

Diseño de un panel de citometría de flujo para muestras de sangre, ascitis y tejido ovárico

Design of a multicolored flow cytometry panel for blood, ascites and ovarian tissue samples

Carlos Agustín Villegas Valverde^{1*} <http://orcid.org/0000-0001-7478-0482>

Griselda Torres López¹ <http://orcid.org/0000-0002-6060-1727>

Alain Morejón Morales¹ <http://orcid.org/0000-0001-9501-6889>

María del Carmen Arango Prado¹ <http://orcid.org/0000-0002-8307-4296>

¹Laboratorio de Inmunología. Instituto de Oncología y Radiobiología. La Habana. Cuba.

*Autor para la correspondencia: carlosvillega@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El cáncer epitelial de ovario (CEO) ocupa el sexto lugar en incidencia y mortalidad a nivel mundial y en Cuba, el quinto en incidencia. Este cáncer es inmunogénico y sus células malignas crecen en interacción con las células inmunitarias. Su curso clínico depende del infiltrado inflamatorio acompañante del tumor. La citología e histopatología son los métodos diagnósticos de elección. Sin embargo, la citometría de flujo emerge como una tecnología de mayor sensibilidad, objetividad y rapidez. **Objetivo:** Diseñar un panel multicolor de citometría de flujo para inmunofenotipar el infiltrado linfocitario de tres tipos de muestras de pacientes con CEO. **Métodos:** Se realizó un diseño experimental, para la creación y evaluación de un panel multicolor de citometría de flujo, en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. El panel se diseñó en sangre de 3 sujetos sanos y se optimizó para sangre periférica en 33 sujetos sanos y, en sangre periférica, ascitis y tejido tumoral ovárico de tres pacientes con CEO. En cada muestra se inmunofenotiparon varias poblaciones linfocitarias. **Resultados:** Se seleccionaron 11 marcadores antigénicos para el inmunofenotipo, el panel quedó

conformado por 4 tubos de citometría. La metodología se pudo aplicar a las muestras de ascitis y tejido tumoral sin interferencias, se obtuvieron porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias dentro de los valores esperados. **Conclusiones:** El panel diseñado permitió inmunofenotipar linfocitos en distintos tipos de muestras de pacientes con CEO, con resultados confiables y reproducibles. Esta metodología puede extenderse a la realización de inmunofenotipaje en otras enfermedades.

Palabras clave: citometría de flujo, subgrupos linfocitarios, inmunofenotipaje, cáncer de ovario.

ABSTRACT

Introduction: Epithelial ovarian cancer occupies the 6th place in incidence and mortality in women worldwide. In Cuba, it occupies the 5th place in incidence in females. This cancer is immunogenic and its malignant cells grow in interaction with multiple cells from immune system. Its clinical course depends largely on the type of inflammatory infiltrate accompanying the tumor. Cytology and histopathology are gold standard as diagnostic methods. However, flow cytometry emerges as a technology with greater sensitivity, objectivity and speed. **Objective:** To design a multicolored flow cytometry panel to immunophenotype the lymphocytic infiltrate of three types of samples for patients with ovarian cancer. **Methods:** An experimental design was carried out *in vitro* for the creation and evaluation of a multicolored flow cytometry panel in the Immunology laboratory of the National Institute of Oncology and Radiobiology of Cuba. The panel was designed in the blood of three healthy subjects; then it was optimized for blood in 33 healthy volunteers and blood, ascites and ovarian tumor tissue, from three patients with epithelial ovarian cancer. Several lymphocytes lineages were immunophenotyped in each sample. **Results:** Eleven markers were selected for the immunophenotype and the panel was made up of four multiparameter cytometry tubes. The methodology created could be applied to the samples of ascites and tumor tissue without interferences and percentages of different lymphocyte subpopulations were obtained within the expected values. **Conclusions:** The designed panel allowed immunophenotyping of lymphocytes in different types of ovarian cancer patient samples and reliable and reproducible results were obtained. This methodology could be employed for others diseases.

Keywords: flow cytometry, lymphocyte subsets, immunophenotyping, ovarian cancer.



Recibido: 09/09/2019

Aceptado: 05/11/2019

Introducción

El cáncer de ovario de origen epitelial(CEO) ocupa el 6to lugar en incidencia y mortalidad a nivel mundial y es el más letal de todos los cánceres ginecológicos.En Cuba ocupa el quintolugar en incidencia dentro de la población femenina de 18 a 45 años de edad y la séptima causa de cáncer después de los 45 años. Se diagnostica de forma tardía, en las etapas III/IV, en más del 75 % de los casos y cursa de forma indolente más allá de la mitad de su historia natural.⁽¹⁻⁴⁾

Los estándares terapéuticos en este tipo de cáncer no generan una supervivencia mayor del 50 % a los cinco años. Sin embargo, la inmunoterapia ha emergido como un pilar más de tratamiento,pero se requiere una mejor caracterización del infiltrado inflamatorio acompañante del tumor para lograr un impacto positivo mayor.⁽⁵⁻⁶⁾

El cáncer de ovario es inmunogénico y se relaciona convarias estirpes celulares que lo promueven,entre las que se encuentran: fibroblastos asociados al tumor, células madre mesenquimales y adipocitos asociados al ovario; así como células del sistema inmune: macrófagos asociados a tumor (M2), células mieloides derivadas supresoras y linfocitos T reguladores. Por otra parte, hay células linfocitarias que destruyen este tumorcomo los T citotóxicos, las asesinas naturales(NK, siglas en inglés) y asesinas naturales T(NKT, siglas en inglés). Además, existen otras como las células dendríticas cuyaacción dependerá de su polarización funcional.⁽⁵⁻⁸⁾

La citología es el método diagnóstico de elección para caracterizar los infiltrados celulares en los líquidos corporales y la histopatología en los tejidos sólidos. Estos métodos tienen limitaciones, como que solo examinan porciones de la muestra recolectada. El reporte de los estudios patológicos, excepto la inmunohistoquímica, solo reportan linfocitos y no se puede determinar su linaje ni fenotipo funcional.⁽⁹⁾

Lacitometría de flujo (CF) posee múltiples ventajas sobre los estudios citológicos e inmunohistoquímicos. Esta tecnología posee una alta sensibilidad y especificidad, muy superior a

la citología; es un método objetivo de alta velocidad que puede analizar más de 10000 eventos/s. Además, permite el análisis multiparamétrico sobre una sola célula, a diferencia de la inmunohistoquímica, que habitualmente solo mide entre uno a tres antígenos por corte de tejido.⁽¹⁰⁻¹³⁾

Los inmunofenotipos linfocitarios actuales son el resultado de evaluaciones complejas que miden simultáneamente entre 6 y 17 antígenos, e incluso más. De esta forma se ha abundado en la complejidad del sistema inmune y el descubrimiento de cientos de subpoblaciones estructurales y funcionales distintas, precisamente debido al desarrollo de la CF. Por tal motivo, resulta desventajoso el empleo de técnicas que requieren muchos cortes de tejido de una biopsia o que, solo estudien de manera muestral un área muy reducida de un fluido, como lo hace la citología.⁽¹⁰⁻¹³⁾

El objetivo de este trabajo fue diseñar y optimizar un panel multicolor para evaluar los inmunofenotipos linfocitarios en sangre, ascitis y tejido tumoral ovárico, en pacientes con cáncer de ovario. Posteriormente, con la ampliación de estos resultados y la metodología propuesta, se podrá inmunofenotipar un mayor número de fenotipos que poseen un significado relevante en la biología del cáncer de ovario e incluso se podrá emplear para estudios linfocitarios en otras enfermedades.

Métodos

Se llevó a cabo un diseño experimental, para la creación de un panel multicolor de CF y su evaluación en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de Cuba (INOR). Las principales etapas de trabajo fueron: selección de los antígenos y de los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos; diseño de procedimientos técnicos de tinción, creación, evaluación y optimización del panel de citometría y, análisis de los datos adquiridos. Primero se obtuvo el panel para sangre periférica y, a partir de este se hicieron los ajustes para muestras especiales: ascitis y tejido epitelial ovárico. Se siguieron algunas recomendaciones generales emanadas de la Guía para el uso de la CF en estudios inmunológicos.⁽¹¹⁾

Obtención de las muestras

Se obtuvieron 2 mL de sangre periférica de 3 adultos, supuestamente sanos, para la titulación de los conjugados, ajuste de voltajes de fotodetectores, generar la matriz de compensación inicial y realizar los controles al panel. Posteriormente, se optimizó la metodología con 33 muestras de sangre de voluntarios sanos y, por último, se analizaron 2 mL de sangre periférica, 2 mL de líquido ascítico y un fragmento de tejido ovárico, de tres pacientes operadas por el servicio de Ginecología del INOR, con el diagnóstico histopatológico de CEO. El líquido ascítico se colectó durante el acto quirúrgico, en tubo Vacutainer con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el tejido ovárico fresco, en tubo cónico estéril de 15 mL con solución salina al 0.9%.

Consideraciones éticas

Los sujetos y paciente accedieron voluntariamente a participar y firmaron el consentimiento informado. Se cumplieron los requisitos emanados de la Declaración de Helsinki.⁽¹⁴⁾ Se garantizó la confidencialidad de los datos obtenidos y su uso con fines exclusivos de la investigación. El estudio no implicó riesgos éticos para los pacientes ya que no fueron sometidos a experimentación y estuvo aprobado por el comité de ética del INOR.

Selección de los antígenos y conjugados

Se seleccionaron 11 antígenos en total, el CD45 que es considerado panleucocitario y otros típicos de linaje de subpoblaciones linfocitarias B, T y NK; así como el CD25 y HLA-DR, antígenos de activación celular. Para la elección de los fluorocromos se consideraron los factores que influyen en la calidad de los resultados. Por ejemplo, basados en la configuración del citómetro se utilizaron fluorocromos que tuvieran menor superposición espectral, entre canales vecinos o se encontraran alejados en su espectro de emisión. También se determinó que los más brillantes se emplearan para antígenos de poca expresión o que por su patrón de expresión fuesen de tipo secundario o terciario; mientras que los menos luminosos se utilizaron para la detección de los antígenos primarios o de alta expresión en la membrana celular.

Todos los conjugados empleados fueron Beckman Coulter, Francia. Quedaron definidos cuatro tubos policromáticos para el panel:

- anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD19 PC7 (Clon 89B.B4), anti-CD3 FITC (Clon UCHT1), anti-CD4 PB (Clon 13B8.2), anti-CD8 AA700 (Clon B9.11), anti-CD56 PE (Clon N901) (NKH-1) y anti-CD34 APC (Clon 581).
- anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD19 PC7 (Clon 89B.B4), anti-CD20 FITC (Clon B9E9), CD25 PC5.5 (Clon B1.49.9) y anti-HLA-DR PE (Clon Immu-357).
- anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD3 PC5 (Clon UCHT1), anti-CD4 PB (Clon 13B8.2), anti-CD8 AA700 (Clon B9.11), anti-CD56 PE (Clon N901) (NKH-1) y anti-CD16 FITC (Clon 3G8).
- anti-CD45 KRO (Clon J33), anti-CD3 FITC (Clon UCHT1), anti-CD4 PB (Clon 13B8.2), anti-CD8 AA700 (Clon B9.11), anti-HLA-DR PE (Clon Immu-357) (NKH-1) y CD25 PC5.5 (Clon B1.49.9).

Titulación de los conjugados

Se emplearon las muestras de sangre periférica y se siguieron las recomendaciones del fabricante en los procedimientos de tinción (Beckman Coulter, Francia). De la concentración propuesta por el fabricante, se realizaron 4 diluciones por mezcla de volúmenes decrecientes de cada conjugado en volúmenes fijos de muestra.

Se utilizó el método de lisis de hematíes sin lavado: a cada volumen del conjugado se le añadieron 100 µL de sangre, se mezcló por 4 s, se incubó en cámara oscura por 20 min a temperatura del laboratorio; se añadió 1 mL de buffer de lisis VersaLyse™ (Beckman Coulter, Francia) e incubó por 30 min en las mismas condiciones del paso anterior. Por último, se procedió a la adquisición de la muestra por el citómetro.

Para cada concentración del conjugado se determinó el índice de tinción mediante la división de la mediana de intensidad fluorescencia (MIF) de la población positiva entre la MIF de la población negativa. Se seleccionaron los índices mayores a la menor concentración del conjugado ya que discriminan mejor entre poblaciones positivas y negativas. Además, se tuvieron en cuenta que los porcentajes de las poblaciones seleccionadas se encontrasen dentro de los valores normales reportados en la literatura. Finalmente se creó un coctel con las titulaciones individuales para 15 determinaciones con validez para 30 días.

Construcción del panel

Con las concentraciones óptimas elegidas para cada fluorocromo se comenzó a construir el panel. Primero se utilizó una muestra con células sin teñir para establecer los voltajes y ganancias de los fotodetectores de dispersión de la luz anterógrada (FS, siglas en inglés) y lateral(SS, siglas en inglés) y así obtener un gráfico biparámetro, típico de las tres subpoblaciones leucocitarias principales: linfocitos, monocitos y granulocitos. Se realizó la misma operación con los fotomultiplicadores para visualizar la señal negativa y ajustar sus voltajes.

Para la generación de la matriz de compensación se utilizó el kit de microesferas de captura VersaComp™ (BeckmanCoulter, Francia). Se siguieron las especificaciones del fabricante para el montaje de las muestras y para su ejecución se empleó el planificador automático de protocolos del software Gallios (AutoSetup),

Controles de fluorescencia menos uno (FMO, siglas en inglés)

Se realizó FMO para eliminar la influencia de diferentes conjugados en un canal determinado y de esta forma poder establecer adecuadamente los niveles de corte para el marcador que corre por ese canal. Este procedimiento solo se realizó para los conjugados específicos de antígenos secundarios y terciarios. El montaje se hizo en leucocitos de sangre periférica y por el mismo procedimiento de lisis sin lavado. No obstante, en el diseño del protocolo de adquisición se crearon gráficos de control interno para verificar los niveles de corte.

Diseño de protocolos de adquisición y análisis de datos por citometría

Se empleó un citómetro Beckman Coulter Gallios de 10 colores con tres láseres: azul 488nm, rojo 638nm y violeta 405nm, con software Gallios v1.2 para la adquisición de los datos y Kaluza Analysis v1.5a para el análisis y reporte de resultados. El control de calidad diario se realizó con Flow-Check™ Pro Fluorospheres, (Beckman Coulter, Francia) para comprobar la estabilidad de los sistemas ópticos y de fluidos. Se utilizaron Flow-Set™ Pro Fluorospheres (Beckman Coulter, Francia), para la calibración de la dispersión de la luz y la intensidad de fluorescencia.

Adquisición de datos

Se diseñaron protocolos de adquisición por cada tubo del panel. Se creó una estrategia de ventanas manual y secuencial. En los casos de la sangre periférica se adquirió un mínimo de 50000 eventos totales. Mientras que para los otros tipos de muestras se determinó un mínimo de 5000 eventos en la ventana de selección de linfocitos. Se fijó una velocidad baja de adquisición de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ para reducir las imprecisiones en el punto de interrogación. Los niveles de corte de expresión de los diferentes antígenos, se realizó por controles negativos y FMO como se describió anteriormente. Además, se utilizó la estrategia de confirmar los cortes por controles negativos internos, consistentes en la clonación de gráficos procedentes de poblaciones francamente negativas para el marcador evaluado en la misma muestra.

En la estrategia de ventanas se tuvieron en cuenta diferentes controles de calidad interna de los datos, que permiten monitorear la validez de los resultados en cada muestra. Por ejemplo, control de la estabilidad óptica y de fluidos con un gráfico de fluorescencia vs tiempo de un canal representativo para cada láser (CD3 FITC/FL1/Láser azul, CD8 AA700/FL7/Láser Rojo, CD45 KRO/FL10/Láser Violeta) y gráficos para eliminación de *debris* o células apoptóticas y de eventos coincidentes.¹¹

Además, se crearon gráficos de control de eventos positivos para monitorear el patrón de expresión de cada marcador según el tipo de la población leucocitaria, sin la posible interferencia de la estrategia de ventanas, pero conservando la lógica en reversa de los resultados sobre la población de linfocitos.

Una vez optimizado el panel para sangre periférica, se procedió a ajustarlo con las muestras de líquido ascítico y de tejido epitelial ovárico. Se realizaron las precisiones requeridas a los protocolos en lo referente a voltajes y matriz de compensación. La estrategia de ventana fue la misma. En el procesamiento de la muestra se realizaron modificaciones por las características de estas.

Líquido ascítico

Se realizó un lavado de los 2mL del líquido ascítico con 2mL de solución de lavado (SL) compuesta por: solución salina al 0.9% (SL) con suero fetal bovino inactivado (BSA, siglas en inglés) al 1% y EDTA al 1mM. Después se centrifugó a 400g y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se resuspendió en 1mL de SL, con agitación por 4 s. La tinción fue realizada con los conjugados previamente retitulados en una suspensión de 50 μL de células, en tubos de citometría de 12x75mm (Beckman Coulter, Francia). Se incubó en cámara oscura a temperatura de

laboratorio por 20 min. Después se adicionaron 2mL de SL y se aplicó agitación por 4 s, seguido de centrifugación a 400g. Posteriormente se eliminó el sobrenadante por decantación y fue completado otro paso de lavado igual al anterior. Finalmente se reconstituyeron las células de cada tubo en 150 μ L de SL. Previo tamizado de la muestra con filtros de 100 μ m, se analizó inmediatamente en el citómetro.

Tejido tumoral ovárico

Inicialmente se realizó la disgregación mecánica con bisturí No. 22 en placas de cultivo estériles. Una vez disgregado se le adicionaron 10mL de SL empleada para la ascitis. Esta suspensión fue transferida a través de un filtro de 100 μ m a un tubo cónico de 15 mL. Se centrifugó a 400g y se eliminó el sobrenadante por decantación. Después se resuspendió en 1mL de SL. Se aplicó agitación por tres pasos de 4 s cada uno. Se dispensaron los conjugados en los tubos de citometría (Beckman Coulter, Francia) con los volúmenes previamente retitulados de los conjugados. Después se adicionaron 100 μ L de las células resuspendidas a cada uno. La incubación fue en cámara oscura a temperatura de laboratorio por 20 min. Después se realizaron dos pasos de lavado con SL como se describió para el líquido ascítico. Finalmente, se resuspendieron las células de cada tubo de citometría en 150 μ L de SL. Se filtró nuevamente con filtros de 70 μ m y se analizó inmediatamente en el citómetro.

Resultados

Selección de los antígenos y conjugados

Los marcadores seleccionados permitieron inmunofenotipar linfocitos B, T y NK en los tres compartimentos. Así como algunas de sus subpoblaciones importantes en la biología del cáncer de ovario, como linfocitos T cooperadores, citotóxicos, dobles negativos y dobles positivos para CD4 y CD8; NKT, NK secretoras y citotóxicas, linfocitos T activados y T reguladoras. El CD25 y HLA-DR se seleccionaron por ser los antígenos de la fase celular de activación tardía de los linfocitos T.

Titulación

Las concentraciones óptimas encontradas, estuvieron por debajo de las recomendadas por el fabricante y existieron variaciones de un conjugado a otro (Tabla 1). Alrededor del 60% de los conjugados mostraron el mayor índice de tinción con la cuarta parte de la concentración establecida por el fabricante.

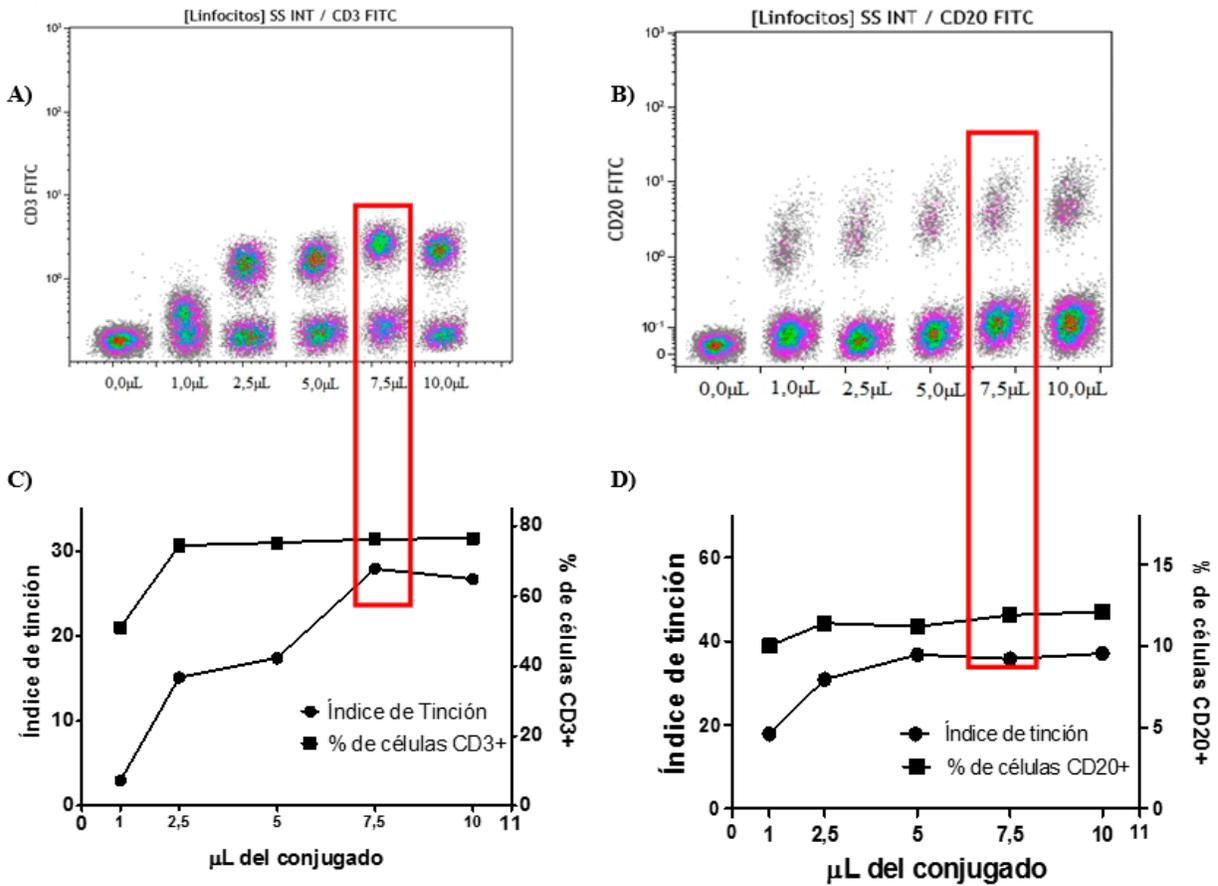
Tabla 1- Conformación final del panel según los antígenos y fluorocromos seleccionados con su volumen óptimo de titulación

Láser		Azul 488nm				Rojo 638nm		Violeta 405nm	
Panel	Fluoróforo	FITC	PE	PC5/PC5.5	PC7	APC	AA700	Pacific Blue	KRO
Tubo 1	Anticuerpo	CD3	CD56	-	CD19	CD34	CD8	CD4	CD45
	Volumen (µL)	7,5	5	-	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tubo 2	Anticuerpo	CD20	HLA-DR	CD25	CD19	-	-	-	CD45
	Volumen (µL)	7,5	5	2,5	2,5	-	-	-	2,5
Tubo 3	Anticuerpo	CD16	CD56	CD3	-	-	CD8	CD4	CD45
	Volumen(µL)	7,5	5	2,5	-	-	2,5	2,5	2,5
Tubo 4	Anticuerpo	CD3	HLA-DR	CD25	-	-	CD8	CD4	CD45
	Volumen (µL)	7,5	5	2,5	-	-	2,5	2,5	2,5

Leyenda: Fluorocromos. FITC: isotiocianato de fluoresceína, PE: Ficoeritrina, PC5: ficoeritrina-cianina 5, PC5.5: ficoeritrina-cianina 5.5, PC7: ficoeritrina-cianidina 7, APC: alofocianina, AA700: alofocianina-Alexa Fluor-700, KRO: Krome Orange.

CD: Clúster de diferenciación

Un ejemplo del procedimiento realizado para seleccionar la concentración óptima se observa en la Fig. 1.



A y B: concatenación de imágenes de densidades para los antígenos CD3 y CD20, respectivamente. Datos analizados en Kaluza. C y D: distribución del índice de tinción según los volúmenes dispensados de los conjugados anti CD3 y anti CD20, respectivamente. El índice se obtuvo por el cociente entre la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) de la población positiva entre la MIF de la población negativa.

Además, se muestran los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T y B, según los volúmenes de conjugados.

Los recuadros rojos muestran los volúmenes que se adoptaron para la construcción final del panel.

Datos analizados en GraphPadPrism 7.

Fig.1. Curvas de titulación de los conjugados.

En el CD45, que no posee población negativa en sangre periférica, se adoptó la concentración que mejor discriminó entre granulocitos, monocitos y linfocitos. Mientras que, en el líquido ascítico y las muestras de tejido ovárico, se calculó el índice de tinción para CD45 a partir de las células epiteliales como señal negativa.

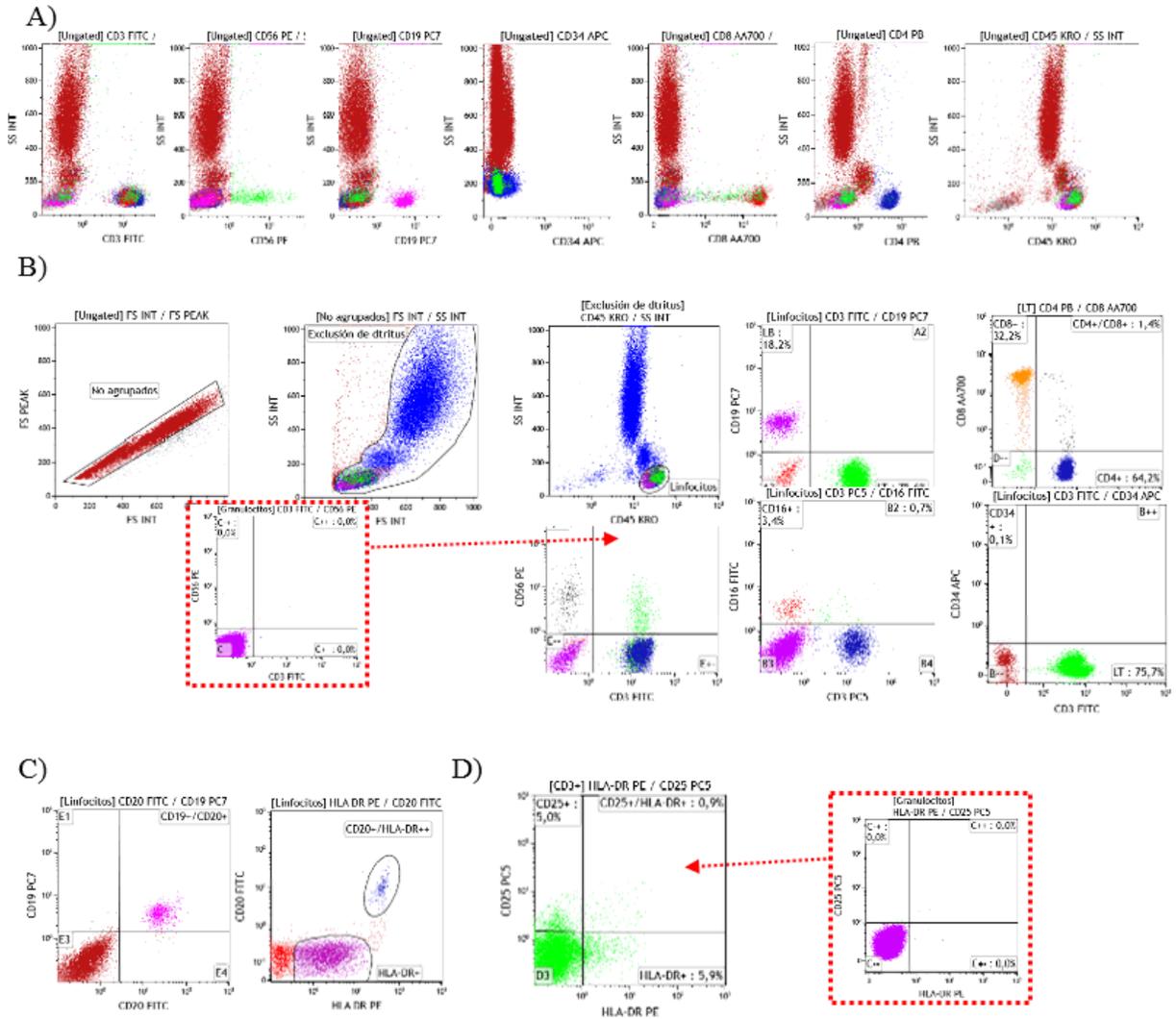
No existieron afectaciones de los porcentajes de subpoblaciones linfocitarias con las concentraciones optimizadas de los conjugados.

Evaluación del panel diseñado

Construcción del panel: primero se adicionaron conjugados simples y posteriormente se adicionaron los conjugados con fluoróforos de tipo tándem. Se creó un coctel por cada tubo para una duración de 30 días y volumen proporcional para 15 determinaciones.

FMO: se empleó la estrategia de identificar el patrón de fluorescencia basal de los leucocitos normales sin teñir, para establecer los niveles de corte para cada marcador. Posteriormente se realizó la FMO para el CD56 PE (en poblaciones NK, NKT) y el HLA-DR PE y CD25 PC5 para población T. Adicionalmente, se diseñaron controles negativos internos para los tres marcadores antes expuestos y reforzar la precisión del nivel de corte. Se construyeron a partir de granulocitos que no expresan dichos antígenos. Solo se encontraron discretas interferencias en cuanto al nivel de corte de las poblaciones NKT y T activadas al analizar el tejido ovárico y se realizaron los ajustes establecidos por FMO y control interno. (Fig. 2)

Los controles isotópicos no fueron requeridos, pues no existieron marcajes intracelulares y se establecieron controles negativos para cada muestra. No se encontraron diferencias de ruido de fondo entre los protocolos que se realizaron sin lavados y en los que se emplearon pasos de lavado.



A: Fluorescencia global vs dispersión lateral de la luz (SS, por sus siglas en inglés) por cada antígeno. Se utilizó para todos los tubos. **B:** Lógica secuencial de ventanas para eliminar loseventos coincidentes, detritus celulares y hematies resistente a la lisis, selección de loslinfocitos por CD45+ vs SS, así como la identificación de lassubpoblaciones de interés. **C:** Selección de lassubpoblaciones sobre linfocitos B. **D:** Subpoblaciones de linfocitos T activados.

Los gráficos encerrados en líneas de puntos con flechas, fueron seleccionados de la población de granulocitos para establecer los niveles de corte para los antígenos secundarios y terciarios, como controles negativos internos. Diseñado en software Kaluza Análisis V1.5a.

Fig. 2. Estrategia de ventanas sobre muestra de sangre periférica.

Diseño de protocolos de adquisición y análisis de datos por citometría

Lo voltajes y ganancias de los fotodetectores se realizaron con células no marcadas y se calibró con las perlas Flow-Set Pro. Las estrategias de ventanas de selección empleadas para los tubos del panel, permitieron determinar las poblaciones leucocitarias y subpoblaciones de linfocitos. (Fig. 2). Además, garantizaron la realización de los controles requeridos para la calidad y

precisión de los resultados. Los porcentajes de linfocitos en sangre periférica de sujetos sanos, estuvieron dentro de los rangos esperados y en correspondencia con la expresión de tres y cinco moléculas. En las muestras especiales se requieren más estudios que establezcan estos rangos de referencias, a lo que este estudio contribuyó.

Se realizaron controles de eventos positivos y se excluyeron del análisis todos los eventos que no aparecieron adecuadamente en la región correspondiente de los gráficos FS vs SS, CD45 vs SS y de fluorescencia global, en la lógica de ventanas en reversa,. (Fig. 2A y 2B)

El diseño realizado mostró un funcionamiento óptimo en los tres tipos de muestras. Sin embargo, en las muestras de ascitis y tejido los detritus y agregados celulares se solaparon con las poblaciones linfocitarias, esto dificultó la delimitación de las regiones de interés. Se redujeron las gravedades en la centrifuga a 400g, en todos los pasos de centrifugación y se añadió EDTA al 1mM al búfer de lavado. De esta forma disminuyó considerablemente la superposición de detritus y agregados celulares.

Discusión

La CF en el cáncer ha sido muy utilizada para el inmunofenotipo de hemopatías malignas con gran aplicabilidad y su gran aporte al estudio de la enfermedad mínima residual. En la actualidad se ha extendido al estudio de muestras especiales, como distintos líquidos corporales y de efusión, que cumplen el prerrequisito de poseer células en suspensión de forma natural. No obstante, la utilidad de esta tecnología al estudiar tejidos sólidos, ha devenido en necesidad, en cuanto a inmunofenotipo se refiere, por su superioridad en cuanto a sensibilidad, automatización y velocidad de análisis con respecto a la citología e histopatología.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

El inmunofenotipado ha evolucionado tanto que ha permitido la identificación de numerosas nuevas subpoblaciones de linfocitos, pero se requieren un promedio de entre 8 y 17 marcajes simultáneos sobre una misma célula.⁽¹⁷⁾

El inmunofenotipaje de linfocitos propuesto permitió analizar células circulantes en sangre periférica y líquido ascítico, considerado una extensión del microambiente del tumor de ovario, y el propio tejido ovárico. Este tipo de análisis coincide con los estudios pioneros de Curiel y

cols.,⁽¹⁸⁾ seguido recientemente, por Jang y cols.⁽¹⁹⁾ que proponen evaluaciones simultáneas de subpoblaciones linfocitarias en varios compartimentos del organismo.

Los antígenos seleccionados permitieron caracterizar linfocitos T, B y NK de forma básica y, algunas de sus subpoblaciones de forma multiparamétrica, como NKT, NK secretoras y NK citotóxicas, T doble negativas, T activadas, y de estas últimas, la proporción de Tregüadoras, por un marcaje básico (CD3⁺, CD4⁺, CD25^{alto}). Se tuvo en cuenta aquellas que tienen un valor científicamente fundamentado en la inmunopatogenia, evolución, respuesta terapéutica y supervivencia en el cáncer de ovario y que se evalúan en la toma de decisiones clínicas. La combinación de antígenos empleados fue similar a las propuestas en trabajos previamente publicados.^(5-6,18-20)

La determinación porcentual de subpoblaciones linfocitarias en sangre de controles sanos mediante la metodología diseñada, no difiere de los rangos reportados en la literatura internacional;⁽²¹⁾ ni de los valores referenciales reportados en estudios cubanos.⁽²²⁻²³⁾

La titulación de los conjugados tiene como objetivo disminuir el ruido de fondo por sobresaturación y falsos resultados que esto provoca. De esta forma se asegura la sensibilidad, especificidad y calidad de los resultados. Las ventajas al usar perlas de captura para realizar de forma automática la compensación, incluyen la uniformidad del marcaje, la disminución del error humano y eliminación de la variabilidad de expresión de los antígenos, que ocurre cuando se usan células. No se usaron controles isotípicos, ya que no se recomiendan cuando se usan controles negativos por muestra y controles negativos internos, cuando el marcaje es superficial y uso de las ventanas de selección sobre CD45⁺.⁽²⁴⁾

Los fluoróscoros de tipo tándem se adicionaron al final, ya que la pérdida de su estabilidad, puede interferir en los patrones de expresión y la MIF de otros marcadores, incluso dar resultados falsos positivos en el canal correspondiente al fluoróscoro primario.⁽¹⁷⁾

En los diferentes compartimentos del organismo las concentraciones de subpoblaciones linfocitarias varían considerablemente. La metodología propuesta en este estudio permitió determinar esta variabilidad. En este sentido el estudio de Kovacovics-Bankowski y cols. evidencia, con una metodología similar, diferencias en cuanto a la distribución de linfocitos entre la sangre periférica, ascitis y tejido tumoral, en pacientes con cáncer de ovario.⁽²⁵⁾

La CF se utiliza actualmente para clasificar los tumores en inmuno-desierto, inmuno-excluido e inmuno-inflamado; teniendo en cuenta el infiltrado de células del sistema inmune. El cáncer de

ovario es uno de los tumores más inmunosensibles que existen, generalmente se consideran inmuno-excluidos con predominio supresor. Caracterizar ese infiltrado se ha convertido en una regla de oro en estas pacientes para establecer la conducta terapéutica.⁽²⁶⁻²⁹⁾

El panel multicolor y la metodología creados permitieron inmunofenotipar las subpoblaciones linfocitarias por CF, en muestras de sangre periférica, ascitis y tejido tumoral ovárico; con resultados acorde a los reportados en la literatura especializada, de forma óptima y reproducible. Esta metodología es flexible y permite adicionar nuevos marcadores para analizar otros fenotipos celulares para estudios del microambiente tumoral, así como el inmunofenotipaje en otras enfermedades que posean una inmunopatología definida.

Referencias bibliográficas

1. MINSAP. Anuario estadístico de salud. 2017. La Habana, 2018. Revisado: (24/09/2018). Disponible en: www.sld.cu/sitios/dne
2. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017;14:9-32.
3. Berek JS, Crum C, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet.* 2015;131:111-22.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67(1):7-30.
5. Lukesova S, Vroblova V, Tosner J, Kopecky J, Sedlakova I, Čermáková E, et al. Comparative study of various subpopulations of cytotoxic cells in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015;19(4):290-99.
6. Zhang B, Chen F, Xu Q, Han L, Xu J, Gao L, et al. Revisiting ovarian cancer microenvironment: a friend or a foe? *Protein Cell* 2018, 9(8):674-92.
7. Kitamura T, Bin-Zhi Q, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:73-86.
8. Wefers C, Duiveman-de Boer T, Yigit R, Zusterzeel PLM, van Altena AM, Massuger LFAG, et al. Survival of Ovarian Cancer Patients Is Independent of the Presence of DC and T Cell Subsets in Ascites. *Front Immunol.* 2019;9:1-10.

9. Quijano S, Guzmán P, De los Reyes I, Córdoba M. Estudio de concordancia entre citología convencional y citometría de flujo en la identificación de infiltracioneoplástica del líquido cefalorraquídeo en pacientes con diagnóstico de leucemia aguda. *UM* 2016;57(2):163-70.
10. Wang L, Hoffman RA. Standardization, calibration, and control in flow cytometry. *Curr Proto Cytom.* 2017 Jan;79:1.3.1-1.3.27. doi: 10.1002/cpcy.14.
11. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* 2017; 47:1584-797.
12. Lan C, Heindl A, Huang X, Xi S, Banerjee S, Liu J, Yuan Y. Quantitative histology analysis of the ovarian tumour microenvironment. *Sci Rep.* 2015;5:1-12.
13. Panizo A, Idoate MA. Doble marcaje en inmunohistoquímica. *RevEsp Patol.*1998;31(3):287-90.
14. World Medical Association. Declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191-94.
15. Pillai V, Dorman DM. Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. *ActaCytol.* 2016; 60:336-43.
16. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping analysis from the Human Immunophenotyping Consortium. *Sci Rep.* 2016 Feb;6:20686. doi: 10.1038/srep20686.
17. Mateus J, Lasso P, González JM, Puerta CJ, Cuellar A. Diseño de un panel multicolor para evaluar moléculas intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo. *Biomédicas* 2013; 33:660-72.
18. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.*2004;10(9):942-49.
19. Jang M, Poh-Yin Y, Hasegawa K, Ikeda Y, Fujiwara K, Fleming GF, et al. Characterization of T cell repertoire of blood, tumor, and ascites in ovarian cancer patients using next generation sequencing. *Oncoimmunol.* 2015;4(11):1-10.
20. Liang H, Chu X, Zhao J, Xing G, SI Y. Elevated peripheral blood B lymphocytes and CD3+CD4-CD8-T lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer: A preliminary study on peripheral immune profile. *Oncol Lett.* 2018;15:8387-95.

21. Apoil PA, Puissant-Lubrano B, Congy-Jolivet N, Peres M, Tkaczuk J, Roubinet F, et al. Reference values for T, B and NK human lymphocyte subpopulations in adults. *Data Brief*. 2017; 12:400-4.
22. Villegas-Valverde CA, Kokuina E, Breff C. Estimating normal Values of rare T-Lymphocyte populations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Review*. 2018;20(4):20-6.
23. Kokuina E, Breff C, Villegas-Valverde CA, Mora-Díaz I. Normal values of T, B and NK lymphocytes subpopulations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Review*. 2019;21(2-3):16-21.
24. Johansson U, Bloxham D, Couzens S, Jesson J, Morilla R, Erber W, et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. *Br J Haematol*. 2014 May;165(4):455-88. doi: 10.1111/bjh.12789.
25. Kovacsovics-Bankowski M, Chisholm L, Vercellini J, Tucker CG, Montler R, Haley D, et al. Detailed characterization of tumor infiltrating lymphocytes in two distinct human solid malignancies show phenotypic similarities. *J Immunother Cancer*. 2014 Nov;2(1):38. doi: 10.1186/s40425-014-0038-9.
26. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2016;15;22(8):1865-74.
27. Matsuzaki J, Tsuji T, Chodon T, Ryan C, Koya RC, Odunsi K. A rare population of tumor antigen-specific CD4⁺CD8⁺ double-positive $\alpha\beta$ T lymphocytes uniquely provide CD8-independent TCR genes for engineering therapeutic T cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7:1-18.
28. Saraiva DP, Jacinto A, Borralho P, Braga S, Cabral MG. HLA-DR in cytotoxic T lymphocytes predicts breast cancer patients' response to neoadjuvant chemotherapy. *Front Immunol*. 2018; 9:2605. doi: 10.3389/fimmu.2018.02605
29. Kahraman DS, Diniz G, Sayhan S, Sayar C, Ayaz D, Gokcu M, et al. The prognostic significance of pd11 and foxp3 expressions in tumor cells and the tumor microenvironment of ovarian epithelial tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(8):3884-90.

Conflicto de interés

No se declara ningún conflicto

Contribución de autoría

Carlos A. Villegas Valverde: concepción de la idea, realizó diseño general del estudio, del procesamiento de las muestras y del análisis por citometría de flujo, interpretación de datos del inmunofenotipo, escritura del borrador inicial del artículo. Aprobación de versión final. Supervisión del proyecto.

Griselda Torres López: recolección, análisis e interpretación de datos, redacción del borrador del artículo, aprobación de versión final.

Alain Morejón Morales: recolección, análisis de datos, revisión del manuscrito y aprobación de versión final.

María del Carmen Arango Prado: contribuyó al diseño del estudio, interpretación de datos, supervisión del proyecto, aprobación de versión final.