



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA  
BIOLÓGICA**

**“OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN IN VITRO  
DE CÉLULAS B DE MEDULA ÓSEA MURINA”**

**PRESENTA:**

Rebeca Romero Camarena

**Lugar de realización de Servicio Social: UAM- X**

**ASESORES:**

M. en C. Alejandro Palma Ramos No. Económico 15941

Dr. Felipe Mendoza Pérez No. Económico 7183

**Fecha de inicio: 5-noviembre-2018**

**Fecha de término: 5-mayo-2019**

**Fecha de entrega: octubre 2019**

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEORICO.....	5
➤ <b>CELULAS B.</b> .....	5
• <b>Funciones principales de las células B.</b> .....	5
• <b>Origen de los linfocitos B.</b> .....	6
➤ <b>CITOMETRIA DE FLUJO.</b> .....	9
• <b>Tipo y cantidad de muestra</b> .....	10
• <b>Conservación y trasportación de la muestra</b> .....	10
• <b>Calibración y compensación</b> .....	11
➤ <b>MARCADORES DE SUPERFICIE.</b> .....	12
• <b>Clúster de Diferenciación (CD)</b> .....	12
• <b>Marcadores de células B.</b> .....	13
• <b>CD19</b> .....	14
• <b>CD20</b> .....	15
• <b>CD77a</b> .....	16
JUSTIFICACIÓN. ....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
➤ <b>Obtención de células B de medula ósea.</b> .....	18
➤ <b>Preparación de la suspensión de células de médula ósea.</b> .....	19
➤ <b>Marcaje de las células B de medula ósea murina mediante citometría de flujo.</b> .....	20
RESULTADOS. ....	22
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIÓN.....	25
REFERENCIAS .....	26
RESUMEN.....	29

## **INTRODUCCIÓN.**

La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas. Se caracteriza por un incremento en el número de células hematopoyéticas aberrantes en médula ósea y en sangre periférica. Se deriva de la expansión clonal de precursores hematopoyéticos que han perdido su capacidad para proceder a la diferenciación terminal y funcionalidad. La leucemia se origina de una acumulación de un número mínimo de eventos genéticos que resultan en el crecimiento celular acelerado y el bloqueo de diferenciación celular. Un gran número de alteraciones genéticas, incluyendo translocaciones cromosómicas específicas, se han identificado y ligado causalmente a la leucemogénesis, pero la base molecular y fenotipo de la leucemia permanece en gran medida desconocido (Gonzalez, 2014).

De acuerdo con su evolución se clasifica como crónica y aguda, y según su estirpe celular afectada será mielóide o linfóide también llamada linfoblástica (Ortega, Osnaya, & Rosas, 2007).

La leucemia crónica suele progresar lentamente y los pacientes tienen una cantidad mayor de células maduras. En general, estas células maduras pueden desempeñar algunas de sus funciones normales. La leucemia aguda es una enfermedad de progresión rápida que produce células que no están completamente desarrolladas. Estas células no pueden desempeñar sus funciones normales.

En la leucemia mielóide, el cambio canceroso comienza en una célula de la médula ósea que normalmente forma los glóbulos rojos, algunos tipos de glóbulos blancos y las plaquetas. En el caso de la leucemia linfoblástica, el cambio canceroso comienza en una célula de la médula ósea que normalmente forma linfocitos es decir un tipo de glóbulo blanco.

La Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) se debe a una lesión adquirida o congénita del ADN de una sola célula en la médula ósea. Los efectos de la ALL incluyen la proliferación y acumulación descontroladas y exageradas de células llamadas "linfoblastos" o "blastos leucémicos" que no funcionan como las células sanguíneas normales. La presencia de los blastos leucémicos impide la producción de las

células normales. Como resultado, cuando se diagnostica un caso de ALL, la cantidad de células sanguíneas sanas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) suele ser menor de lo normal ( Leukemia y Lymphoma Society, 2014).

Las leucemias linfoblásticas tienen dos variantes determinadas por la línea celular que predomina: la primera es la más frecuente y en 76% se debe a las células linfocíticas tipo B; la segunda se encuentra en 20% de todas las ALL y se debe a las células tipo T. Como la leucemia linfoblástica aguda carece de hallazgos morfológicos y citoquímicos específicos, para la evaluación diagnóstica es esencial llevar a cabo el inmunofenotipo. Este inmunofenotipo o las características físicas de la célula de leucemia determina si las células se originaron de linfocitos B o linfocitos T. Mediante estos métodos inmunológicos es posible reconocer patrones característicos de moléculas de superficie (en la membrana celular o en su citoplasma), que pueden ser aprovechados como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares.

Esta caracterización se realiza mediante anticuerpos monoclonales (AcMo); cada anticuerpo monoclonal distingue un solo tipo de molécula, e incluso partes específicas y variantes de cada tipo de molécula. Los llamados grupos de diferenciación (CD, "cluster of differentiation"): consisten en todos los AcMo que reconocen una determinada molécula de membrana leucocitaria y algunos son específicos para diferentes poblaciones celulares (Iáñez, s.f). El subtipo de linfocitos B se reconoce al encontrar, en las células blásticas leucémicas, marcadores en la superficie celular idénticos a los que se encuentran en los linfocitos B normales. (Ortega, Osnaya, & Rosas, 2007)

Para definir el linaje B, los blastos deben expresar fuertemente el antígeno CD19, el cual tiene que estar asociado con al menos uno de los siguientes antígenos: CD79a citoplasmático, CD22 citoplasmático o de membrana y el CD10. Por lo tanto, la expresión solo del CD19 no es suficiente para confirmar el fenotipo B. Los antígenos CD19 y CD22 son sensibles y específicos de la línea linfocítica B. Sin embargo, el CD79a, a pesar de tener una alta sensibilidad, no es absolutamente específico de este linaje, ya que puede estar expresado en células mieloides y sobre

los linfocitos T, al igual que en blastos de pacientes con LLA-T y LMA, respectivamente

La mayoría expresan CD24 y CD21. Una pequeña fracción de células B de los adultos normales expresan el antígeno CD45. La diferenciación de las células B posterior a la médula ósea no se conoce muy bien y no es posible definir con exactitud los estadios discretos por la expresión de antígenos particulares (Trejos & Virginia, s.f).

En la ALL de células pre-B, el subtipo más frecuente, con un 70% de pacientes. El nombre de pre-B se refiere al hecho que el clon de células leucémicas está destinado al linaje de células B, como se pone de manifiesto por los marcadores tempranos, CD10 (el antígeno común de la ALL: CALLA) y el CD19, y reagrupaciones genéticas de inmunoglobulinas de superficie. La ALL de células -T es el segundo subtipo de ALL. El último subtipo de ALL es el de célula B madura que representa un 5% de las ALL del adulto. Esta enfermedad se clasifica como linfoma de Burkitt, en ausencia de implicación medular, mientras cualquier implicación de médula le confiere la designación de LLA de células B maduras (Sala, Blanco, & Pérez, s.f).

Para establecer el diagnóstico de la ALL de linfocitos B, como se mencionó anteriormente es necesario realizar la inmunofenotipificación, un proceso que identifica las células según el tipo de proteínas (antígenos) de la superficie celular. La "citometría de flujo" es una prueba que se puede usar para hacer la inmunofenotipificación ( Leukemia y Lymphoma Society, 2014).

La aparición de los anticuerpos monoclonales y las mejoras que se han realizado en las técnicas de citometría de flujo y de reacción en cadena de la polimerasa han permitido clasificar las ALL en distintos tipos, según el estadio madurativo de sus linfoblastos. Esta clasificación es la más utilizada en la actualidad y tiene implicaciones pronósticas y para el tratamiento (Atienza, 2016).

## **MARCO TEORICO.**

### **➤ CELULAS B.**

Los linfocitos B o células B son un tipo de células del sistema inmune que producen anticuerpos contra microorganismos invasores, y además los recuerdan para atacarlos más rápidamente si vuelven a infectarnos.

Los linfocitos B son un tipo de células inmunes cuya función principal es la producción de anticuerpos dirigidos contra diversos patógenos.

Estos forman parte de una población celular denominada leucocitos o glóbulos blancos, que son precisamente las células inmunitarias de nuestro organismo. Es decir, se trata de aquellas que nos defienden de infecciones microbianas. Son células móviles que se encuentran en la sangre y constituyen entre un 5 y un 15% del total de linfocitos.

Los linfocitos B se forman a partir de un precursor llamado precursor linfoide común o CLP, que también se encarga de formar los linfocitos T y las células NK.

Durante el desarrollo fetal, estos se generan y maduran en el hígado. Después, en el adulto, lo harán en la médula ósea. Luego, tras esta maduración, los linfocitos B se acumularán en los ganglios linfáticos y en el bazo donde entrarán en contacto con los antígenos hacia los que van dirigidos. (Jiménez, 2018).

- **Funciones principales de las células B.**

- ✓ Los linfocitos B son los encargados de la inmunidad humoral de nuestro organismo. Llevan a cabo diferentes funciones como la activación del complemento o respuestas celulares mediadas por receptores para anticuerpos. Entre ellas están, por ejemplo, la fagocitosis de microorganismos o la exocitosis de citotoxinas.
- ✓ La función principal de los linfocitos B es la producción de anticuerpos contra antígenos específicos. Los antígenos son moléculas ajenas o tóxicas,

normalmente encontradas en los microorganismos, que desencadenan una respuesta inmune en el organismo.

- ✓ Los linfocitos B pueden reconocer a los antígenos gracias a unas moléculas de superficie, llamadas receptores BCR (receptor de células B). Estas presentan gran variabilidad, por lo que permiten reconocer gran cantidad de moléculas invasoras.
- ✓ Para que los linfocitos B sean capaces de reconocer a estos antígenos deben ser “entrenados” en su proceso de maduración. Este entrenamiento consiste precisamente en exponer a los linfocitos B a los antígenos en cuestión, para que se activen y den lugar a distintas células inmunes.
- ✓ Los linfocitos B, además, pueden actuar como células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés). Esto implica que pueden captar y procesar al agente invasor y a continuación, presentar ellas mismas antígenos en su superficie. De este modo pueden ser reconocidas por otras células inmunes que ataquen al microorganismo infeccioso.
- ✓ Por último, una función muy importante de los linfocitos B es modular la respuesta inmune. Los linfocitos B pueden producir ciertas sustancias capaces de inhibir la respuesta inflamatoria producida tras una infección. De esta forma se reduce la toxicidad de la respuesta inmune y ayuda a frenarla cuando ya se ha detenido la infección. Este aspecto es especialmente importante en las enfermedades autoinmunes, en las que se genera una respuesta inflamatoria desmedida que provoca diversos daños en el organismo. (Jiménez, 2018)

- **Origen de los linfocitos B.**

Los linfocitos B se originan a partir de un precursor conocido como precursor linfoide común (CLP, por sus siglas en inglés), el cual también da origen a los linfocitos T y las células NK. Es probable que la presencia de un receptor de membrana sobre los precursores linfoides comunes llamado Notch1 lleve hacia la diferenciación de células T mientras que la ausencia de dicho receptor llevaría hacia la línea de linfocitos B (Parham, 2016)

El desarrollo de linfocitos B se lleva a cabo en el hígado durante la etapa fetal y en la médula ósea a partir del nacimiento y hasta la muerte. Las células linfoides pluripotenciales (MLP, por sus siglas en inglés) son comprometidas a convertirse en linfocitos B cruzando una serie de etapas de desarrollo, iniciadas a partir de la acción de IL-7 y distintos factores de transcripción, entre los que destaca PAX5 (Pavón, 2016).

✓ Linfocito pro- B:

- El primero en la cadena de desarrollo de linfocitos B, presenta marcadores CD34+ CD38+ CD22+ CD10+ y CD19-. En esta etapa, la recombinación somática V(D)J se lleva a cabo, la cual es un mecanismo de recombinación de genes que permite la diversidad en las regiones variables de las cadenas pesadas (IgH) y las cadenas ligeras (IgL) propias de los receptores BCR y TCR.
- El mecanismo comienza con la recombinación V(D)J de la cadena pesada (IgH), altamente dependiente de factores de transcripción, especialmente PAX5 antes mencionado. La recombinación de la IgH es coordinada por las enzimas Rag1 y Rag2, así como de la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT), que recombinan en forma de secuencia segmentos DH-JH y VH-DJH. Una vez la cadena pesada de la región variable (V) del BCR queda determinada, se transcribe la IgH de clase  $\mu$  (VDJC $\mu$ ), la cual marca el inicio de la siguiente etapa de desarrollo: pre-B.

✓ Linfocito pre- B:

- Cuando la VDJC $\mu$  es transcrita, esta se asocia con una proteína denominada SCJ, la cual no es variable. Al unirse, forman el receptor preB (preBCR), el cual es transportado a la superficie celular del linfocito ahora conocido como preB-II. Si SCJ no logra asociarse a VDJC $\mu$ , la célula sufrirá apoptosis, por lo que las células preB son sujetas a una selección positiva.



- El preBCR se asocia a las cadenas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  con dominios intracelulares ITAM, cruciales para la formación del BCR final. Los marcadores una vez el preBCR es llevado a la superficie celular son CD19+ CD10+ y CD34-.
- Posteriormente a la expresión del preBCR, las enzimas recombinantes Rag1 y Rag2 vuelven a actuar para recombinar los genes para la formación de la cadena ligera (IgL). La enzima TdT no actúa nuevamente, por lo que la IgL presenta menos diversidad que la IgH, la cual fue recombinada en la etapa anterior. El resultado de la recombinación de IgL es el ensamblaje del receptor propio de los linfocitos B, el BCR, expresado como IgM.

✓ Linfocito B inmaduro:

- Un linfocito B inmaduro es capaz de reconocer antígenos, ya que presenta el BCR propiamente. Los marcadores de un linfocito B inmaduro son CD34- CD19+ CD10+ CD20+ IgM+ e IgD-.

Ya que puede ser estimulado por antígenos, el linfocito B será sometido a dos procesos distintos según la intensidad del estímulo: anergia clonal o delección clonal. Estos procesos, en conjunto, conforman la selección negativa de un linfocito B.

**Anergia clonal**

- Se trata de un estado de no respuesta a la estimulación antigénica que puede ser inducida por autoantígenos que no estimulan suficientemente al BCR. Es conveniente que no haya respuestas a autoantígenos, ya que al ser estos parte del cuerpo del individuo, su detección podría llevar a desórdenes autoinmunes.

**Delección clonal**

- Si la respuesta al autoantígeno es muy elevada, el linfocito B inmaduro será sujeto a apoptosis, evitando así el ataque a estructuras del propio cuerpo. No obstante, es posible que un linfocito B inmaduro que responde a antígenos propios evite ser eliminado reiniciando los arreglos recombinantes de la IgH o IgL descritos antes para construir

un nuevo BCR que no confiera autoespecificidad. Este proceso correctivo se conoce como edición de receptor (Pavón, 2016).

➤ **CITOMETRIA DE FLUJO.**

La citometría de flujo (CMF) constituye una técnica de avanzada, automatizada, objetiva y altamente sensible, muy útil para el estudio del inmunofenotipo de las células normales y anormales (Suárez, 2015).

Permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (habitualmente entre 5000 y 10000) que por tanto serán una muestra lo suficientemente representativa del conjunto poblacional. La suspensión de células en solución isotónica se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen lo hacen una a una (en fila india) formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico.

Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizados en duración, intensidad y espectro, los datos obtenidos almacenados en memoria de ordenador y desde allí pasados a archivos binarios que posteriormente pueden ser analizados con detenimiento (Centro Nacional de Biotecnología, s.f.).

La CMF emplea anticuerpos monoclonales (AcMo) unidos a fluorocromos, que son detectados y visualizados mediante un sistema informático apropiado y de forma rápida, permite analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto periodo (5 000 partículas/s); ofrecer información simultánea de varios parámetros celulares, identificar paralelamente antígenos de superficie y citoplasmáticos, cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia y emplear múltiples marcajes para, de esta manera, detectar la coexpresión de antígenos aberrantes sobre el mismo blasto.

Esta técnica posee una sensibilidad superior a  $1 \times 10^{-4}$ , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10 000 células normales. Entre sus desventajas se puede mencionar: la incapacidad para diferenciar las células normales de los blastos leucémicos en muestras que contienen un número reducido de células y que

el análisis requiere necesariamente el uso de una suspensión celular, por lo que se limita el estudio fenotípico de tejidos debido al tratamiento de disgregación celular que no hace fiable la información sobre la arquitectura de los tejidos celulares, así como la interacción entre estas y el medio que las rodea (Suárez, 2015).

- **Tipo y cantidad de muestra**

Los especímenes más utilizados en hematología, inmunología y hemoterapia para su inmunofenotipaje son variados y habitualmente incluyen: aspirados de médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y sangre de cordón umbilical. Pueden emplearse también los productos de leucoféresis y transfusión como los concentrados de hematíes, de plaquetas y el plasma. Se estudian, además, especímenes procedentes de tejidos linfoides como ganglio linfático, bazo y timo; y de tejidos no linfoides, como, por ejemplo: piel, hígado, mucosa gástrica e intestino. En este caso, pueden haberse obtenido por procedimientos quirúrgicos, biopsia o punción-aspiración con aguja fina (PAAF).

De igual forma, el inmunofenotipaje se aplica para el estudio de distintos fluidos corporales, entre ellos, líquidos: cefalorraquídeo (LCR), pleural y ascítico.

Para el estudio de las LA, preferentemente se usa el aspirado de la MO por punción de la cresta ilíaca o el esternón, de modo firme y rápido, con el empleo de agujas de biopsia de 14 a 8 G, que permitan obtener un número suficiente de partículas de la MO en suspensión. Puede utilizarse también la SP cuando la cantidad de blastos exceda el 50 %.

La cantidad de muestra necesaria dependerá del número de marcadores antigénicos a analizar, 1 mL de sangre total es suficiente para determinar hasta diez antígenos. Se recomienda realizar el conteo total de leucocitos contenidos en la muestra a estudiar, para determinar la cantidad de  $\mu\text{L}$  necesarios para cada determinación (Suárez, 2015).

- **Conservación y transportación de la muestra**

Los métodos y períodos de conservación de las muestras obtenidas para el inmunofenotipaje pueden variar de acuerdo con el tipo de especímenes u otros

productos contenidos, tipo y número de células y el estado del paciente en el momento en el que se obtuvo.

En general, la calidad de los resultados es inversamente proporcional al tiempo transcurrido y al grado de manipulación de la muestra desde su obtención, por lo que se recomienda el empleo de especímenes frescos, recién obtenidos. Así, las muestras deben procesarse, fundamentalmente, en las primeras 24 horas posteriores a su extracción. Para el estudio del LCR y de las plaquetas, el tiempo de conservación es aún menor, 4 horas desde su obtención, ya que sus células son más susceptibles de entrar en apoptosis.

En todos los casos, la muestra debe conservarse a temperatura ambiente (22 - 25°C). Solo en aquellas situaciones en que la muestra no pueda procesarse en el tiempo adecuado y se requiera de tiempos de almacenamiento o transportación más prolongados, sería recomendable su conservación a temperaturas entre 4 a 6°C y añadir reactivo estabilizador, con el objetivo de obtener resultados aceptables hasta 5 días después de su obtención, en una proporción 1/10. De esta forma, las células conservan la viabilidad requerida (>90 %). En caso de hemólisis, grumos, microcoágulos, congelamiento visible, incorrecto llenado del tubo y mal rotulado, la muestra debe rechazarse (Suárez, 2015).

- **Calibración y compensación**

La calibración se realiza para obtener una adecuada distribución de las células según su tamaño y complejidad interna. Estas características dependen del grado y de la magnitud de la dispersión de la luz del láser al interactuar con los componentes celulares, que se obtiene a través del análisis de la muestra que contiene solamente sangre total, la cual funciona como un control negativo.

Cuando la luz difractada incide en el mismo eje de la luz incidente, se evalúa el tamaño celular a través del *forward scatter* (FSC). Por otro lado, cuando la luz difractada y reflejada es detectada a 90° de la dirección del láser, se evalúa la complejidad interna celular a través del *side scatter* (SC).

Las compensaciones se colocan en el valor cero, después se crean los histogramas para los FL1-FL4 y luego, se construyen los diagramas de punto, de acuerdo con

las diferentes posibilidades de compensación. Inicialmente, debe adquirirse el tubo que contiene la muestra biológica sin AcMo conjugado, se ajustan los FSC y SSC en los valores lineales del *gate* óptimo, se excluye el *debris* y posteriormente, se ajustan los FSC y SC a los valores logarítmicos.

A continuación, se van adquiriendo los tubos que contienen los AcMo conjugados de manera independiente y de esta forma, se van realizando las diferentes compensaciones de fluorescencia (Suárez, 2015).

➤ **MARCADORES DE SUPERFICIE.**

Se pueden utilizar un amplio rango de fluorocromos como etiquetas para el marcado fluorescente en citometría de flujo. Los fluorocromos se encuentran por lo general químicamente unidos a anticuerpos específicos capaces de reconocer una determinada molécula diana en la superficie o en el interior de la célula. Estas etiquetas fluorescentes también pueden adosarse químicamente a casi cualquier compuesto químico que presente una cierta afinidad por la membrana o alguna otra estructura celular. Cada fluorocromo posee un pico de excitación característico, y una longitud de onda de emisión también característica. Sin embargo, los espectros de emisión de diferentes etiquetas con frecuencia se superponen, por consiguiente, la combinación de marcadores que pueden ser usados depende de la longitud de onda de detectores que se encuentren disponibles.

Los linfocitos y otros leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos, presentan patrones característicos de moléculas de superficie, que pueden ser aprovechadas como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares (Ortega, Osnaya, & Rosas, 2007).

• **Clúster de Diferenciación (CD).**

Son moléculas marcadoras en la superficie celular, que son reconocidas por ciertos anticuerpos, usadas para la identificación del tipo de célula, estadio de diferenciación celular y actividad de la misma. Son un sistema de antígenos de superficie celular de los leucocitos humanos, que se caracterizan mediante anticuerpos monoclonales, permitiendo la categorización de los leucocitos y otras

células hematopoyéticas (de la sangre). También se conocen como cúmulo de determinantes o de designaciones.

Durante su maduración y diferenciación, los linfocitos inmaduros van recibiendo en su superficie una serie de receptores inmunitarios que van apareciendo a modo secuencial conforme progresa la maduración y luego la diferenciación de los linfocitos. Se les denomina marcadores de diferenciación pues le dan a la célula linfocítica componentes fenotípicas únicas del estadio de diferenciación en que estén (Bernard, 1984).

El clúster de diferenciación es un protocolo utilizado para la identificación e investigación de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos en las moléculas de superficie de los leucocitos. Más de 347 CD se han reportado hasta la fecha. La molécula de la superficie propuesta se le asigna un número de CD una vez que dos anticuerpos monoclonales específicos demuestran unirse a la molécula (Torres, 2015).

- **Marcadores de células B.**

En el camino de la maduración, van encendiendo y apagando la expresión de ciertas proteínas de superficie (con diferente CD), que permiten determinar en que estado de diferenciación se encuentran las células.

Las células poco diferenciadas (pro-B) expresan el enzima Tdt (desoxinucleotidil-transferasa terminal). Los linfocitos B desde etapas de diferenciación tempranas expresan moléculas HLA de clase II que sólo existen además en células presentadoras de antígenos. También, en todas las etapas del proceso de diferenciación se expresa CD 19, que es el mejor marcador del linaje B.

En la tercera etapa madurativa (pre-B) se comienza a expresar la Inmunoglobulina en superficie, aunque sólo se completa en la última etapa de diferenciación (célula B inmadura), con la expresión de IgM e IgD en superficie. Es también en esta última etapa de diferenciación donde se aprecia la expresión de CD 20, que se pierde en el paso a células plasmáticas. Los linfocitos B inmaduros y maduros expresan CD21 que es a la vez receptor para complemento y para el virus de Epstein-Barr (EBV). Las moléculas CD19 y CD20 son importantes en la proliferación y activación de los

linfocitos B. Por último, en los linfocitos B activados se enciende la expresión de la proteína CD38 (marcador de estado de activación que también tienen los linfocitos T activados). Otra molécula accesoria fundamental en los linfocitos B es CD40, puesto que cuando esta molécula se une a su ligando, da señales al linfocito B para que cambie de isotipo en su Inmunoglobulina (Resino, 2009).

Otra forma de seguir la maduración de los linfocitos B es a través de la expresión de los genes de las inmunoglobulinas:

a) **Las células primordiales linfoides** expresan MHC-II y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). También son CD19+, CD24+.

b) **Progenitor de células B (pro-B)**: comienza el reordenamiento de los genes de las cadenas pesadas de las Ig. Aparece CD10, CD20, CD21, CD22, CD38 y CD32.

c) **Las células pre-B:**

– Expresan cadenas  $\mu$  (IgM) en el citoplasma. Aquí, ya se ha producido la exclusión alélica de los genes materno o paterno.

– Se produce el reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras.

– Expresan cadenas  $\mu$  en la membrana junto con los pseudogenes de las cadenas ligeras, en baja densidad.

– Pierden los marcadores TdT; CD38 y CD10.

d) **Las células B inmaduras** sintetizan cadenas ligeras kappa o lambda y pueden expresar IgM en la superficie. La célula B queda determinada a reconocer un tipo de Ag. Aparece CD23. (Resino, 2009)

- **CD19.**

En inmunología se denomina CD19 (del inglés cluster of differentiation 19) a un tipo de antígeno CD propio del sistema inmune de mamíferos. Se caracteriza por poseer un peso molecular de 95 kDa y su naturaleza bioquímica lo encuadra dentro de la familia de las inmunoglobulinas (Janeway, 2000).

Molécula de membrana expresada por todos los linfocitos B, en todas las etapas de su desarrollo tanto precursores como maduros, implicada en la regulación de la activación y proliferación de la célula B (Navarra, 2019).

- **CD20.**

En inmunología se denomina CD20 (del inglés cluster of differentiation 20) a un tipo de antígeno CD propio del sistema inmune de mamíferos. Se expresa en los precursores de las células B y en las células B maduras, pero se pierde tras su diferenciación en células plasmáticas. Se caracteriza por poseer un peso molecular de 33-37 kDa. En las células B en reposo, el CD 20 aparece en una forma no fosforilada de 32 kDa. Tras la estimulación con mitógenos, el CD20 se fosforila, dando lugar a 2 isoformas de 35 a 37 kDa (Patología, s.f).

Su función biológica en la célula es: formar un canal de calcio cuando oligomeriza; por ello, podría regular la activación de las células B. Se expresa específicamente en células B, en individuos sanos, y en diversos tipos celulares, en pacientes de cáncer (Janeway, 2000).

El antígeno CD20 es una fosfoproteína no glucosilada de aproximadamente 33 kD que se expresa en células B humanas normales y malignas y se cree que actúa como un receptor durante la activación y diferenciación de las células B. Se ha informado que el antígeno CD20 se expresa en células B normales de sangre periférica, ganglios linfáticos, bazo, amígdalas, médula ósea, leucemias agudas y leucemias linfocíticas crónicas. CD20 se recomienda para la detección de antígenos específicos de interés en tejidos normales y neoplásicos, como complemento de la histopatología convencional utilizando tinciones histoquímicas no inmunológicas (Biosystems, 2019).

Se puede encontrar en cantidades mayores que las normales en pacientes de ciertos tipos de linfomas de células B y de leucemias. La medición de la cantidad de antígeno CD20 en las células sanguíneas puede ayudar a diagnosticar el cáncer o planificar el tratamiento de cáncer. El antígeno CD20 es un tipo de marcador tumoral (NIH, 2018).



- **CD79a.**

Cluster de CD79A diferenciación también conocida como cadena compleja asociada a la proteína alfa del receptor de antígeno de células B y MB-1 glicoproteína de membrana, es una proteína que en los humanos está codificada por el CD79A gen. La proteína CD79a junto con la proteína CD79b relacionada, forma un dímero asociado con la inmunoglobulina unida a membrana en las células B, formando así el receptor de antígeno de células B (BCR). Esto ocurre de manera similar a la asociación de CD3 con el receptor de células T, y permite que la célula responda a la presencia de antígenos en su superficie.

La proteína CD79a está presente en la superficie de las células B a lo largo de su ciclo de vida, y está ausente en todas las demás células sanas, por lo que es un marcador altamente confiable para las células B en inmunohistoquímica. La proteína permanece presente cuando las células B se transforman en células plasmáticas, y también está presente en prácticamente todas las células B neoplasias, incluyendo las células B linfomas, plasmacitomas, y mielomas. También está presente en linfocitos anormales asociados con algunos casos de enfermedad de Hodgkin. Porque incluso en los precursores de células B, puede usarse para teñir un rango de células más amplio que el marcador de células B alternativo CD20, pero este último se retiene más comúnmente en los linfomas de células B maduras, por lo que los dos a menudo se usan juntos en paneles de inmunohistoquímica (Anthony, 2003).

El complejo CD79 es un heterodímero unido por disulfuro que está asociado de forma no covalente con las inmunoglobulinas unidas a membrana en las células B. Este complejo de polipéptidos e inmunoglobulina constituye el receptor de antígeno de células B. Los dos componentes de este complejo se designan CD79a y CD79b. Se informa que el antígeno CD79a aparece por primera vez en la etapa de células pre-B, temprano en la maduración, y persiste hasta la etapa de células plasmáticas donde se encuentra como un componente intracelular. No está presente en líneas mieloides o de células T. CD79a se recomienda para la detección de antígenos específicos de interés en tejidos normales y neoplásicos, como un complemento de

la histopatología convencional utilizando tinciones histoquímicas no inmunológicas (Biosystems, 2019).

## **JUSTIFICACIÓN.**

La Leucemia linfoblástica aguda (ALL) es una proliferación neoplásica clónica de células linfoides inmaduras del sistema hematopoyético. Es una enfermedad básicamente infantil, con una edad media de diagnóstico de 10 años; la ALL puede presentarse a cualquier edad en los adultos y tiene un pequeño aumento de incidencia en personas de más de 70 años.

En la ALL el inmunofenotipo es el principal medio de diagnóstico debido a la falta de distinción citoquímica y morfológica, está dirigido a la identificación de la línea celular implicada en el proceso de proliferación clonal y el estadio madurativo de la misma, empleando diferentes paneles de marcadores claramente establecidos por grupos expertos en citometría en el que se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos frente a antígenos con diferentes especificidades para cada línea.

Una técnica que ha permitido la clasificación de las células de acuerdo con las proteínas presentes en o sobre las células es la citometría de flujo, la cual ha jugado un papel importante en el entendimiento, diagnóstico y tratamiento de enfermedades como la ALL.

## **OBJETIVO GENERAL.**

- Obtener e identificar in vitro células B de medula ósea murina.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Obtener células B viables de medula ósea murina.
- Realizar el marcaje de las células B con los anticuerpos anti-ratón CD19, CD20 y CD79a
- Realizar la identificación de las células B marcadas por medio de citometría de flujo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

**Animales:** Se utilizaron ratones hembras de 20 a 25 g de la cepa CD1 obtenidos de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la unidad mantenido a  $22 \pm 3$  ° C y  $55 \pm 15\%$  de humedad relativa con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. Se les dio alimento en pellets y agua potable.

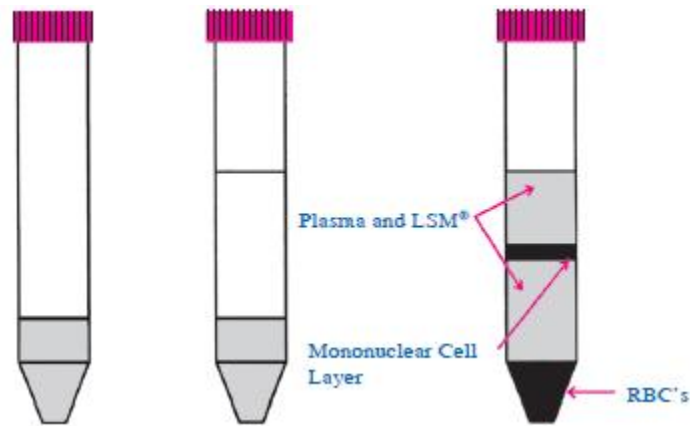
### ➤ **Obtención de células B de medula ósea.**

1. Sacrificar a un ratón de la cepa CD1 (hembra, 20 a 25 g,) por dislocación cervical. Los pasos experimentales posteriores se llevarán a cabo en una campana de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70 % y esterilizada durante 20 minutos con luz ultravioleta (UV).
2. Colocar el animal en su parte posterior dorsal en una tabla de disección limpia y enjuagar con alcohol reactivo al 70% para desinfectar. Este paso minimiza la posibilidad de contaminar las preparaciones celulares con pelaje o partículas externas.
3. Hacer una incisión en cada pata trasera con unas tijeras estériles de punta roma. Sujetar firmemente la piel y tirar suavemente hacia abajo para exponer los músculos.
4. Cortar la pata trasera justo por encima de la articulación pélvica / cadera con unas tijeras de disección afiladas y estériles, asegurándose de que la epífisis permanezca intacta sin exponer su contenido al exterior.
5. Después de retirar la pata trasera, sostenerla con cuidado desde el lado inferior. Con unas tijeras estériles, hacer una incisión justo por encima de las garras para quitar la parte inferior de la pata trasera.
6. Cortar la pata trasera justo debajo de la articulación de la rodilla a través de los ligamentos para eliminar la tibia, asegurándose de que la epífisis permanezca intacta.
7. Separar el fémur de los músculos circundantes y eliminar el exceso de tejido con unas pinzas y tijeras estériles, manteniendo intactos los extremos del hueso tanto del fémur como de la tibia.

8. Retirar cualquier músculo / tejido sobrante adicional del fémur y tibia utilizando un bisturí, dejando los huesos expuestos y limpios de residuos de musculo.
9. Repetir el mismo procedimiento con otra pata de ratón.
10. Transferir los huesos a Solución salina Alsever en un recipiente estéril (caja Petri) para preservar las células.
11. Recortar los dos extremos de los fémures y tibias con cuidado, utilizando tijeras afiladas y estériles para exponer el eje de la médula interior.
12. Enjuagar el contenido de la médula con solución Alsever con una jeringa de insulina de 1 ml con una aguja de 29G × 1/2. Recoger el contenido en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml. (Los huesos deben aparecer blancos una vez que toda la médula se haya expulsado completamente).

➤ **Preparación de la suspensión de células de médula ósea.**

13. Centrifugar la suspensión celular a 2500 rpm × 15 min.
14. Retirar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular en 1 ml de solución Alsever.
15. Transferir asépticamente 3 ml de medio de gradiente de densidad Lymphoprep en un tubo de centrifuga de 15 ml para el aislamiento de las células mononucleares mediante las diferencias en la densidad celular.
16. Colocar con cuidado el mililitro del paso 14 sobre los 3 ml de Lymphoprep (temperatura ambiente) en el tubo de centrifuga de 15 ml, creando una interfaz entre el sedimento celular y el Lymphoprep.
17. Centrifugar el tubo a 400 x g a temperatura ambiente durante 30 minutos. La centrifugación debe sedimentar los eritrocitos y los leucocitos la banda de linfocitos mononucleares por encima del Lymphoprep (las bandas serán capa de plasma - capa de células mononucleares - capa de LSM - pellet RBC) como se muestra en el siguiente diagrama.



**Figura 1.** Diferencias en la densidad celular

18. Aspirar la capa superior de plasma transparente hasta 2-3 mm por encima de la capa de linfocitos.
19. Aspirar la capa de linfocitos más aproximadamente la mitad de la capa de Lymphoprep debajo de ella y transferirla a un tubo de centrifuga.
20. Agregar un volumen igual de solución Alsever a la capa de linfocitos en el tubo de centrifuga y centrifugar durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) a una velocidad suficiente para sedimentar las células sin dañarlas. Es decir, 160-260 x g. (El lavado elimina el Lymphoprep y reduce el porcentaje de plaquetas).
21. Lavar las células nuevamente con solución Alsever y resuspender nuevamente en dicha solución para sus aplicaciones.
22. Recuperar una alícuota de suspensión celular para el recuento de células.
23. Contar el número total de células utilizando un hematocitómetro y el método de tinción con azul tripáno para la viabilidad celular.

➤ **Marcaje de las células B de medula ósea murina mediante citometría de flujo.**

Para realizar el análisis inmunofenotípico de las células en las muestras de MO disgregadas, se empleó un panel de anticuerpos combinados en 3 fluorescencias distintas (Fluorocromos: FITC/PE/APC).

Los anticuerpos anti-ratón utilizados para este ensayo se muestran en la Tabla 1.

<b>Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje de células B de medula ósea murina y sus respectivos fluorocromos.</b>		
CD	Fluorocromo	Función
CD19	FITC	Marcador para todas las etapas de células B
CD20	APC	Marcador de células B, útil para célula B post-medula ósea hasta maduración previa a célula plasmática.
CD79a	PE	Marcador de células B, desde linfocito Pre-B hasta célula plasmática

FITC: isotiocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, APC: alofocianina.

24. Para el marcaje tomar alícuotas de 50 µl de muestra de MO murina obtenida en el paso 21 y adicionar 2 µl de anticuerpo conjugado con fluorocromo como se muestra en la Tabla 2.
25. Incubar durante 20 minutos a 37°C en oscuridad.
26. Una vez transcurrido este tiempo, centrifugar las muestras y realizar dos lavados con 50 µl de buffer fosfato salino (PBS).
27. Fijar las células de MO murina con 450 µl de para-formaldehído por 10 minutos.
28. Realizar 2 lavados más con 250 µl de PBS.
29. Refrigerar las muestras en PBS hasta el momento del análisis por citometría de flujo.

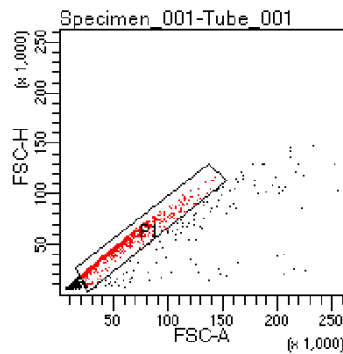
<b>Tabla 2. Panel Inmunofenotípico utilizando 3 fluorescencias distintas.</b>					
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Cantidad de muestra de MO murina	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Fluorocromo	---	CD19	CD20	CD79a	CD19 CD20 CD79a
Cantidad de marcador.	---	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl de cada marcador.

--- testigo (células sin marcador)

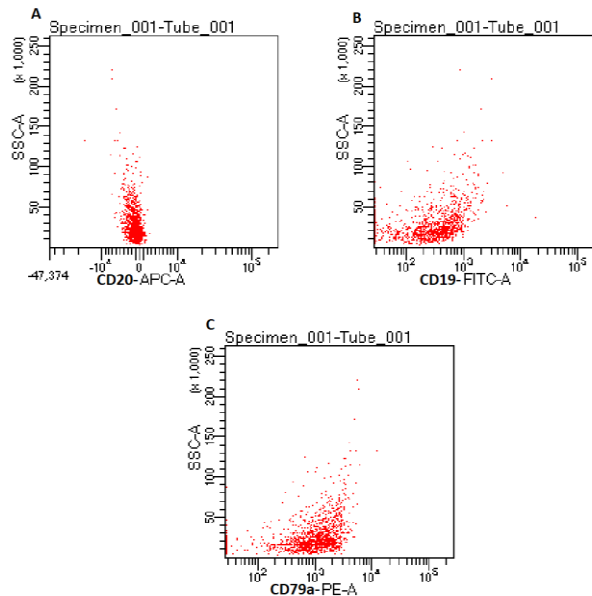
Para llevar a cabo el análisis de citometría de flujo y la compensación del equipo se emplearon las mismas muestras. Posteriormente, se ajustaron las señales de fluorescencia y voltajes de cada detector con el fin de asegurar la discriminación adecuada entre las señales positivas y negativas. La calibración del equipo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## RESULTADOS.

Los resultados obtenidos del análisis inmunofenotípico de las células B obtenidas de medula ósea murina se muestran en la figura 2-4.

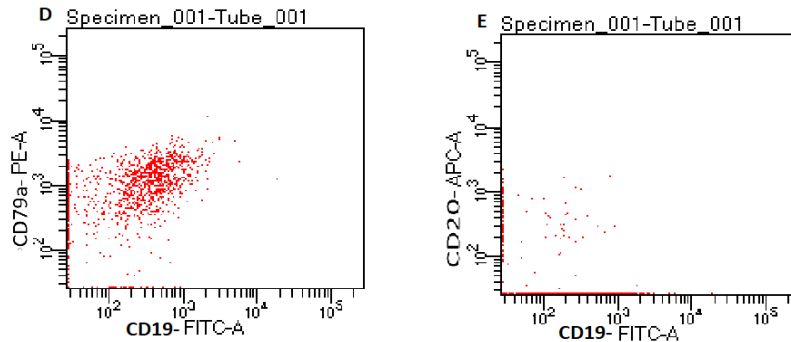


**Figura 2.** Análisis por citometría de flujo de células B de médula ósea murina. Grafica para selección de eventos, representa las células sin marcar como control o testigo. Tamaño de la célula (forward scatter –FSC-).



**Figura 3.** Análisis fenotípico de células B de medula ósea murina utilizando un marcaje con tres fluorescencias. Se ilustran la complejidad de la célula (side scatter –SSC-) en el eje de las Y y la

intensidad de la fluorescencia (eje de las X). Panel A: Expresión de CD20 marcado con alofocianina (APC). Panel B: Expresión de CD19 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Panel C: Expresión de CD79a marcado con ficoeritrina (PE). El desplazamiento hacia la derecha indica un marcaje positivo.



**Figura 4.** Panel D: Expresión de CD19 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en relación con CD79a marcado con ficoeritrina (PE), se muestra un mayor número de células marcadas con CD19 Panel E: Expresión de CD19 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en relación con CD20 marcado con alofocianina (APC).

## DISCUSIÓN.

Las leucemias agudas (LA) y los síndromes mielodisplásicos (**SMD**) son hemopatías malignas de características clínicas, biológicas y evolutivas muy heterogéneas. Desde el punto de vista clínico-biológico, se ha avanzado notablemente en la identificación y caracterización molecular de estas enfermedades. En la actualidad, los criterios empleados para la clasificación diagnóstica de los pacientes con LA y SMD se fundamentan entre otras estrategias diagnósticas en el análisis inmunofenotípico de las distintas subpoblaciones celulares presentes en el tejido afectado (principalmente medula ósea), estableciendo la línea celular, su estadio madurativo y las aberraciones fenotípicas presentes en las células neoplásicas. Por otra parte, el análisis inmunofenotípico de células normales de medula ósea mediante Citometría de Flujo es una herramienta de gran utilidad para la identificación de los fenotipos en células malignas con implicación directa en el pronóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad (Roa & Florentino, 2010).



En cuanto el manejo de muestras en Citometría de Flujo, se ha descrito gran variabilidad en los resultados en relación con las condiciones de transporte y almacenamiento de las mismas, y en la fase analítica con el proceso de fijación y lisis de las muestras, variables que en conjunto tienen un impacto directo en la interpretación de los resultados. Por esta razón es fundamental establecer los valores de referencia en muestras normales para los distintos marcadores empleados en los paneles inmunofenotípicos de cada laboratorio de citometría para reducir la variabilidad a la hora de interpretar el fenotipo de células anormales en LMA y SMD (Jansen, 2009).

En el presente trabajo el procedimiento descrito para la obtención de las células de medula ósea no trajo complicaciones, sin embargo, en la preparación de la suspensión de células se presentaron varios problemas: el primero fue que el gradiente de densidad que debe formarse no se logró, por lo que no se pudo separar con exactitud los linfocitos y el segundo problema fue que con los lavados tanto para separarlos como para el marcaje se pudieron perder gran número de células.

La maduración del linfocito B inicia en la medula ósea. La primera célula que se distingue como de estirpe B es la célula progenitora B (célula Pro-B), la cual expresa CD19 (primer marcador de células B) y CD79a. Esta célula sufre un rearreglo en el segmento genético del cromosoma 14; en esta etapa la célula aun no presenta inmunoglobulinas de superficie. Después se llevan a cabo rearreglos genéticos, resultando una inmunoglobulina M (IgM) de superficie, convirtiendo la célula pre B en célula B inmadura. Para salir a la circulación sanguínea, la célula B inmadura debe expresar inmunoglobulina D (IgD) de superficie y convertirse en una célula B virgen; esta célula presenta CD79a y CD19 (Sarmiento & Gabiño, 2012).

Existen ciertos marcadores como el CD5 que sirven para distinguir cierta etapa en el desarrollo de la célula, mientras que existen algunos marcadores como CD19 o CD79a que son más útiles para diferenciar la estirpe celular. Este es uno de los principios por los cuales se piden varios marcadores celulares al mismo tiempo, para encontrar la estirpe y el momento evolutivo de la célula (Sarmiento & Gabiño, 2012).

El linfocito B virgen es la primer célula B que presenta CD20 y normalmente se encuentra en sangre periférica y en la zona del manto del folículo linfoide. Después de ser estimulada por un antígeno, la célula lleva a cabo una proliferación y transformación. La célula viaja al centro germinal y se transforma en un centroblasto por hipermutación de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras, expresando los marcadores CD10 y Bcl6. Después ya que las células sufrieron esta mutación y ya con sus inmunoglobulinas modificadas, se conocen se conocen como centrocitos (estos nombres hacen referencia a células inmaduras [blastos] y maduras [citos] del centro germinal). El centrocito desactiva Bcl6 para convertirse en una célula B de memoria o célula plasmática. Las células post-centro germinal (célula plasmática y célula B de memoria) son las ultimas células en la diferenciación del linfocito B. En el caso de las células plasmáticas es importante mencionar que no expresan CD20, pero expresan CD38,CD138 y CD79a (Sarmiento & Gabiño, 2012).

Existe controversia respecto a la expresión de marcadores característicos de células B, los más comúnmente descritos son: CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23. Empleando anticuerpos monoclonales anti-marcadores de ratón, se identificó de manera superficial por citometría de flujo que las células de medula ósea murina aisladas son positivas para CD19, CD20 Y CD79a.

## **CONCLUSIÓN.**

El procedimiento descrito para la obtención de células de medula ósea murina fue el adecuado, sin embargo, se debe tener cuidado en las condiciones de almacenamiento y procesamiento de las muestras para que estas no tengan un impacto directo con los resultados.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica avanzada, altamente sensible y automatizada, que se emplea para el inmunofenotipaje de las células normales y leucémicas y es una herramienta de gran utilidad para el pronóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad.

## REFERENCIAS

- Leukemia y Lymphoma Society. (2014). Leucemia linfoblástica aguda. *AMGEN*, 6.
- Anthony, S. (2003). *Manual de citología diagnóstica*. Greenwich Medical Media.
- Atienza, L. (2016). *Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda*. Madrid: Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica.
- Bernard, A. (1984). *Human leukocyte differentiation antigens*. Presse Med.
- Biosystems, L. (2019). *CD20*. Obtenido de Leica Biosystems: <https://shop.leicabiosystems.com/us/ihc-ish/ihc-primary-antibodies/pid-cd20>
- Bioteconología, C. N. (s.f.). *DIO-Photonic*. Obtenido de Citometría de Flujo: [http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic\\_en/Review/citometria\\_de\\_flujo.htm](http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm)
- Gonzalez, A. K. (2014). Poducción diferencial de citocinas promotoras e inhibidoras de la proliferacion mieloide en el sobrenadante de cultivos de la linea celular WEHI-3, celulas de medula òsea de raton normal y suero de ratones tratados con extractos de *Sechium spp.* *Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza*, 31.
- Iáñez, E. (s.f). *Células del sistema inmune*. Ciudad de Granada, España.
- Janeway, J. (2000). *Inmunobiología*. Masson.
- Jansen, J. (2009). Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* .
- Jiménez, M. (3 de mayo de 2018). *Qué son los linfocitos B y qué función cumplen* . Obtenido de Mejor con Salud: <https://mejorconsalud.com/linfocitos-b-funcion/>
- Navarra, C. U. (2019). *CD19*. Obtenido de Diccionario Medico: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/cd19>
- NIH. (18 de septiembre de 2018). *Antígeno CD20*. Obtenido de Instituto Nacional de Cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/antigeno-cd20>
- Ortega, M. A., Osnaya, M. L., & Rosas, J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 26.
- Parham, P. (2016). *Inmunología. El Manual Moderno*.
- Patología, S. E. (s.f). *Patología Linfoide*. Madrid: SEAP.
- Pavón, L. (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. España.
- Resino, S. (2 de julio de 2009). *Ontogenia de los linfocitos B*. Obtenido de Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas (IMEI): <https://epidemiologiamolecular.com/ontogenia-linfocitos-b/>

- Roa, D., & Florentino, S. (2010). Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría. *Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.*
- Sala, M., Blanco, B., & Pérez, M. (s.f). *Hematología clínica*. Obtenido de Hematología clínica: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP10.pdf>
- Sarmiento, M., & Gabiño, B. (2012). Entendiendo el inmunofenotipo de las neoplasias de células B maduras. *Unidad de Medicina Interna, Hospital Medica Sur.*
- Suárez, M. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.*
- Torres, J. (25 de marzo de 2015). *Antígenos de diferenciación aplicados al diagnóstico. Clúster de Diferenciación*. Obtenido de Instituto Nacional de Cancerología: [http://incan-mexico.org/wp\\_hematologia/wp-content/uploads/Ant%C3%ADgenos-de-Diferenciaci%C3%B3n.pdf](http://incan-mexico.org/wp_hematologia/wp-content/uploads/Ant%C3%ADgenos-de-Diferenciaci%C3%B3n.pdf)
- Trejos, M., & Virginia, C. (s.f). *Estudios inmunofenotípicos de los linfocitos B y T*. Obtenido de <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/560/09estu.html>



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA  
BIOLÓGICA**

**“OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN IN VITRO  
DE CÉLULAS B DE MEDULA ÓSEA MURINA”**

**PRESENTA:**

Rebeca Romero Camarena

**Tel:** 55-46-99-51-88

**Dirección:** Calle Pte. 13 Mz. 164 Lote 5 San Miguel Xico 4<sup>a</sup>  
sección, Valle de Chalco Solidaridad

**Lugar de realización de Servicio Social:** UAM- X

**ASESORES:**

M. en C. Alejandro Palma Ramos No. Económico 15941  
Dr. Felipe Mendoza Pérez No. Económico 7183

**Fecha de inicio:** 5-noviembre-2018

**Fecha de término:** 5-mayo-2019

**Fecha de entrega:** octubre 2019

## **RESUMEN.**

### **INTRODUCCIÓN**

La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas. Se caracteriza por un incremento en el número de células hematopoyéticas aberrantes en médula ósea y en sangre periférica. Se deriva de la expansión clonal de precursores hematopoyéticos que han perdido su capacidad para proceder a la diferenciación terminal y funcionalidad. La leucemia se origina de una acumulación de un número mínimo de eventos genéticos que resultan en el crecimiento celular acelerado y el bloqueo de diferenciación celular. Un gran número de alteraciones genéticas, incluyendo translocaciones cromosómicas específicas, se han identificado y ligado causalmente a la leucemogénesis, pero la base molecular y fenotipo de la leucemia permanece en gran medida desconocido (Gonzalez, 2014).

De acuerdo con su evolución se clasifica como crónica y aguda, y según su estirpe celular afectada será mieloide o linfocítica también llamada linfoblástica (Ortega, Osnaya, & Rosas, 2007).

La leucemia crónica suele progresar lentamente y los pacientes tienen una cantidad mayor de células maduras. En general, estas células maduras pueden desempeñar algunas de sus funciones normales. La leucemia aguda es una enfermedad de progresión rápida que produce células que no están completamente desarrolladas. Estas células no pueden desempeñar sus funciones normales.

En la leucemia mieloide, el cambio canceroso comienza en una célula de la médula ósea que normalmente forma los glóbulos rojos, algunos tipos de glóbulos blancos y las plaquetas. En el caso de la leucemia linfoblástica, el cambio canceroso comienza en una célula de la médula ósea que normalmente forma linfocitos es decir un tipo de glóbulo blanco.

La Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) se debe a una lesión adquirida o congénita del ADN de una sola célula en la médula ósea. Los efectos de la ALL incluyen la proliferación y acumulación descontroladas y exageradas de células llamadas "linfoblastos" o "blastos leucémicos" que no funcionan como las células sanguíneas

normales. La presencia de los blastos leucémicos impide la producción de las células normales. Como resultado, cuando se diagnostica un caso de ALL, la cantidad de células sanguíneas sanas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) suele ser menor de lo normal ( Leukemia y Lymphoma Society, 2014).

Las leucemias linfoblásticas tienen dos variantes determinadas por la línea celular que predomina: la primera es la más frecuente y en 76% se debe a las células linfocíticas tipo B; la segunda se encuentra en 20% de todas las ALL y se debe a las células tipo T. Como la leucemia linfoblástica aguda carece de hallazgos morfológicos y citoquímicos específicos, para la evaluación diagnóstica es esencial llevar a cabo el inmunofenotipo. Este inmunofenotipo o las características físicas de la célula de leucemia determina si las células se originaron de linfocitos B o linfocitos T. Mediante estos métodos inmunológicos es posible reconocer patrones característicos de moléculas de superficie (en la membrana celular o en su citoplasma), que pueden ser aprovechados como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares.

Esta caracterización se realiza mediante anticuerpos monoclonales (AcMo); cada anticuerpo monoclonal distingue un solo tipo de molécula, e incluso partes específicas y variantes de cada tipo de molécula. Los llamados grupos de diferenciación (CD, "cluster of differentiation"): consisten en todos los AcMo que reconocen una determinada molécula de membrana leucocitaria y algunos son específicos para diferentes poblaciones celulares (Iáñez, s.f). El subtipo de linfocitos B se reconoce al encontrar, en las células blásticas leucémicas, marcadores en la superficie celular idénticos a los que se encuentran en los linfocitos B normales. (Ortega, Osnaya, & Rosas, 2007)

Para definir el linaje B, los blastos deben expresar fuertemente el antígeno CD19, el cual tiene que estar asociado con al menos uno de los siguientes antígenos: CD79a citoplasmático, CD22 citoplasmático o de membrana y el CD10. Por lo tanto, la expresión solo del CD19 no es suficiente para confirmar el fenotipo B. Los antígenos CD19 y CD22 son sensibles y específicos de la línea linfocítica B. Sin embargo, el CD79a, a pesar de tener una alta sensibilidad, no es absolutamente

específico de este linaje, ya que puede estar expresado en células mieloides y sobre los linfocitos T, al igual que en blastos de pacientes con LLA-T y LMA, respectivamente

La mayoría expresan CD24 y CD21. Una pequeña fracción de células B de los adultos normales expresan el antígeno CD45. La diferenciación de las células B posterior a la médula ósea no se conoce muy bien y no es posible definir con exactitud los estadios discretos por la expresión de antígenos particulares (Trejos & Virginia, s.f).

En la ALL de células pre-B, el subtipo más frecuente, con un 70% de pacientes. El nombre de pre-B se refiere al hecho que el clon de células leucémicas está destinado al linaje de células B, como se pone de manifiesto por los marcadores tempranos, CD10 (el antígeno común de la ALL: CALLA) y el CD19, y reagrupaciones genéticas de inmunoglobulinas de superficie. La ALL de células -T es el segundo subtipo de ALL. El último subtipo de ALL es el de célula B madura que representa un 5% de las ALL del adulto. Esta enfermedad se clasifica como linfoma de Burkitt, en ausencia de implicación medular, mientras cualquier implicación de médula le confiere la designación de LLA de células B maduras (Sala, Blanco, & Pérez, s.f).

Para establecer el diagnóstico de la ALL de linfocitos B, como se mencionó anteriormente es necesario realizar la inmunofenotipificación, un proceso que identifica las células según el tipo de proteínas (antígenos) de la superficie celular. La "citometría de flujo" es una prueba que se puede usar para hacer la inmunofenotipificación ( Leukemia y Lymphoma Society, 2014).

La aparición de los anticuerpos monoclonales y las mejoras que se han realizado en las técnicas de citometría de flujo y de reacción en cadena de la polimerasa han permitido clasificar las ALL en distintos tipos, según el estadio madurativo de sus linfoblastos. Esta clasificación es la más utilizada en la actualidad y tiene implicaciones pronósticas y para el tratamiento (Atienza, 2016).



## **OBJETIVO GENERAL.**

- Obtener e identificar in vitro células B de medula ósea murina.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Obtener células B viables de medula ósea murina.
- Realizar el marcaje de las células B con los anticuerpos anti-ratón CD19, CD20 y CD79a
- Realizar la identificación de las células B marcadas por medio de citometría de flujo.

## **CONCLUSIÓN.**

El procedimiento descrito para la obtención de células de medula ósea murina fue el adecuado, sin embargo, se debe tener cuidado en las condiciones de almacenamiento y procesamiento de las muestras para que estas no tengan un impacto directo con los resultados.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica avanzada, altamente sensible y automatizada, que se emplea para el inmunofenotipaje de las células normales y leucémicas y es una herramienta de gran utilidad para el pronóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad.

## **REFERENCIAS**

- Atienza, L. (2016). *Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda*. Madrid: Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica.
- Gonzalez, A. K. (2014). Producción diferencial de citocinas promotoras e inhibitoras de la proliferación mieloide en el sobrenadante de cultivos de la línea celular WEHI-3, células de medula ósea de ratón normal y suero de ratones tratados con extractos de *Sechium spp.* *Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza*, 31.
- Leukemia y Lymphoma Society. (2014). Leucemia linfoblástica aguda. *AMGEN*, 6.
- Ortega, M. A., Osnaya, M. L., & Rosas, J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 26.
- Trejos, M., & Virginia, C. (s.f). *Estudios inmunofenotípicos de los linfocitos B y T*. Obtenido de <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/560/09estu.html>
- Sala, M., Blanco, B., & Pérez, M. (s.f). *Hematología clínica*. Obtenido de Hematología clínica: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP10.pdf>