprano de la sepsis, lo cual puede ayudar a instaurar medidas terapéuticas de forma temprana y exitosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica, las cuales se colectaron en tubos con EDTA (BD, 366405). Se incluyeron recién nacidos atendidos en el INPer, cuyos padres o tutores firmaron el consentimiento informado de acuerdo a los lineamientos del Comité de Ética del instituto (protocolo registro: 212250-06171).

Tinción celular para citometría de flujo

Se incubó un millón de células sanguíneas con anticuerpo monoclonal en tubos de polipropileno siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fe-

notipos fueron evaluados empleando los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD3-PCy5 (BD), anti-CD19-PCy5 (BD), anti-CD56-PCy5 (BD), anti-CD45RA-FITC (BD), anti-CD45RO-PE (BD), anti-CD71-FITC (Invitrogen) y anti-CD69-PE (BD). Las muestras se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, para después adicionar 250 μ L de solución de lisis (BD, FLS), con incubación de diez minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron entonces lavadas con 1 mL de solución salina y centrifugadas a 3,000 rpm por cinco minutos a 4 °C; el sobrenadante fue decantado y el paquete celular se resuspendió en 500 μ L de solución salina; finalmente, las muestras fueron analizadas usando un citómetro de flujo FC500 Beckman Coulter.

Adquisición y análisis de datos

Las muestras se adquirieron y analizaron usando el programa CXP (Beckman Coulter). El ajuste de los voltajes de los parámetros FL1, FL2 y FL5 se realizó hasta obtener los niveles basales de fluorescencia usando los tubos sin tñir y control de isotipo. Se empleó el parámetro FL5 (PECy5) contra granularidad para seleccionar las células positivas y se adquirieron 10,000 eventos.

Análisis estadístico

Cada una de las variables fue analizada con estadística paramétrica utilizando la prueba t de Student. Se estableció un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

A partir de muestras de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica obtenidas de neonatos se realizó la fenotipificación para células T, B y NK. Las figuras 1a y b muestran imágenes representativas para los patrones de tamaño (FS) contra granularidad (SS); con base en esta estrategia se seleccionó la región que corresponde a la población linfocitaria. Las poblaciones de células seleccionadas fueron T, B o NK, según el caso. La figura 1c muestra que la proporción de células leucocitarias en sangre periférica de neonatos con sepsis tardía, es menor que la proporción de las células homólogas en sangre de cordón umbilical.

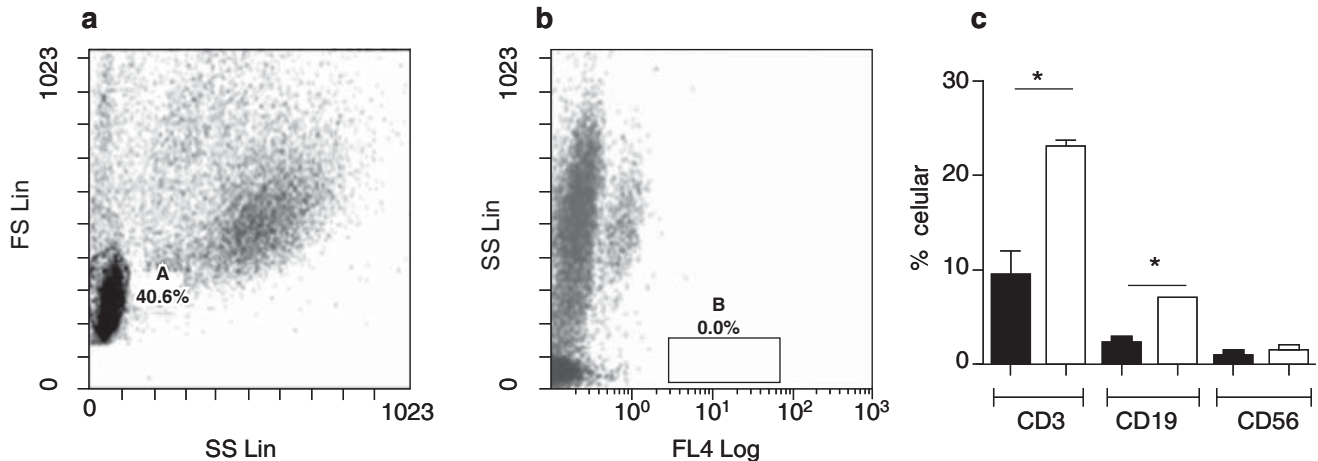


Figura 1. Selección de población: **a)** con bajo tamaño y granularidad (linfocitos), **b)** control negativo (control de isotipo) y **c)** proporción de linfocitos T, B y NKs en sangre periférica (n = 3) y de cordón umbilical (n = 2). Sangre periférica (sépticos ■) o de cordón (sanos □), p < 0.05, t de Student.

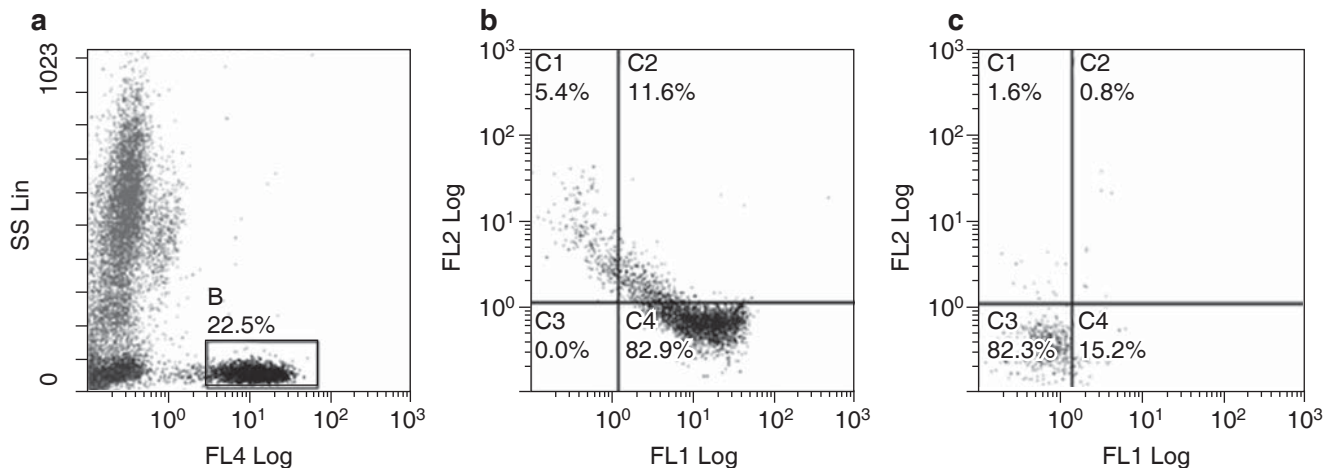


Figura 2. Imágenes representativas para: **a)** la selección de la población positiva para CD3 (región B), **b)** fenotipo CD45RA (cuadrante C4) o CD45RO (cuadrante C1) y **c)** fenotipo CD71 (cuadrante C4), CD69 (cuadrante C1) o positivos para ambos (C2).

Identificación de poblaciones CD45RA, CD45RO, CD69 y CD71

Las figuras 2a-c muestran imágenes representativas para determinar la proporción de células CD45RA, CD45RO, CD69 y CD71 en células CD3 positivas. La estrategia se repitió para la población de células B y NK.

La figura 3a resume lo observado para células T en muestras de sangre de cordón umbilical y en

sangre periférica de neonatos. Los resultados muestran que hubo un mayor porcentaje de linfocitos T CD45RA positivos en sangre de cordón umbilical que en sangre periférica. La figura 3b resume lo observado para células B. La expresión de CD69 es casi nula y la mayoría de las células expresan CD45RA. La figura 3c resume lo observado para células NK. No se observaron diferencias en cuanto a la expresión de marcadores CD69 o CD71 en la población de células NKs.

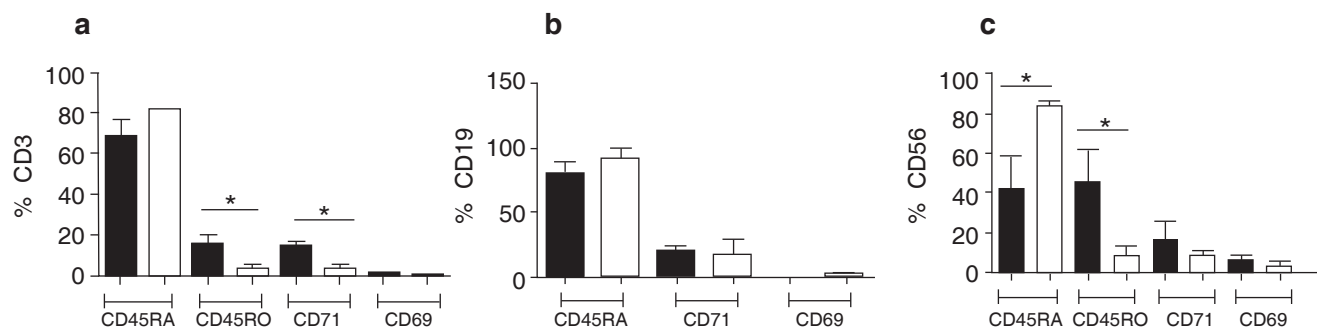


Figura 3. Expresión diferencial de moléculas de activación en: **a)** linfocitos T (CD3 positivos), **b)** linfocitos B (CD19 positivos), **c)** células NK (CD56 positivas). Sangre periférica (sépticos, n = 3, ■) o de cordón (sanos, n = 3, □), p < 0.05, t de Student.

DISCUSIÓN

Para identificar los patrones de expresión de las moléculas de activación en linfocitos T, linfocitos B y células NK se realizó un análisis de muestras sanguíneas obtenidas de cordón umbilical y de sangre periférica de neonatos. Se identificaron células CD3, CD19 y CD56, y en cada una de ellas se analizó la expresión de CD45RA, CD45RO, CD69 y CD71.

El análisis mostró que en neonatos con sepsis, hubo una mayor proporción de linfocitos T a nivel de la sangre de cordón en comparación con lo encontrado en las muestras de sangre periférica, quizá debido a la leucocitosis fisiológica o a la movilización de las células a tejido.

Respecto a la expresión de las isoformas CD45RA y CD45RO, encontramos que la mayoría de las células estudiadas expresan CD45RA, lo que indica que la mayoría están en reposo. Sin embargo, se observó que en las muestras de sangre periférica de neonatos con sepsis, una mayor proporción de linfocitos T expresaron la isoforma de CD45RO en comparación con las de neonatos sanos, sugiriendo que CD45RO podría ser de utilidad para reconocer casos de sepsis neonatal tardía; ya se ha reportado que la expresión de CD45RO no es de utilidad en los casos de sepsis temprana.¹³

En cuanto a la expresión de CD69 y CD71, hasta el momento no se cuenta con evidencia suficiente para descartar estos marcadores como útiles para el diagnóstico temprano de sepsis. Es necesario incrementar el número de observaciones para analizar con mayor grado de precisión la utilidad de estos marcadores.

Establecer la proporción de leucocitos activados en muestras de cordón umbilical podría ser de importancia para obtener diagnósticos tempranos que resulten en la aplicación de tratamientos oportunos.

REFERENCIAS

- Basford C, Forraz N, McGuckin C. Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry. *Nat Protoc.* 2010; 5: 1337-46.
- Martins AA, Paiva A, Morgado JM, Gomes A, Pais ML. Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplant Proc.* 2009; 41: 943-6.
- Morgado JM, Pratas R, Laranjeira P, Henriques A, Crespo I, Regateiro F et al. The phenotypical and functional characteristics of cord blood monocytes and CD14⁻/low/CD16⁺ dendritic cells can be relevant to the development of cellular immune responses after transplantation. *Transpl Immunol.* 2008; 19: 55-63.
- Lin SJ, Cheng PJ, Huang YJ, Kuo ML. Evaluation of cytotoxic function and apoptosis in interleukin (IL)-12/IL-15-treated umbilical cord or adult peripheral blood natural killer cells by a propidium-iodide based flow cytometry. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004; 15: 79-85.
- Amlot PL, Tahami F, Chinn D, Rawlings E. Activation antigen expression on human T cells. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol.* 1996; 105: 176-82.
- Azouna NB, Berraais L, Regaya Z, Jenhani F. Immunophenotyping of hematopoietic progenitor cells: comparison between cord blood and adult mobilized blood grafts. *World J Stem Cells.* 2011; 3: 104-12.
- Kollar S, Sándor N, Molvarec A, Stenczer B, Rigó J, Tulassay T et al. Prevalence of intracellular galectin-1-expressing lymphocytes in umbilical cord blood in comparison with adult peripheral blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18: 1608-13.
- Genel F, Atilihan F, Gulez N, Kazanci E, Vergin C, Terek DT et al. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and

- CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World J Pediatr.* 2012; 8: 72-5.
9. Gille C, Dreschers S, Spring B, Tárnok A, Bocsi J, Poets C et al. Differential modulation of cord blood and peripheral blood monocytes by intravenous immunoglobulin. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012; 82B: 26-34.
 10. Piatosa B, Woizka KB, Pac M, Siewiera K, Galkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78B: 372-81.
 11. Clark MC, Baum LG. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1253: 58-67.
 12. Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal.* 2010; 22: 339-48.
 13. Bruning T, Daiminger A, Enders G. Diagnostic value of CD45RO expression on circulating T lymphocytes of fetuses and newborn infants with pre- peri- or early post-natal infections. *Clin Exp Immunol.* 1997; 107: 306-11.
 14. Dong HY, Wilkes S, Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol.* 2001; 35: 723-32.
 15. Sancho D, Gómez M, Sánchez-MF. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005; 26: 136-40.

Correspondencia:

Dr. Arturo Cébulo-Vázquez

Dirección de Investigación,
Instituto Nacional de Perinatología
Montes Urales Núm. 800,
Col. Lomas Virreyes, 11000, México, D.F.
Tel: 5520 9900, ext: 160
Fax: 5520 9705
E-mail: cerbulo@hotmail.com