

Caietele laboratorului de hematologie clinică

# DIAGNOSTICUL IMUNOFENOTIPIC ÎN IMAGINI

Dr. **Doina BARBU**

Prof. dr. **Delia MUT POPESCU**



**EDITURA MEDICALĂ**  
București, 2018

© Editura Medicală, 2018

„Toate drepturile editoriale asupra ediției românești aparțin în exclusivitate Editurii Medicale. Publicația este protejată integral de legislația internă și internațională. Orice valorificare a conținutului în afara limitelor acestor legi și a permisiunii editorilor este interzisă și pasibilă de pedeapsă. Acest lucru este valabil pentru orice reproducere – integrală sau parțială, indiferent de mijloace (multiplicări, traduceri, microfilmări, precum și la stocarea și prelucrarea în sistem electronic).“

## Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României Barbu, Doina

**Diagnosticul imunofenotipic în imagini** / Doina Barbu, Delia Mut Popescu. - București : Editura Medicală, 2018

Conține bibliografie

ISBN 978-973-39-0841-8

I. Mut Popescu, Delia

61

Redactor: **Corina GHINOIU**

Secretar de redacție: **Maria Elena NEAMȚ**

Tehnoredactor: **Florina ALEXE**

## CUPRINS

Cuvânt înainte.....	5
Glosar .....	7
Cum citim o histogramă DOT-PLOT .....	10
Definiție și scurt istoric al citometriei în flux .....	12
Generalități și considerații tehnice despre citometria în flux ....	15
Maturația normală a celulelor hematopoietice .....	24
Imunofenotiparea prin citometrie în flux a leucemiilor acute (ICF) .....	30
Imunofenotiparea în limfoproliferările cronice .....	54
BIBLIOGRAFIE.....	71

## A

*Anticorpi monoclonali (mAbs / Mab / mAb)* – anticorpi care recunosc același epitop, fiind generați de o singură linie celulară (clonă) provenită dintr-o singură celulă inițială (hibrid), toate celulele clonei fiind identice între ele din punct de vedere genetic. Celula hibrid este produsul fuziunii *in vitro* dintre un limfocit B din splina normală de șoarece, producător de anticorpi de specificitate cunoscută și un plasmocit de mielom. Linia celulară astfel creată, numită hibridom, este capabilă să producă o cantitate nelimitată de anticorpi.

În anul 1984, Georges Kohler și César Milstein au primit Premiul Nobel pentru Medicină pentru această descoperire. [1, 2]

## C

*Citometrie în flux (flowcitometrie)* – tehnică utilizată pentru măsurarea caracteristicilor particulelor biologice, celule sau constituenți celulari, pentru a identifica diferite populații celulare. Tehnica se bazează pe detectarea și măsurarea fluorescenței emise de celulele aflate în suspensie într-un lichid în curgere. Suspensia celulară aflată într-un curent de curgere este intersectată de o rază laser cu lungime de undă cunoscută, iar lumina emisă de markerii fluorescenți ai celulelor este detectată de tuburi fotomultiplicatoare, putând astfel fi măsurate simultan mai multe variabile: volum celular, complexitate celulară internă, număr, viabilitate, conținut de acizi nucleici etc.

*Conjugate* – complexe formate din anticorpi monoclonali și coloranți fluorescenți (fluorocromi).

*CD – Clusters of differentiation* sau „clasele de diferențiere” – termenul definește molecule de pe membrana celulară. Imunofenotiparea utilizează CD ca antigene celulare, considerându-le markeri ce caracterizează etapele de diferențiere și de activare funcțională ale celulelor. Anticorpii monoclonali au specifi-

tate pentru fiecare CD și cu toate că sunt imunoglobuline anti-, în practica curentă sunt denumite în mod convențional tot CD. Prezența sau absența markerului este notată cu CD+ respectiv CD-. [3]

## D

*Dot plot* – grup de puncte care definesc distribuția unei populații celulare.

*Discriminarea populațiilor* – se referă la separarea categoriilor de evenimente analizate și se realizează cu ajutorul unor discriminatori: fie un sistem de axe ortogonale, fie o poartă/fereastră electronică desenată de operator.

## F

*Fenotip imun* – totalitatea caracteristicilor antigenice generate de prezența sau absența antigenelor specifice.

*Fluorocrom* sau *fluorofor* sau *colorant fluorescent* – substanță chimică capabilă să absoarbă energia fotonică a unui fascicul luminos incident și, după ce o transformă, să emită lumină fluorescentă. Coloranții fluorescenți sunt folosiți pentru marcarea fluorescentă a celulelor, permițând obținerea de informații despre parametrii structurali sau funcționali ai celulelor. Exemple de fluorocromi folosiți în flowcitometrie: FITC (izotiocianatul de fluoresceină), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina), PI (propidium iodide), 7AAD (7-aminoactinomicin D) ș.a.

*Fluorescență* – lumină emisă de fluorocromii excitați de o rază laser. Pentru a putea fi utilizați, fluorocromii trebuie să emită lumină cu lungime de undă mai mare decât lumina excitantă. Analiza fluorescenței este parametrul cel mai studiat în citometria de flux.

## G

*Gate* – poartă sau fereastră electronică ce separă o populație celulară de analizat.

## H

*Histogramă* – exprimarea grafică a analizei celulare prin citometria de flux care pune într-un sistem de axe ortogonale x, y

un parametru de achiziție, și permite furnizarea unei medii a parametrului respectiv, cunoscut ca indicator sub numele de „mean”. De ex.: „mean” de fluorescență sau MFI (Mean Fluorescence Intensity).

**I**  
**Imunofenotipare** – tehnică folosită în studiul proteinelor exprimate de celule. Este frecvent utilizată în cercetarea fundamentală și în aplicațiile clinico-medicale din domeniul medicinei de laborator (de ex., în detectarea biomarkerilor). Are la bază metoda citometriei în flux (flowcitometrie) și cunoașterea antigenelor celulare denumite CD.

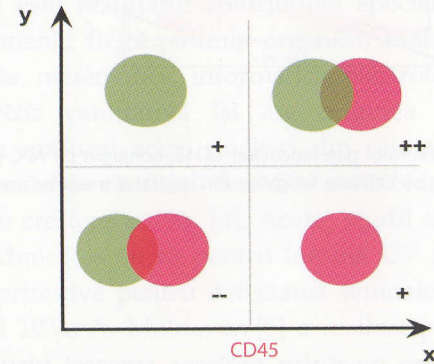
**L**  
**Light scattering (dispersia luminii)** – rezultatul reflexiei și refracției luminii laserului de către celule. Dispersia luminii de către celule de-a lungul razei laser sub un unghi <math><12^\circ</math> este cunoscută sub numele de „forward scatter” (FS), iar dispersia luminii razei laserului în unghi de

**P**  
**Panel de anticorpi** – combinație de markeri conjugați cu fluorocromi; panelurile moderne sunt elaborate pe baza consensurilor de opinie a numeroși experți din întreaga lume în acord cu criteriile de clasificare a hemopatiilor maligne.

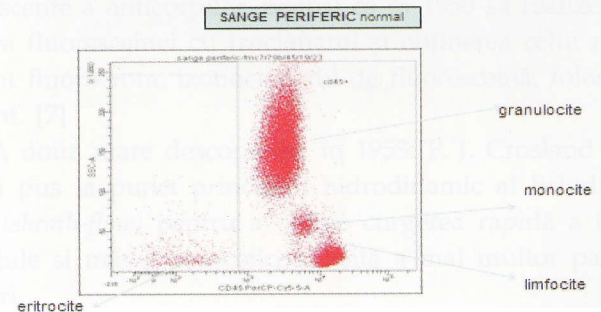
**Policlonal** – produs de mai multe clone de limfocite B.

## CUM CITIM O HISTOGRAMĂ DOT-PLOT

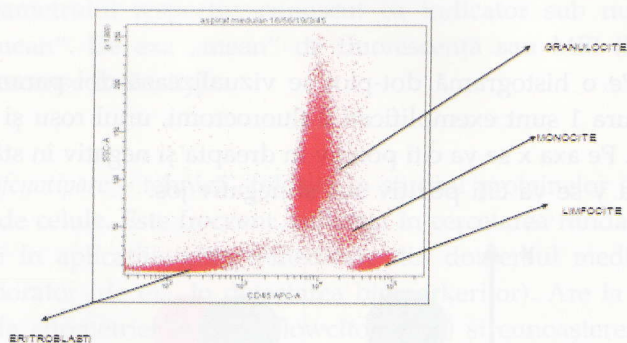
Pe o histogramă dot-plot se vizualizează doi parametri. În figura 1 sunt exemplificați 2 fluorocromi, unul roșu și altul verde. Pe axa x se va citi pozitiv în dreapta și negativ în stânga. Pe axa y se va citi pozitiv sus și negativ jos.



**Fig. 1.** Citirea corectă a expresiei a 2 markeri conjugați cu 2 fluorocromi diferiți. Fluorocromul roșu este pozitiv în cadranele inferior dreapta și superior dreapta și negativ în cadranele inferior stânga și superior stânga. Fluorocromul verde este pozitiv în cadranele superior stânga și superior dreapta și este negativ în cadranele inferior stânga și inferior dreapta.



**Fig. 2.** Exprimarea markerului pan-leucocitar CD45 pe celulele sângelui periferic normal. CD45 conjugat cu PerCP cy5.5 pe axa x și granularitatea SSC-A pe axa y.



**Fig. 3.** Expresia markerului pan-leucocitar CD45, conjugat cu APC pe axa x și SSC pe axa y, pe celulele sangvine din aspiratul medular normal.

## DEFINIȚIE ȘI SCURT ISTORIC AL CITOMETRIEI ÎN FLUX

Citometria este definită drept măsurare a celulelor (kytos = cito = celulă, metro = măsurare). Este dificil de trasat începutul tehnicii în forma cunoscută astăzi, deoarece tehnica propriu-zisă este rezultatul contribuției specialiștilor din numeroase domenii: fizică, chimie organică, biologie, medicină, biotehnologie, matematică, informatică, electrotehnică.

Citometria cantitativă își are originea în 1930 când Casperson a măsurat acizii nucleici din celule, iar în 1950 a demonstrat mărirea cantității de ADN și ARN în celulele aflate în stadiul de creștere activă. [4]. Acele studii au fost realizate folosind Cadmiul ca sursă pentru lumina UV și niște circuite electronice primitive pentru detectarea semnalelor luminoase.

În anul 1934, A. Moldavan [5] a realizat prima numărare de hematii prin trecerea acestora printr-un capilar plasat sub obiectivul unui microscop optic, dar metoda era limitată de lipsa de focalizare a celulelor în fluxul de lichid și de înfundarea frecventă a capilarului. [6]

Alte două descoperiri au marcat istoria citometriei: în 1940, Coons și colaboratorii au dezvoltat tehnica marcării fluorescente a anticorpilor, pentru ca în 1950 să realizeze conjugarea fluoresceinei cu izocianatul și obținerea celui mai important fluorocrom, izotiocianatul de fluoresceină, folosit și în prezent. [7]

A doua mare descoperire, în 1953: P. J. Crosland și Taylor au pus la punct principiul hidrodinamic al lichidului de teacă (*sheath-flow*) pentru a obține curgerea rapidă a lanțului de celule și măsurarea concomitentă a mai multor parametri celulari.

Construcția primelor citometre este legată de Wallace H. Coulter, principiul Coulter al numărării în flux fiind cunoscut din anul 1949 și patentat în 1953: creșterea conductivității elec-

trice a celulelor în mediul salin – principiul impedanței – permitea numărarea celulelor și măsurarea concomitentă a taliei lor. Primul echipament de numărare (Coulter) a fost fabricat în 1956. [8]

Primul dispozitiv de citometrie în flux pe bază de fluorescență (ICP 11) a fost dezvoltat în 1968 de Wolfgang Göhde de la Universitatea din Münster – Germania și comercializat în 1968-1969 de către dezvoltatorul german și producătorul Partec prin Phywe AG din Gottingen. La acel moment, metodele de absorbție au fost folosite pe scară largă și de alți oameni de știință, favorizate fiind de dezvoltarea metodelor de fluorescență. Numele original al tehnologiei citometriei de curgere a fost „cytophotometry puls” (în germană: Impulszytophotometrie). Doar 10 ani mai târziu, în 1978, la Conferința Fundației Americane de Inginerie din Pensacola – Florida, numele a fost schimbat: citometrie în flux, un termen care a devenit repede popular. La scurt timp după aceea, au fost dezvoltate instrumentele pentru citometrie în flux, inclusiv Cytofluorograph – dezvoltat de compania Bio-Physics Systems Inc. (mai târziu: Ortho Diagnostics) în anul 1971, PAS 8000 de la Partec (în 1973), primul instrument FACS de la Becton Dickinson (în 1974), ICP 22 de la Partec-Phywe (în 1975) și EPIX-urile de la Coulter (în 1977-1978). Citometrele timpurii au fost, în general, dispozitive experimentale, dar progresele tehnologice recente au creat o piață considerabilă atât pentru instrumentele și reactivii utilizați în analiză, cât și pentru anticorpii marcați fluorescent și software-ul de analiză. Instrumentele moderne au de obicei mai multe lasere și detectoare de fluorescență.

Prima descriere a anticorpilor monoclonali (mAbs) de către Kohler și Milstein, în 1975, a revoluționat imunologia. Odată cu apariția tehnologiei hibridoma, imunologii au început să producă un număr crescut de anticorpi monoclonali anti-moleculă de pe suprafața leucocitelor. Inevitabil, laboratoare independente, având în vedere aceeași moleculă, au produs diferiți mAbs, recunoscuți sub diferite denumiri.

Primul Atelier Internațional de lucru pentru Diferențierea Antigenelor Leucocitare Umane (HLDA) a fost organizat la începutul anilor 1980, cu intenția de a identifica grupurile de mAc umane comune ce se regăsesc sub nomenclatura de antigen de suprafață celulară, și să fie de acord cu o unificare a denumirilor, pentru o mai bună ușurință în comunicare.

Două rezultate ale atelierelor științifice s-au concretizat în:

- abrevierea „CD” pentru „cluster-ul de diferențiere” fără număr descriptiv;

- numărul CD-ului este atribuit unei molecule sau unui grup de molecule Mab, care recunosc aceeași moleculă, exprimată pe suprafața leucocitelor umane, sau de pe suprafața altor celule ale sistemului imunitar și sunt caracteristice sistemului.

Nomenclatura a fost adoptată în mod universal de către comunitatea științifică, aprobată oficial de către Uniunea Internațională a Societăților Imunologice și susținută de către OMS. Utilizarea sa a evoluat și este acum frecvent folosită pentru a denumi moleculele înșeși.

Cu toate acestea, prin adăugarea denumirii „mAb”, sau „moleculă”, sau „proteină” se precizează markerul celular CDxx sau moleculele de CDxx mAb.

Zece Workshop-uri HLDA au fost organizate până în prezent. Cel mai recent a avut loc în 2014, în colaborare cu Societatea Australiană de Imunologie din Wollongong, Australia.

## GENERALITĂȚI ȘI CONSIDERAȚII TEHNICE DESPRE CITOMETRIA ÎN FLUX

Imunofenotiparea prin citometrie în flux evaluează individual celule în suspensie pentru a decela prezența și absența unor antigene specifice (fenotip). În afecțiunile hematologice maligne evaluarea imunofenotipică parcurge mai multe etape pentru obținerea de informații și pentru interpretarea acestora:

- 1) *identificarea liniei celulare* căreia îi aparțin celulele analizate și determinarea maturității sau imaturității lor;
- 2) *detectarea celulelor anormale* prin identificarea expresiei antigenice care diferă în mod semnificativ de normal;
- 3) *o documentare detaliată a fenotipului populațiilor de celule anormale* (de exemplu, prezența sau absența unor antigeni) și, în comparație cu omologul lor de pe celule normale, documentarea creșterii sau scăderii intensității fluorescenței a fluorocromului folosit pentru marcarea;
- 4) *estimarea valorii diagnostice a informațiilor* disponibile și, în cazul în care nu pot fi asociate unei entități distincte de boală, dezvoltarea unei liste de posibile boli, cu sugerarea unor studii suplimentare care ar putea avea valoare de diagnostic – cum ar fi imunohistochimie, citogenetică convențională, fluorescență în hibridizare *in situ* (FISH) –, precum și studii de diagnostic molecular;
- 5) *furnizarea de informații imunofenotipice suplimentare*, care ar putea avea o valoare de prognostic, inclusiv identificarea țintelor potențiale de terapie direcționată.

Prezentăm în continuare lista principalilor anticorpi monoclonali folosiți în diagnosticul hemopatiilor maligne.

## Lista principalilor anticorpi monoclonali folosiți în diagnosticul hemopatiilor maligne [9]

- CD1a** – exprimat pe celulele dendritice, pe celulele Langerhans și pe precursorii acestora, pe timocitele corticale, pe unele subseturi de celule B; anticorp folosit în definirea stadiului timic al celulelor T
- CD2** – prezent pe limfocitele T periferice normale și în procent mare pe celulele NK; exprimat, de asemenea, pe toate timocitele
- CD3** – receptor pentru celulele T; este exprimat pe limfocitele T mature și pe timocite
- CD4** – este exprimat în mare parte de timocite în faza de dublu pozitiv, coexprimat cu CD8; este receptor pentru proteina gp120 din anvelopa virusului imonodeficienței umane tip 1 (HIV-1)
- CD5** – este exprimat pe limfocitele T mature și mare parte din timocite
- CD6** – exprimat pe mare parte din limfocite T mature, pe unele limfocite B și pe timocitele medulare; este exprimat și pe celulele NK
- CD7** – marker pan-T; este exprimat pe timocite, pe majoritatea limfocitelor T de repaus, pe celulele NK, pe limfocitele B din măduva fetală, pe celula stem hematopoietică; moleculele CD7 sunt interesate în activarea limfocitelor T
- CD8** – sunt exprimate pe limfocitele T supresoare (citotoxice), de asemenea pe celulele NK și pe celulele T  $\gamma\delta^+$
- CD9** – exprimat pe limfocitele pre-B, pe plachete, pe monocite, pe eozinofile, pe bazofile, pe celulele T activate
- CD10** – antigen CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen); este exprimat pe celulele B, într-un stadiu activ al ontogeniei, ca celule care exprimă imunoglobuline pe suprafață; este exprimat de limfocitele B